Učinak teških metala na aktivnost esteraza u vodenoj leći (Lemna minor L.)

Čavka, Tanja

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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:217:880366

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Tanja Čavka

UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZA U VODENOJ LEĆI (*LEMNA MINOR* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj diplomski rad izradila sam u
Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka
Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
pod voditeljstvom prof.dr.sc.Branke Pevalek Kozline
radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

Zahvala

Tijekom izrade ovog diplomskog rada pružena mi je velika pomoć, stručni savjeti te razumijevanje od strane asistentice dr.sc.Sandre Radić, kojoj se najljepše zahvaljujem.

Također se na savjetima zahvaljujem prof.dr.sc.Branki Pevalek – Kozlini.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZA U VODENOJ LEĆI (*LEMNA MINOR* L.)

Tanja Čavka

Botanički zavod Biološkog odsjeka
Prirodoslovno – matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu
Roosveltov trg 6, Zagreb

Vodena leća *Lemna minor* L. je kozmopolitska jednosupnica pogodna za ekotoksikološka istraživanja. U ovom je radu u uvjetima *in vitro* analiziran učinak teških metala na aktivnost i sastav esteraza u vodenoj leći *Lemna minor* L. uzgajanoj sedam dana u površinskim vodama Sava Županja, Sava Jasenice i Sutla Prišlin sakupljenim jednom mjesečno unutar tri mjeseca, otpadnim vodama ZGOS sakupljenim svaka 4h unutar 24h te otpadnoj vodi Jakuševac. Sadržaj teških metala poput cinka, žive i kroma bio je povišen u gotovo svim uzorcima ispitivanih voda, dok je sadržaj željeza, nikla, kadmija, arsena i mangana bio ispod najviših dopuštenih vrijednosti. Korištenjem 2-naftilacetata kao supstrata esteraza, u odnosu na kontrolne biljke, zapažena je povećana aktivnost esteraza u vodenim lećama izloženim otpadnim vodama ZGOS (1-3), Jakuševcu te površinskim vodama SŽ (1-3) i SJ (2-3). Elektroforetskom analizom razdvojene su ukupno tri izoforme esteraza koje se javljaju u svim uzorcima pri čemu nije zabilježena pojava novih izoformi. Sadržaj ukupnih proteina u vodenoj leći snižen je u svim uzorcima, naročito kod onih izloženih otpadnoj vodi ZGOS. Dobiveni rezultati ukazuju na moguću uključenost esteraza u prilagodbi vodene leće na stres izazvan teškim metalima. Aktivnost esteraza mogla bi se koristiti kao biomarker toksičnosti uzrokovane različitim onečišćivaćima.

(39 stranica, 8 slika, 4 tablice, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: esteraze / *Lemna minor* L. / teški metali / ukupni proteini

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

THE EFFECTS OF HEAVY METALS ON ESTERASE ACTIVITY OF DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.)

Tanja Čavka

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

Duckweed (*Lemna minor* L.) is a widely spread monocot often used as a model organism in ecotoxicological studies. The effects of heavy metals present in certain surface and wastewater samples on esterase activity and isoesterase patterns of duckweed cultured *in vitro* were investigated. Duckweed plants were exposed to surface - Sava Županja, Sava Jasenice and Sutla Prišlin (collected monthly over a 3-month monitoring period) and wastewater samples - ZGOS (collected every 4h during one day) and Jakuševac for seven days. The contents of zinc, mercury and chromium were elevated while those of iron, nickel, cadmium, arsenic and manganese were below the maximum allowed value. Esterase activities, measured with 2-naphtylacetate, increased in duckweed exposed to ZGOS (1-3), Jakuševac, SŽ (1-3) and SJ (2-3) water samples. In total, three isoforms of esterase were present in both control and treated duckweed and appearance of new bands was not noticed. The content of soluble proteins was decreased in duckweed exposed to all tested water samples though especially in plants exposed to ZGOS. Results obtained indicate a possible involvement of esterases in duckweed's adaptation to stress caused by heavy metals. Esterase activity could be used as a potential marker of toxicity induced by various agents.

(39 pages, 8 figures, 4 tables, 37 references, original in Croatian)

Key words: esterase activity / *Lemna minor* L. / heavy metals / soluble proteins

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

POPIS KRATICA

EST: **est**eraze

JAK: otpadna voda **Jak**uševac

KT: prijenosni koeficijent

PS: hranjiva podloga po **P**irsonu i **S**eidelu

PVPP: **p**oli**v**inil**p**oli**p**irolidon

SJ: površinska voda **S**ava **J**asenice

SP: površinska voda **S**utla **P**rišlin

SŽ: površinska voda **S**ava **Ž**upanja

TEMED: N,N,N′,N′-**te**tra**m**etil**e**tilen**d**iamin

ZGOS: otpadna voda, **z**agrebački **g**radski **o**tpadni **s**ustav

SADRŽAJ

1 UVOD **2**
1.1 TEŠKI METALI 3
1.2 UTJECAJ TEŠKIH METALA NA BILJKE 4
1.3 NEESENCIJALNI TEŠKI METALI 5
1.4 ESENCIJALNI TEŠKI METALI 6
1.5 MEHANIZMI OBRANE BILJAKA OD TEŠKIH METALA 8
1.6 ESTERAZE 8
1.7 APSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA 9
1.8 ELEKTROFOREZA PROTEINA 10

2 CILJ ISTRAŽIVANJA **13**

3 MATERIJALI I METODE **15**
3.1 ODREĐIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U UZORCIMA VODE 15
3.2 BILJNI MATERIJAL 15
3.3 KULTURA VODENE LEĆE U UVJETIMA *IN VITRO* 16
3.4 EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA 17
3.5 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ESTERAZA 18
3.6 ODREĐIVANJE SASTAVA ESTERAZA 19
3.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 20

4 REZULTATI **22**
4.1 SADRŽAJ TEŠKIH METALA U UZORKOVANIM POVRŠINSKIM I OTPADNIM VODAMA 22
4.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA SADRŽAJ UKUPNIH PROTEINA U VODENOJ LEĆI 24
4.3 UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZA U VODENOJ LEĆI 25
4.3.1 UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZA – POVRŠINSKE VODE 25
4.3.2 UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZA – OTPADNE VODE 26
4.4 UČINAK TEŠKIH METALA NA SASTAV ESTERAZA U VODENOJ LEĆI 27

5 RASPRAVA **30**

6 ZAKLJUČAK **33**

7 LITERATURA **35**

Biljke su autotrofni organizmi kojima su da bi se optimalno razvijali potrebni određeni uvjeti,kao što su voda, sunčeva svjetlost, povoljna temperatura, mineralne tvari itd. Ukoliko su zadovoljeni potrebni uvjeti biljke rastu, razvijaju se i razmnožavaju.

Vrlo često biljke su na prirodnim staništima izložene okolišnim čimbenicima koji imaju nepovoljan utjecaj te uzrokuju stres. S obzirom da stres utječe na preživljavanje, biljke razvijaju adaptacijske prilagodbe koje uključuju genetski uvjetovanu otpornost te aklimatizacijske prilagodbe koje su rezultat prijašnjeg izlaganja biljke stresnom uvjetu. Stres mogu uzrokovati manjak vode, niske odnosno visoke temperature, manjak kisika, onečišćenje zraka, prejak intenzitet osvjetljenja, utjecaj teških metala i dr. Biljke ne reagiraju na različite nepovoljne okolišne čimbenike u jednakim vremenskim razdobljima. Promjena temperature najbrže uzrokuje stresni učinak, u svega nekoliko minuta, dok kod manjka mineralnih tvari, on može izostati par mjeseci.

Izlaganje jednom tipu stresa može inducirati određeni stupanj tolerancije prema drugim tipovima stresa. Mnogi geni inducirani stresom su razvojno regulirani, što upućuje da fiziološke promjene u različitim razvojnim stadijima imaju sličnosti s promjenama tijekom stresa (Pevalek-Kozlina, 2003).

Kao što je već prethodno navedeno, jedan od nepovoljnih stresnih abiotičkih čimbenika koji djeluje na biljke je utjecaj teških metala. Teški metali u okoliš dospijevaju geokemijskim djelovanjem a posebice ljudskim aktivnostima (industrija, izgaranje fosilnih goriva, rudarstvo). Teški metali su toksični kako za biljke tako i za druge žive organizme te već u malim koncentracijama predstavljaju opasnost. Povećana prisutnost teških metala u tlu, vodi i organizmima smatra se štetnom što je i razlog zakonskom propisivanju ograničenja njihovih koncentracija u okolišu.

Količine teških metala koje biljke uzimaju iz tla i ulazak teških metala u hranidbeni lanac ovise ponajviše o vrsti biljke, vrsti metala, koncentraciji metala u tlu, tipu tla, vlazi tla i o pH tla. Biljke se razlikuju u sposobnosti upijanja i akumuliranja teških metala, ali i podnošljivosti teških metala, pri čemu se razlikuju i u odnosu prema različitim teškim metalima. Različite biljne vrste mogu različito podnositi određene koncentracije teških metala što također ovisi i o vrsti metala.

Kao posljedica izloženosti teškim metalima u biljkama nastaje niz morfoloških i metaboličkih promjena poput inhibicije rasta, epinastije listova, nekroze, kloroze, promjene

aktivnosti enzima (Van Assche i Clijsters, 1990). Upravo se analizom aktivnosti enzima može procijeniti učinak teških metala na biljni organizam (Chaoui i sur., 2004)

1.1 TEŠKI METALI

Teški metali su metali čija je gustoća veća od 5 g/cm^3. Teški metali se odlikuju različitim kemijskim, fizičkim i fiziološkim svojstvima. Zbog nemogućnosti razgradnje predstavljaju opasnost za okoliš i žive organizme (Mejáre i Bülow, 2001). Teški metali u okoliš dospijevaju bilo geokemijskim ili antropogenim djelovanjem.

U toksične metale se ubrajaju oni metali koji nisu biogeni i djeluju isključivo toksično kao što su kadmij, olovo, živa, talij, arsen. Takve teške metale nazivamo neesencijalnim.
Teški metali se nalaze u svim ekosustavima. Biljne svojte razvile su tijekom evolucije često vrlo specifične potrebe za određenim kemijskim elementima, uključujući i teške metale. U svim višim biljkama središnju metaboličku ulogu imaju željezo, mangan, bakar, cink i molibden, u mahunarkama najviše nikal i kobalt. Željezo ima glavnu ulogu u hem-grupi, dok magnezij ima sličnu funkciju u klorofilu odnosno fotosintezi. Navedeni metali pojedinačno ili povezani sudjeluju u izgradnji i djelovanju raznih enzima i proteina. Takve teške metale nazivamo esencijalnim teškim metalima, a oni također nakon prelaska neke dozvoljene koncentracije postaju toksični (Fodor, 2002).

Mnogi metali kao esencijalni mikronutrienti nalaze se u biljkama u količinama koje prelaze njihove metaboličke potrebe (< 10 ppm). Hiperakumulacijske biljke mogu akumulirati izvanredno velike količine metala (tisuće ppm). Hiperakumulacijske biljke ne spremaju samo velike količine esencijalnih mikronutrienata, nego i neesencijalnih, koji inače mogu djelovati otrovno na biljke i životinje. Takva nakupljanja u tlu, vodi i organizmima koji obitavaju u takvom području mogu biti posljedica zagađenja zraka i taloženja čestica iz zraka ili oborina.

Svojstvo hiperakumulacije u metalofitima može se iskoristiti za poboljšanje zagađenog tla ili za uklanjanje zagađivala u otpadnim vodama, ali takve biljke mogu poslužiti i kao indikatori zagađenja zraka, tla ili vode teškim metalima. Za razliku od mnogih organskih zagađivača, teški metali se ne razgrađuju u okolišu, pa njihova akumulacija u biljkama može poslužiti za određivanje vremenskog i prostornog koncentracijskog gradijenta. Praćenje promjena koncentracija teških metala u nižim i višim biljkama može pokazati putove širenja i utjecaja zračnih zagađenja.

Vodene biljke teške metale primaju čitavom površinom tijela jer su u neposrednom kontaktu s vodom, dok kopnene biljke teške metale primaju putem korjenovog sustava. Koliko god su teški metali u tragovima životno važni, veće količine djeluju štetno, a i male količine u vodi ili tlu mogu biti opasne jer se u hranidbenom lancu mogu nagomilavati u organizmu i na kraju doseći koncentraciju koja naruši biološku ravnotežu zdravog organizma (Mishra i sur., 2008). Višestruko povećanje koncentracije teških metala u organizmu u odnosu na koncentraciju u okolišu nastaje radi ugradnje teških metala u hranidbene lance. Povećanje koncentracije teških metala u biomasi naziva se biomagnifikacija (Drost i sur., 2007).

Neke biljke su hiperakumulativne i podnose veće koncentracije metala, neke podnose samo pojedine metale, a propadaju čim su izložene drugim metalima. To navodi na zaključak da postoje različiti genetički čimbenici koji kontroliraju podnošljivost i akumulaciju. Te razlike odražava i prijenosni koeficijent (transportni koeficijent, KT) teških metala u tlu, na kojem određene biljke rastu. Prijenosni koeficijent KT predstavlja odnos koncentracije metala u tlu i koncentracije tog metala u biljci s tog tla .

1.2 UTJECAJ TEŠKIH METALA NA BILJKE

Teški metali mogu izazvati fitotoksičnost i štetnost na nekoliko načina. U višim biljkama prve znakove oštećenja pokazuje korijenje. Toksično djelovanje se odražava i na fotosintezi i respiraciji, promjeni odnosa biljka/voda, povećanju propusnosti membrana korijenskih stanica, promjeni selektivnosti korijena prema različitim ionima itd. Nagomilavanje metala u biljkama može otrovati ili odvratiti neke biljojede od metalofita pa takva bioakumulacija može nekad imati i zaštitnu funkciju. Visoke koncentracije teških metala izazivaju brojne morfološke i metaboličke promjene u biljkama. Teški metali utječu na metabolizam fitohormona i preko njih na rast biljaka. Teški metali smanjuju intenzitet fotosinteze inhibirajući elektron transportni lanac i sintezu fotosintetskih pigmenata. Posljedično tome, smanjuje se nakupljanje organskih tvari u biljkama.

Teški metali utječu na vodni režim biljaka, smanjuju primanje vode i transport u nadzemne organe, povećavaju difuzni otpor i time smanjuju transpiraciju. Na morfološkoj razini dolazi do inhibicije rasta, nekroze, kloroze, epinastije listova, dok na metaboličkoj razini dolazi do promjena permeabilnosti membrane, zatvaranja plazmodezmija, promjena aktivnosti enzima (Van Assche i Clijsters, 1990).



Slika 1.- kloroza listova izazvana teškim metalima

Oštećenja biološki važnih molekula također mogu biti posljedica toksičnog djelovanja teških metala, izazvana direktnim ili indirektnim putem. Vezanje metala na funkcionalne skupine, promjena aktivne konformacije te zamjena esencijalnih metalnih iona toksičnim metalima predstavlja direktno oštećenje. Indirektna oštećenja nastaju uslijed povećanja koncentracija toksičnih spojeva pri sekundarnim oštećenjima. Ukoliko koncentracija toksičnih spojeva prijeđe određene vrijednosti, dolazi do oštećenja biološki važnih molekula poput DNA, RNA i proteina (Perl-Treves i Perl, 2002; Mallick, 2004).

1.3 NEESENCIJALNI TEŠKI METALI

Neesencijalni teški metali kao što su olovo, živa, kadmij, talij, arsen i krom biljkama nisu neophodni za rast te već u malim koncentracijama postaju toksični. Izloženost biljke takvim metalima dovodi do raznih fizioloških poremećaja (Fodor, 2002).

Olovo (Pb) (relativna atomska masa 207,2, atomski broj 82) je element 14.(IVB) skupine periodnog sustava elemena. Olovo je vrlo otrovan metal, naročito opasan zbog svog kumulativnog efekta. Spojevi su mu također otrovni ako se unesu u organizam. Najveći zagađivač okoliša olovom su motorna vozila. Nakupljanje olova u većine biljaka je intenzivnije u korijenu nego u nadzemnom dijelu. Olovo oštećuje tkiva, te se vezuje za aktivne SH skupine enzima.

Živa (Hg) (relativna atomska masa 200,59, atomski broj 78) je element 12.(IIB) skupine periodnog sustava elemenata. Živine pare te organski spojevi žive su vrlo jaki otrovi. Štetni sastojci oslobađaju se sagorijevanjem fosilnih goriva, a opasnost od onečišćenja prijeti i zbog povećane upotrebe žive u industriji i poljoprivredi.

Kadmij (Cd) (relativna atomska masa 112.411, atomski broj 48) je element 12.(IIB) skupine periodnog sustava elemenata. Kadmij i otopine njegovih spojeva su toksični. Za biljke je

kadmij toksičan pri većim koncentracijama te se intenzivnije skuplja u nadzemnim vegetativnim organima od olova i žive.

Njegovo usvajanje zavisi od koncentracije, pH vrijednosti zemljišta i koncentracije pristupačnog fosfora. Iz alkalnih zemljišta i pri većem sadržaju pristupačnog fosfora biljke usvajaju manje kadmija. Veće koncentracije kadmija u biljkama potpuno inhibiraju metabolizam te smanjuju intenzitet fotosinteze. Isto tako visoke koncentracije kadmija inhibiraju disanje i transport elektrona u procesu oksidacijske fosforilacije.

Talij (Tl) (relativna atomska masa 204.383, atomski broj 81) element je IIIA skupine periodnog sustava elemenata. Talij je rijedak, ali široko rasprostranjen element. Spojevi su visoko toksični ako se unesu u organizam, a naročito su opasni zbog svog kumulativnog efekta. Visoka toksičnost talija posljedica je afiniteta prema amino, imino te sulfhidrilnim skupinama enzima te njegove kemijske sličnosti s kalijevim ionima uključenim u mnoge stanične i membranske procese.

Arsen (As) (relativna atomska masa 74,922, atomski broj 33) element je 15(VB) skupine periodnog sustava elemenata. Arsen je otrovan i kancerogen a naročito je opasan zbog kumulativnog efekta. Spojevi su mu jako toksični ako se unesu u organizam. Spoj arsena s vodikom, arsenovodik, AsH_3, izvanredno je otrovan.

Krom (Cr) (relativna atomska masa 51,996, atomski broj 24) element je VIB skupine periodnog sustava elemenata. Spojevi kroma(VI) su toksični i kancerogeni. Krom nije neophodan element za biljke, no stimulativno djeluje na rast i razvoj nekih biljaka. Postoje značajne razlike među biljnim vrstama u sposobnosti akumuliranja kroma. Najčešći simptomi suviška kroma su kloroza i zaostajanje u rastu. Veće koncentracije kroma mogu utjecati na klijanje sjemena, vodni režim te sadržaj drugih elemenata.

1.4 ESENCIJALNI TEŠKI METALI

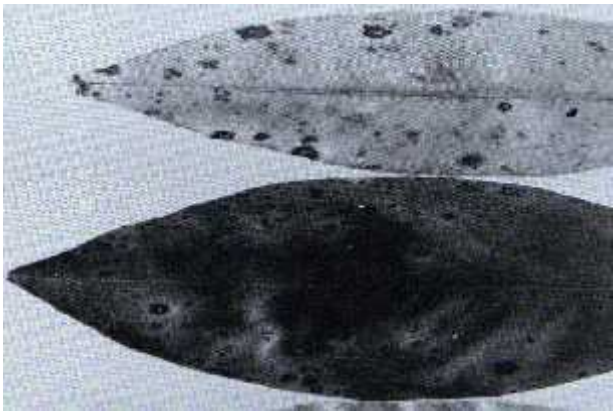
Esencijalni teški metali poput željeza, magnezija, cinka i mangana neophodni su za rast i razvoj biljaka, te dolaze kao sastavni dijelovi biološki važnih molekula i sudjeluju u raznim reakcijama. Ti metali biljkama su potrebni u određenim količinama, međutim ukoliko dođe do pomanjkanja ili suviška tih istih metala, javlja se niz morfoloških i metaboličkih promjena (Fodor, 2002).

Željezo (Fe) (relativna atomska masa 55,845, atomski broj 26) prijelazni je element VIIIB skupine. Najviše je zastupljeno u zelenim dijelovima biljke. Poznato je da listovi pri nedostatku željeza nemaju lisno zelenilo, nego su žuti ili čak i bijeli. Osim toga, cjelokupni rast biljke je smanjen, plodnost oslabljena, a plodovi osobito jako obojeni. Pomanjkanje željeza onemogućuje biljci tvorbu klorofila. Međutim, i previsoka koncentracija željeza štetno djeluje na rast bilja (preko nekih drugih mehanizama). Višak željeza uzrokuje slabije primanje mangana, a listovi se sužavaju i poprimaju brončanu boju. U citokrom kompleksu ključnu ulogu ima molekula citokroma, s atomom željeza (Fe) u centru prstena.

Magnezij (Mg) (relativna atomska masa 24,305, atomski broj 12) je zemnoalkalijski element IIA skupine. Biljke ga usvajaju u ionskom obliku kao Mg^{2+}. Magnezij neutralizira višak kiselina gradeći Mg-oksalate, stvara Mg-pektinat koji dolazi u staničnoj stijenci, aktivator je enzima asimilacije CO_2 (rubisco), te aktivira prijenos aminokiselina na polipeptidni lanac. Dolazi u klorofilu,te ga sadrže listovi i rezervna tkiva sjemena. Njegovim nedostatkom opada fotosinteza, listovi blijede, dolazi do kloroze. Biljka počinje ranije gubiti listove i to s baze prema vrhu,tako da najmlađi opadaju posljednji. Intenzitet rasta je slabiji, plodovi su sitni i vrlo slabo obojeni. Kod suviška magnezija dolazi do raznih morfoloških promjena. Višak magnezija također može utjecati na primanje drugih elemenata kao što su K, Ca i Mn.

Cink (Zn) (relativna atomska masa 65,39, atomski broj 30) prijelazni je element 12.(IIB) skupine. Sastavni je dio koenzima mnogih dehidrogenaza i proteaza te ulazi u sastav enzima karboksilaze. Nedostatak cinka uzrokuje patuljast i rozetast izgled biljke te klorotične pjege. Suvišak cinka popraćen je simptomima smanjenja željeza.

Mangan (Mn) (relativna atomska masa 54.938, atomski broj 25) prijelazni je element VIIB skupine. Ima ulogu aktivatora enzima (dekarboksilaze, dehidrogenaze i oksidaze), kontrolira nivo auksina, utječe na apsorpciju fosfora i magnezija te je neophodan za normalno odvijanje fotosinteze. Lako mijenja valenciju (Mn^{2+} u Mn^{3+}) te sudjeluje u brojnim oksidoredukcijskim procesima. Pri nedostatku mangana dolazi do kloroze listova, biljne stanice gube turgor zbog čega dolazi do svijanja listova. Suvišak mangana izaziva nekrotične pjege, a isto tako može reducirati apsorpciju željeza.



Slika 2. Nekrotične crne pjege na listu limuna izazvane suviškom mangana

1.5 MEHANIZMI OBRANE BILJAKA OD TEŠKIH METALA

Mehanizmi obrane biljaka od teških metala mogu se zasnivati na selektivnom primanju iona, smanjenju propusnosti membrana ili drugim promjenama u strukturi i funkciji, mobilizaciji iona u korijenu, listu ili sjemenu, isključivanju iona iz metabolizma putem taloženja ili vezivanja u biološki nedostupne oblike, odstranjivanju iona putem izlučivanja korijenom, gutacijom, ispiranjem iz listova ili odbacivanjem listova, adaptaciji na zamjenu biogenog metala s toksičnim metalom u nekom enzimu, promjenom u metabolizmu-povećanjem aktivnosti enzimskog sistema na koji teški metali djeluju nepovoljno.

Da bi se spriječio ulazak toksičnih metala u protoplast dolazi do izlučivanja organskih kiselina (oksalna, octena, jabučna), aminokiselina (histidin), enzima i fitohelatina koji metal imobiliziraju i pretvaraju u oblik koji nije biološki dostupan (Patra i sur., 2004). Vezivanjem metala na određene ligande kao što su fitohelatin ili prolin dolazi do detoksikacije (Sanitá di Toppi i Gabrielli, 1999).

1.6 ESTERAZE

Esteraze su enzimi koji hidroliziraju esterske veze te im aktivnost ovisi o okolišnim čimbenicima i razvojnom stadiju biljke. Zbog sposobnosti katalize različitih supstrata većina esteraza je nespecifična dok su specifične samo acetilkolinesteraze i esteraze juvenilnog hormona rasta (Satoh, 2005). Aktivnost esteraza može se odrediti spektrofotometrijski pri

čemu se koriste različiti supstrati poput 2-naftilacetata (Burlina i Galzigna, 1972; Burlina i sur., 1977) kojeg sam koristila u mjerenju aktivnosti tog enzima.

Esteraze se u biljkama javljaju u većem broju izoformi. Izoesteraze se razlikuju masom i ukupnim nabojem radi čega je moguće njihovo razdvajanje elektroforezom. Aktivnost te sastav izoenzima esteraza mogu se koristiti kao pokazatelji diferencijalne ekspresije gena tijekom embriogeneze i organogeneze (Krsnik-Rasol i sur., 1982). Polimorfizam esteraza pri različitim stadijima biljnog razvitka ukazuje na njihovu važnu ulogu u rastu i diferencijaciji biljnog organizma.

1.7 APSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija proučava interakcije elektromagnetskog zračenja s tvarima, kao što su procesi apsorpcije, emisije ili raspršenja. Uspoređivanjem zračenja prije i poslije interakcije s tvari dolazi se do niza vrijednih informacija o strukturi materije.

Elektromagnetsko zračenje predstavlja titranje električkog i magnetskog polja koje kroz prostor u vakuumu putuje brzinom od c=300 000 km/s, te ga možemo okarakterizirati valnom duljinom λ, frekvencijom ν, valnim brojem ili amplitudom A. Brzina svjetlosti ovisi o mediju u kojem se zračenje širi. Najveća je u vakuumu, a manja u optički gušćim medijima. Za razumijevanje mnogih međudjelovanja zračenja i tvari potrebno je znati da se elektromagnetsko zračenje sastoji od čestica energije odnosno fotona, čija energija ovisi o frekvenciji zračenja i Planckovoj konstanti (h=6.63*10^{-34} Js).

Elektromagnetski spektar obuhvaća veliko područje valnih duljina i energija. Veliki broj tvari apsorbira u ultraljubičastom ili vidljivom dijelu spektra što je pogodno za analizu apsorpcijskom spektroskopijom. U spektroskopskom nazivlju apsorpcija je proces u kojem neka kemijska vrsta u propusnoj (prozirnoj) sredini smanjuje intenzitet neke frekvencije elektromagnetskog zračenja. Svaka čestica ima jedinstven skup i raspored energetskih stanja pri čemu je najniže među njima osnovno stanje. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energetskoj razlici između osnovnog i nekog od viših energetskih stanja. Apsorpcijske značajke pojedine vrste uglavnom se opisuju apsorpcijskim spektrom. To je grafički prikaz ovisnosti funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja o promjeni valne duljine, frekvencije ili valnog broja.

Apsorbancija (*A*) odnosno smanjenje intenziteta zračenja je bezdimenzijska veličina koja se definira jednadžbom:

$$A = -\log_{10} T$$

gdje je *T* transmitacija.

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom (*A*) i one koja se određuje (koncentracija *c*) poznat je kao Lambert-Beerov zakon:

$$A = \varepsilon b c$$

gdje je ε molarna apsorptivnost ($dm^3 cm^{-1} mol^{-1}$), *b* je duljina puta zračenja kroz uzorak (cm), a *c* koncentracija ($moldm^{-3}$).

Većina je spektroskopskih uređaja sastavljena od pet osnovnih dijelova: stabilnog izvora zračenja, selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja, jednog ili više spremnika za uzorke, detektora zračenja te procesora signala i uređaja za njegovo očitanje (Skoog i sur., 1999)

1.8 ELEKTROFOREZA PROTEINA

Većina bioloških makromolekula je električki nabijena te će se stoga gibati u električnom polju. Gibanje čestice kroz otapalo pod djelovanjem električnog polja temelj je elektroforeze. Makromolekule se mogu karakterizirati na temelju njihove brzine kretanja u električnom polju. Pomoću ovog svojstva mogu se odrediti molekulske mase proteina, razlikovati molekule na temelju njihovog ukupnog naboja ili oblika, kvalitativno odijeliti različite makromolekule. Elektroforeza se pokazala izuzetno korisnom kao analitička i preparativna tehnika zbog mogućnosti odjeljivanja različitih molekula. Pri elektroforezi na nabijenu česticu djeluje elektrostatska sila kojoj se suprostavlja sila trenja uslijed viskoznosti medija. Čestica određenog naboja koja se nalazi u izolatorskom mediju u električnom polju jakosti *E* će se gibati stalnom brzinom *v* koja ovisi o ravnoteži između električne sile *Eq* i trenja *fv,*

$$Eq = fv$$

gdje je *f* koeficijent trenja.

Elektroforetska pokretljivost μ definira se kao pokretljivost po jedinici polja te ovisi o naboju i koeficijentu trenja.

$$\mu=q/f$$

Elektroforeza ne može pružiti detaljne informacije o strukturi makromolekula. Glavni uzrok tome je činjenica da potporni medij nije izolator nego elektrolit čiji ioni dolaze u interakciju s nabijenom česticom i na taj način je zaklanjaju od vanjskog električnog polja.

Uloga potpornog medija je u prvom redu sprečavanje mehaničkih poremećaja i konvekcija koje se javljaju zbog promjena temperature i velike gustoće koncentriranih otopina makromolekula. Međutim, potporni medij ponekad apsorbira različite vrste makromolekula ili djeluje kao molekulsko sito. Kao potporni medij koristi se papir ili gelovi poput škroba, poliakrilamida, agaroze ili agaroza/ poliakrilamida. Poliakrilamid je trenutno najučinkovitiji potporni medij za elektroforezu proteina, DNA i RNA. Priprema se polimerizacijom akrilamida i N,N-metilenbisakril-amida. Postoje različite varijante elektroforeze s ovim tipom gela kao što su elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu i diskontinuirana elektroforeza. Danas su pretežno u upotrebi pločasti gelovi jer se na njih može nanijeti veći broj uzoraka istovremeno. Kod diskontinuirane elektroforeze gel se priprema u uspravnoj cjevčici ili između dviju staklenih ploča te se razlikuju dva dijela gela, odnosno gornji i donji gel. Gornji gel ili gel za sabijanje ima veće pore, niži pH i ionsku jakost od donjeg gela odnosno gela za odjeljivanje, zbog čega dolazi do akumuliranja molekula na granici dvaju gelova. Po ulasku u donji gel molekule se počinju odjeljivati na temelju učinka molekulskog sita.

Za detekciju proteina u poliakrilamidnim gelovima koriste se različite boje kao što je Coomassie Brillant Blue ili bojenje srebrom, dok se za detekciju točno određenih proteina najčešće koriste imunološke metode (Stryer i sur., 2002)

Cilj ovog istraživanja bio je proučiti učinak teških metala na aktivnost i pojavu izoenzima esteraza u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) u uvjetima *in vitro*, uzgajanoj tjedan dana u površinskim vodama Sava Županja, Sava Jasenice i Sutla Prišlin uzorkovanim jednom mjesečno unutar tri mjeseca, otpadnim vodama ZGOS uzorkovanim svaka 4h unutar 24 h te otpadnoj vodi Jakuševac. Spektrofotometrijska te elektroforetska analiza je provedena uz 2-naftilacetat kao supstrat esteraza. Obzirom da su esteraze osjetljive na prisutnost teških metala, htjela sam utvrditi da li bi se ti enzimi mogli koristiti kao biomarkeri onečišćenja voda teškim metalima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 ODREĐIVANJE SADRŽAJA TEŠKIH METALA U UZORCIMA VODE

Sadržaj teških metala (željeza, mangana, bakra, cinka, kadmija, kroma, nikla, olova, žive i arsena) 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

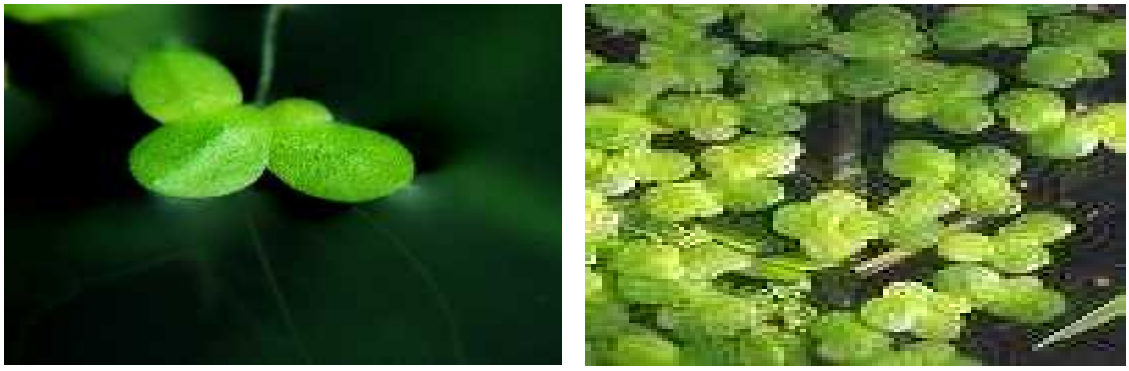
kalibracijski standardi: 25 ng/ml i 50 ng/ml

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

3.2 BILJNI MATERIJAL

Kao biljni materijal u ovom istraživanju korištena je vodena leća (*Lemna minor L.*) iz porodice *Lemnaceae.*Vodena leća je vodena jednosupnica kozmopolitskog rasprostranjenja te je jedna od najraširenijih biljaka na svijetu. Odgovara joj mirna voda pa je najčešće susrećemo u jezerima, barama i mirnijim potocima u prirodi. U barama gdje je koncentracija nitrata visoka posebno je raširena, jer ova je biljka poznata kao dobar potrošač nitrata. U akvariju i u vrtnom ribnjaku ova se biljka može dobro iskoristiti kao kemijski pročišćivač vode. Vrlo je jednostavne građe, sastoji se od članaka koji sliče listu te slobodno plivaju. Iz stražnjeg dijela članka se razvija korijen te taj dio odgovara reduciranoj osi izdanka, dok prednji dio svakog članka odgovara listu. Intenzivno se razmnožavaju pupanjem. Sastoji se od 3-5 listića u promjeru od oko 2-3 mm koji plutaju na površini vode i iz kojih izravno raste korijenje (iz svakog listića po jedan korijen). Listovi su eliptičnog oblika,

najčešće simetrično raspoređeni, glatke površine i jarke zelene boje. Blago su sferno ispupčeni na gornjem dijelu (radi plivanja). Neprestano rastu i kad ih je 4-5 na jednoj biljci, odvajaju se. Ova biljka može biti vrlo dekorativna, pogotovo ako se koristi u otvorenom akvariju ili u vrtnom jezeru. Vodena leća se vrlo često koristi u ekotoksikološkim istraživanjima radi niza prednosti kao što su brzi rast, lakoća uzgoja, male dimenzije, osjetljivost na razna onečišćenja (Wang, 1986; Naumann i sur., 2007; Drost i sur., 2007).



Slika 3.i 4.- Vodena leća (*Lemna minor L*.) u prirodi

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

Vodena leća (*Lemna minor L*.) je sakupljena u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Steriliziranjem etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnčiću i Devidéu (1980) biljke su uvođene u kulturu *in vitro* 1995. Za održavanje vodene leće korištena je modificirana hranjiva podloga PS (Pirson i Seidel 1950), a za eksperimentalnu analizu hranjiva podloga po Steinbergu (1946). Sastav korištenih hranjivih podloga prikazuje tablica 1. 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 kalijeva hidroksida c=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 300 mL (određivanje aktivnosti esteraze) 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 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) u klima–komori. Uzorci biljnog tkiva za pokuse uzimani su iz tikvica nakon 7 dana pokusa.

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga po Pirsonu i Seidelu (1950) i Steinbergu (1946).

	Pirson i Seidel			**Steinberg**	
MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L	MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L
KNO_3	400	3,95	KNO_3	350	3,46
KH_2PO_4	200	1,47	KH_2PO_4	90	0,66
			K_2HPO_4	12,6	0,072
$MgSO_4 \times 7H_2O$	300	1,21	$MgSO_4 \times 7H_2O$	100	0,41
$CaCl_2 \times 2H_2O$	804	5,46	$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$	295	1,25
MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L	MIKROELEMENTI	µg/L	µmol/L
$MnCl_2 \times 4H_2O$	300	1,5	$MnCl_2 \times 4H_2O$	180	0,91
H_3BO_3	500	8,1	H_3BO_3	120	1,94
Na_2 – EDTA x $2H_2O$	1860	4,99	Na_2 – EDTA x 2H2O	1500	4,03
željezni citrat	5000	20	$FeCl_3 \times 6H_2O$	760	2,81
			$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	44	0,18
			$ZnSO_4 \times 7H_2O$	180	0,63
ORGANSKI DODACI	g/L	mmol/L			
saharoza	10	29,2			
asparagin	0,1	0,66			

3.4 EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA

U 1 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA uz dodatak PVPP-a, homogenizira se po 100 mg vodene leće. U rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4 ^oC i 25000 g homogenat se centrifugira 30 minuta. Dio dobivenog ekstrakta koristila sam kao sirovi ekstrakt u kojem sam odredila koncentraciju proteina metodom Bradforda (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti esteraza.

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. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima odredi se očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,096 mg/ml do 0,8 mg/ml). Koncentracija proteina izražena je kao mg proteina po gramu svježe mase biljnog tkiva.

3.5 ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ESTERAZA

Na temelju promjene apsorbancije reakcijske smjese mjerene spektrfotometrijskim postupkom, prema modificiranoj metodi koju su opisali Burlina i Galzigna (1972), može se odrediti aktivnost esteraza. Za određivanje esteraza upotrebljena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 1,0 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,4 i 15 µl 100 mM 2-naftilacetata (supstrat esteraza) otopljenog u metanolu. U ovu otopinu dodano je 50 µl sirovog ekstrakta. Porast apsorbancije mjeri se svakih 15 sekundi tijekom 3,5 minute pri temperaturi reakcijske smjese od 24 ^{o}C. Vrijeme počeka nakon dodavanja uzorka je iznosilo 15 sekundi. Produkt hidrolize je 2-naftol koji u UV području apsorbira svjetlost valne duljine od 313 nm.

Aktivnost esteraza izražena je kao µmol hidroliziranog supstrata po minuti po ml uzorka prema formuli:

$$EST = \frac{\Delta Asv \times 4xV_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu mol/min\,ml]$$

$$EST = \frac{\Delta A\mu mol\,min\,ml}{m(g)} \qquad [\mu mol/min\,g_{svt}]$$

$V_{r.s}$= volumen reakcijske smjese = 1 ml

F.R. = faktor razrjeđenja = 0

$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 50 µl

ε = ekstinkcijski koeficijent (molarni koeficijent apsorpcije)

ε 2-naftol (313nm)=1, 25 $mM^{-1}cm^{-1}$

4= faktor s kojim se množi ΔA sv da bi se rezultat izrazio u minuti
l = duljina optičkog puta = 1 cm

g_{svt}= masa tkiva izražena u gramima svježe tvari

Specifična aktivnost esteraza izračunava se dijeljenjem esterazne aktivnosti izražene u µmol hidroliziranog supstrata po minuti po g_{svt} sa koncentracijom proteina u mg po g_{svt}.

$$\frac{\text{aktivnost EST} \quad \frac{\Delta A\,\mu\text{mol}}{\min g_{sv.t.}}}{\text{sadržaj proteina} \quad \frac{\text{mg}}{g_{sv.t.}}}$$

3.6 ODREĐIVANJE SASTAVA ESTERAZA

Sastav izoenzima esteraze određuje se razdvajanjem proteina iz biljnih ekstrakata vertikalnom diskontinuiranom poliakrilamid-gel elektroforezom (Laemmli, 1970) u nativnim uvjetima u smjeru anode (anodna elektroforeza).

Između dviju staklenih ploča pripremi se poliakrilamidni gel koji se sastoji od dva dijela: gornjeg gela za koncentriranje i donjeg gela za razdvajanje. Masena koncentracija monomera akrilamida u gelu za razdvajanje bila je 8,0% T, a maseni udio bis-akrilamida 2,67% C, dok su u gelu za koncentriranje te vrijednosti iznosile 4,95% T i 2,67% C. Gel za razdvajanje sadržavao je 1,5 M pufera Tris/HCl (pH vrijedosti 8,8), APS (0,05%) i TEMED (0,05%), a gel za koncentriranje sadržavao je 0,5 M pufera Tris/HCl (pH vrijednosti 6,8), APS (0,1%) i TEMED (0,1%). Elektrodni pufer pH vrijednosti 8,3 sadržavao je 0,005 Tris/HCl i 0,038 M glicina.

Elektroforeza se provodi pri temperaturi od 4 ^{o}C na instrumentu Elektrophoresis Power Supply, Consort E132 (Sigma). Na početku elektroforeze namjesti se napon od 100 V (da bi se uzorak koncentrirao u gornjem gelu), a kada je boja za obilježavanje tijeka elektroforeze došla do granice s donjim gelom napon se povisi na 200 V. Elektroforeza je završila kada je boja za obilježavanje elektroforeze došla na udaljenost oko 0,5 cm iznad donjeg ruba gela.

Za vizualizaciju izoesteraza pripreme se otopine A i B. Otopina A se pripremi otapanjem 40 mg 2-naftilacetata u 8ml 50% -tnog acetona i pomiješa sa 100mL 50mM Tris/HCl pufera

pH 7,1. Za pripremu otopine B otopi se 200mg boje Fast Blue RR Salt (Sigma) u 10 ml metanola i filtrira se u 100 ml 50 mM Tris/HCl pufera pH 7,1. Gelovi se inkubiraju 30 minuta u otopini A, isperu se vodovodnom vodom i potom se inkubiraju u otopini B do pojavljivanja pruga. Produkt hidrolize je 2-naftol koji daje ružičasto obojene pruge. Nakon toga se gelovi ponovo ispiru u vodovodnoj vodi i fiksiraju u 30%-tnom etanolu (Balen i sur., 2004).

3.7 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja replika (n=6). Usporedba kontrole i tretmana (pojedinačno i međusobno) provedena je testom "Duncan's New Multiple Range Test" (Duncan, 1955). Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$. Koristila sam računalni program STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc., SAD).

4.1 SADRŽAJ TEŠKIH METALA U UZORKOVANIM POVRŠINSKIM I OTPADNIM VODAMA

Metodom atomske apsorpcijske spektrometrije su u uzorkovanim površinskim i otpadnim vodama određeni esencijalni teški metali željezo, mangan, cink, bakar i nikal te neesencijalni olovo, živa, kadmij, krom i arsen. 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 2.

Tablica 2. Granične vrijednosti teških metala u vodama.

	µg/L
željezo	<100
mangan	<50
cink	<80
bakar	<2
nikal	<15
olovo	<0,1
živa	<0,01
kadmij	<0,1
krom	<1
arsen	<50

Sadržaj željeza, mangana, nikla, arsena i kadmija u odabranim površinskim i otpadnim vodama bio je ispod najviših dozvoljenih vrijednosti za teške metale u vodama (Tablice 3 i 4). Sadržaj cinka bio je povišen u otpadnoj vodi uzetoj iz Zagrebačkog otpadnog gradskog sustava (ZGOS 5) tijekom 24h, a sadržaj bakra samo u uzorcima vode sakupljene nakon 4 i 12h (ZGOS 1 i 3). Sadržaj kroma bio je povišen u uzorcima površinske voda Sava Županja te u gotovo svim uzorcima otpadne vode ZGOS. Sadržaj olova bio je povišen u uzorcima površinske vode Sutla Prišlin te otpadne Jakuševac no posebice u otpadnoj vodi ZGOS gdje su zabilježene 4 do 5 puta više vrijednosti. Sadržaj žive bio je povišen u površinskim vodama (Sava Jesenice, Sava Županja, Sutla Prišlin) u kojima su mjereni teški metali u odnosu na

vrijednosti iz Tablice 2. Sadržaj tog toksičnog metala bio je povišen i u uzorcima otpadne vode ZGOS 1, 3 i 6 te otpadne vode Jakuševac (Tablica 4).

Tablica 3. Srednje vrijednosti sadržaja teških metala u površinskim vodama uzorkovanim tijekom tri mjeseca.

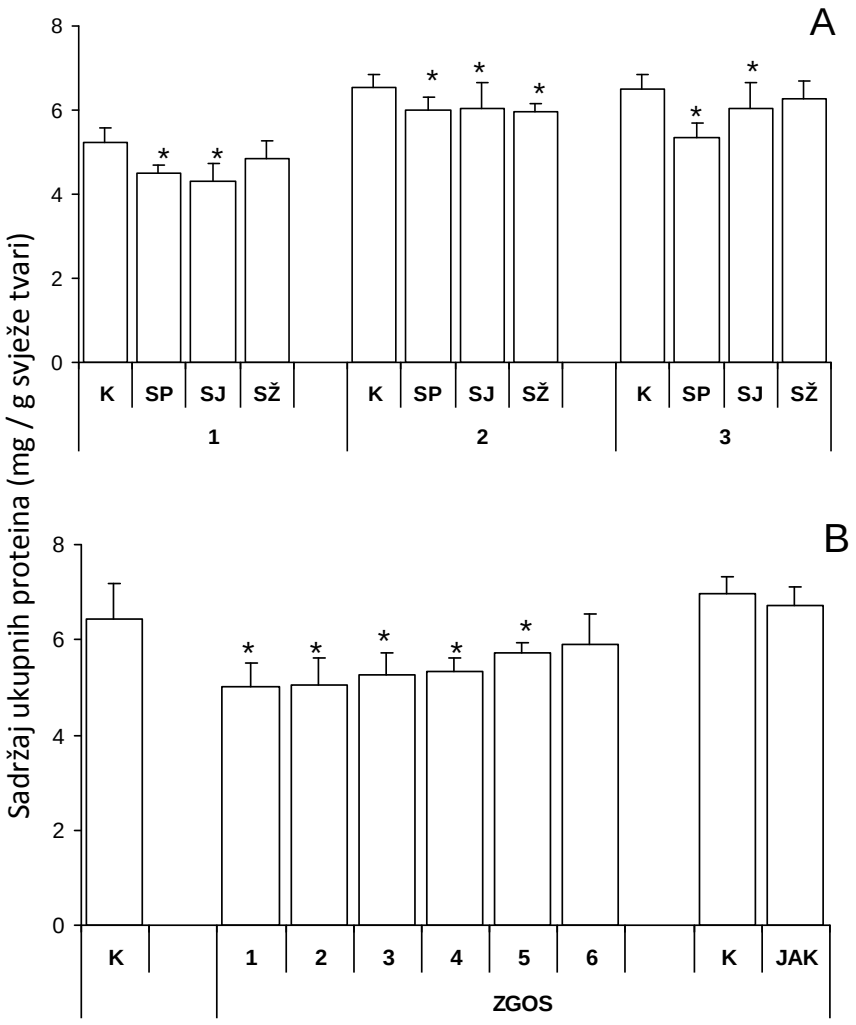
µg/L	Sava Jesenice	Sava Županja	Sutla Prišlin
željezo	19.767	14.000	/
mangan	14.957	16.140	/
cink	2.547	3.463	2.920
bakar	0.757	1.090	0.950
nikal	2.220	4.027	3.500
olovo	0.099	0.179	0.043
živa	0.021	0.022	0.016
kadmij	0.015	0.020	0.010
krom	0.853	1.383	0.920
arsen	0.820	0.577	/

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

µg/L	Zagrebački gradski otpadni sustav						JAK
	1 (4h)	2 (8h)	3 (12h)	4 (16h)	5 (20h)	6 (24h)	
željezo	29.00	42.00	44.00	11.00	64.00	52.00	1.110
mangan	22.46	17.95	27.91	25.13	24.99	26.90	2.640
cink	64.70	56.60	75.50	74.80	88.80	64.00	0.023
bakar	2.203	1.818	2.303	1.945	1.737	1.693	0.660
nikal	2.69	3.00	2.95	6.24	6.27	5.00	2.567
olovo	1.060	0.885	0.875	1.100	1.190	1.150	0.213
živa	0.018	<0.01	0.022	<0.01	<0.01	0.010	0.020
kadmij	0.010	0.009	0.009	0.012	0.012	0.009	/
krom	0.85	2.40	3.74	2.74	2.45	3.75	/
arsen	1.25	1.43	1.52	1.38	1.39	1.45	/

4.2. UČINAK TEŠKIH METALA NA SADRŽAJ UKUPNIH PROTEINA U VODENOJ LEĆI

Sadržaj ukupnih proteina u vodenoj leći izloženoj uzorcima površinskih voda Sutla Prišlin (SP) i Sava Jesenice (SJ) sakupljenim tijekom tri mjeseca (1-3) te jednom uzorku vode Sava Županja (SŽ2) bio je znatno snižen u odnosu na kontrolu (Slika 2A). U vodenoj leći izloženoj otpadnoj vodi iz Zagrebačkog gradskog otpadnog sustava (ZGOS) sakupljanoj svaka 4 sata tijekom jednog dana (kompozitni uzorak – 1-6) također je zabilježeno bitno smanjenje sadržaja proteina dok se u vodenoj leći izloženoj otpadnoj vodi Jakuševac (JAK) taj sadržaj nije bitno razlikovao od kontrole (Slika 2B).

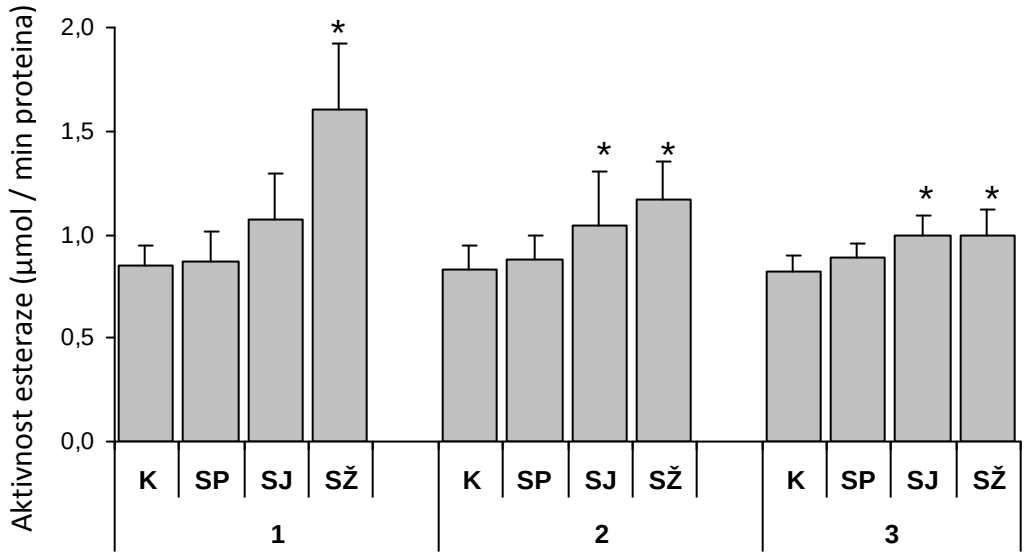


Slika 5. Sadržaj ukupnih proteina u vodenoj leći uzgajanoj tjedan dana u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3. UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZE U VODENOJ LEĆI

4.3.1. UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZE – POVRŠINSKE VODE

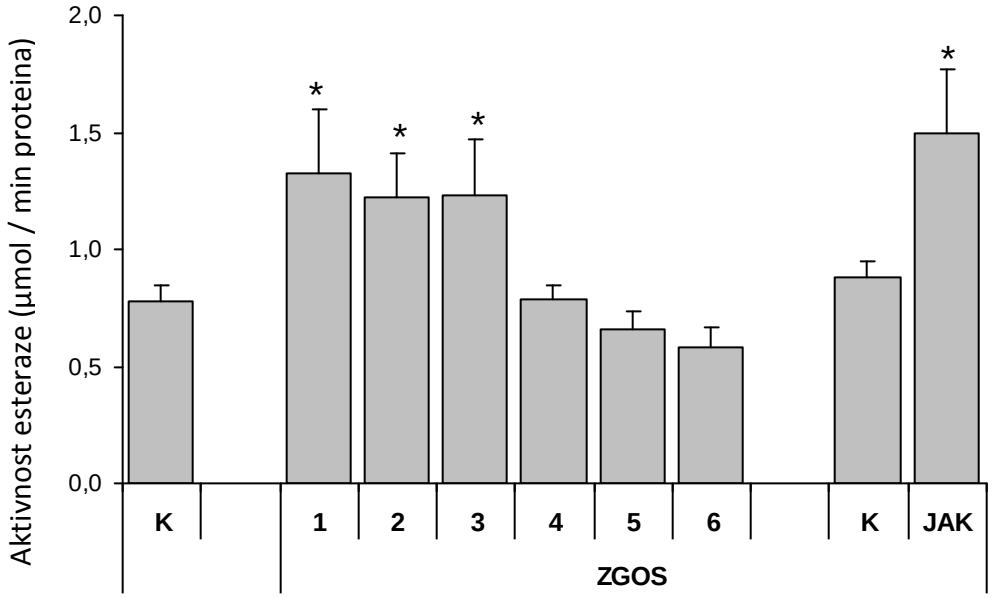
Aktivnost esteraza (EST) u vodenoj leći izloženoj površinskim vodama Sava Županja (SŽ1-3) i Sava Jesenice (SJ2-3) tijekom tjedan dana bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu (Slika 3) dok se u biljkama uzgajanim na površinskoj vodi Sutla Prišlin aktivnost tog enzima nije bitno razlikovala od kontrole.



Slika 6. Aktivnost esteraze u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u površinskim (Sava Jesenice - SJ, Sava Županja - SŽ, Sutla Prišlin - SP) vodama sakupljenim jednom mjesečno u periodu od 3 mjeseca (1-3). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3.2. UČINAK TEŠKIH METALA NA AKTIVNOST ESTERAZE – OTPADNE VODE

Uzorci otpadnih voda ZGOS1-3 statistički su značajno povećali aktivnost EST u usporedbi s kontrolom dok su uzorci ZGOS4-6 bili slični kontrolnim vrijednostima (Slika 4). Teški metali iz uzorka otpadne vode Jakuševac bitno su povećali aktivnost EST.

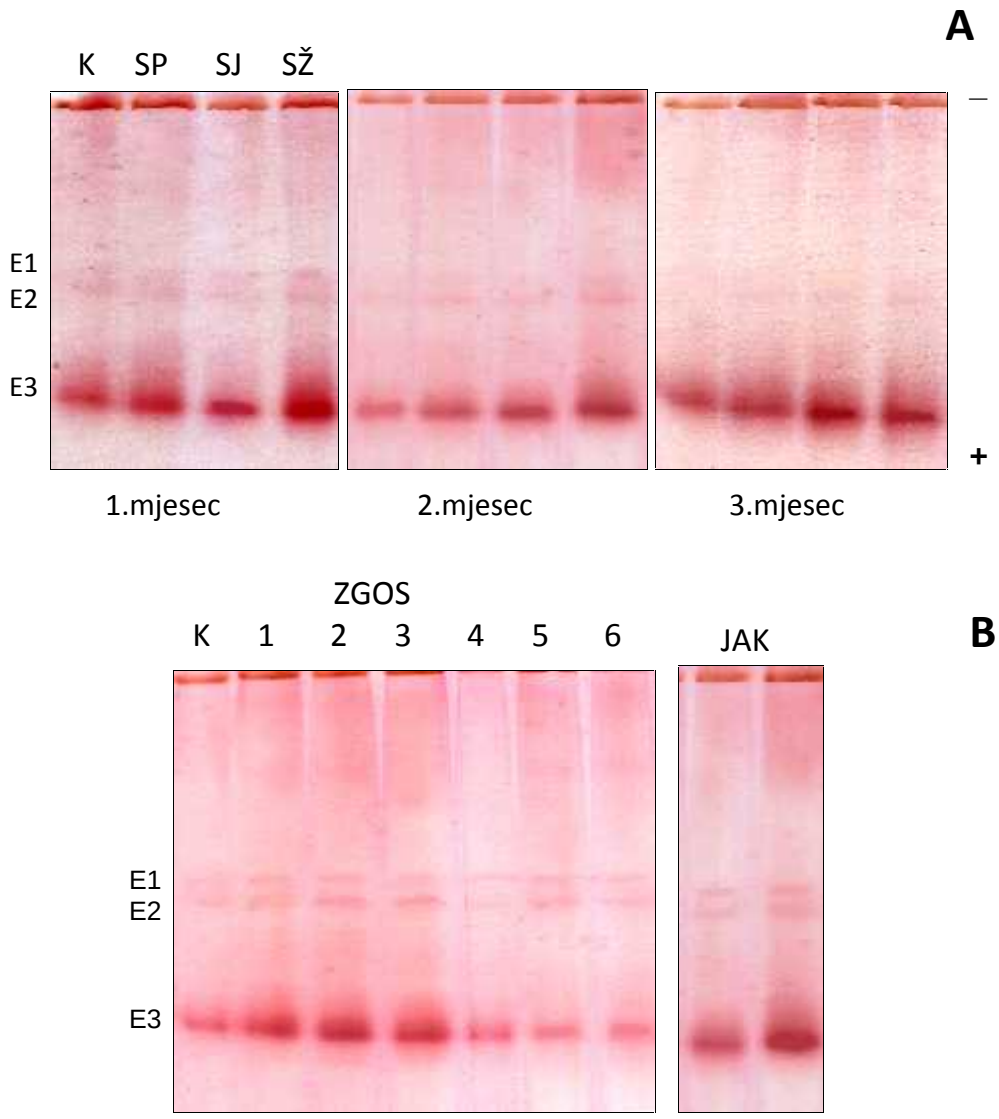


Slika 7. Aktivnost esteraze u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u otpadnim vodama opterećenim teškim metalima: ZGOS 1-6 (zagrebački gradski otpadni sustav – kompozitni uzorak sakupljan svaka 4 sata tijekom 24h) te JAK (Jakuševac). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.4. UČINAK TEŠKIH METALA NA SASTAV ESTERAZA U VODENOJ LEĆI

U vodenoj leći na gelu inkubiranom s 2-naftilacetatom uočila sam ukupno 3 izoenzima esteraza pri čemu nije zabilježena pojava novih izoenzima. Prema rastućoj pokretljivosti u smjeru anode označila sam ih oznakama (E1-E3).

Sva tri izoenzima esteraza su prisutni na kontroli i svim uzorcima voda (Slika 5), no može se primijetiti slabije nakupljanje izoenzima esteraza E1 i E2. Izoenzim esteraze E3 se više nakupljao u uzorcima površinskih voda Sava Županja (SŽ1-3) i Sava Jesenice (SJ2-3), uzorcima otpadnih voda ZGOS1-3 i Jakuševac u odnosu na kontrolu. Svi prisutni izoenzimi daju ružičasto obojene vrpce jer reagiraju s 2-naftilacetatom.



Slika 8. Prikaz izoesteraza u vodenoj leći uzgajanoj tjedan dana u A) površinskim (Sutla Prišlin, Sava Jesenice, Sava Županja) vodama sakupljenim tijekom 3 mjeseca (1-3) te u B) otpadnim vodama ZGOS (sakupljan svaka 4h tijekom 24h) i Jakuševac. Kontrola (K), uzorci površinskih voda - Sutla Prišlin (SP), Sava Jesenice (SJ), Sava Županja (SŽ), te otpadnih – Zagrebački gradski otpadni sustav (ZGOS1-6) i Jakuševac (JAK).

Biljke različito reagiraju na određene koncentracije teških metala zbog čega su diljem svijeta provedena brojna ekotoksikološka istraživanja s ciljem praćenja rasta i razvoja biljaka izloženim različitim sadržajem teških metala.

U ovom su istraživanju procijenjeni toksični učinci smjese teških metala na aktivnost esteraza u vodenoj leći *Lemna minor* L. izloženoj površinskim - Sava Jesenice (SJ), Sava Županja (SŽ), Sutla Prišlin (SP) uzorkovanih jednom mjesečno u tri mjeseca i otpadnim - Zagrebački gradski otpadni sustav (ZGOS - kompozitni uzorak sakupljan svaka 4h unutar jednog dana) i Jakuševac (uzorkovan jednom) vodama potencijalno onečišćenim otpadom industrijskog, poljoprivrednog i komunalnog porijekla.

S obzirom da je u većini uzoraka voda bio prisutan povišeni sadržaj kroma, olova i žive, dok su ostali teški metali poput željeza, nikla, arsena i kadmija bili ispod najviših dopuštenih vrijednosti u svim uzorcima može se pretpostaviti da su promjene u aktivnosti i sastavu esteraza te sadržaju ukupnih proteina posljedice djelovanja ta tri teška metala.

Brojna su istraživanja pokazala da se sadržaj topivih proteina, kao jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa, smanjuje u biljkama izloženim stresnim uvjetima, uključujući teške metale (Baccouch, 2002; Choudhury and Panda, 2004; Cargnelutti i sur. 2006). Rezultati mog istraživanja su pokazali da je do bitnog smanjenja sadržaja proteina došlo u vodenoj leći izloženoj većini uzoraka površinskih voda, a posebice uzorcima otpadne vode ZGOS gdje zabilježena koncentracija olova daleko nadmašuje granične vrijednosti.

Spektrofotometrijski dobiveni rezultati pokazuju povećanje esterazne aktivnosti također u otpadnim vodama ZGOS i Jakuševac te površinskoj vodi Sava Županja 1-3. Elektroforetskom analizom dokazala sam postojanje tri izoforme (E1-E3) prisutne kod svih uzoraka. Na temelju promjene esterazne aktivnosti te pojave izoformi može se zaključiti da esteraze predstavljaju važan mehanizam adaptacije kod vodene leće na stres izazvan teškim metalima. Postojanje većeg broja izoformi ukazuje na prilagodljivost vodene leće na promjenjive uvjete okoliša.

U istraživanju Stipaničev (2009) utvrđeno je da se u gotovo svim uzorcima istraživanih površinskih i otpadnih voda (posebice u uzorcima ZGOS) znatno povećao omjer mase suhe i svježe tvari što ukazuje na povećanu sposobnost akumulacije različitih tvari. To se može objasniti činjenicama da su istraživani uzorci sadržavali povećane količine teških metala i hranjivih tvari te da vodena leća ima veliki potencijal njihova akumuliranja (Axtell i sur., 2003; Miretzky i sur., 2004). Upravo zahvaljujući sposobnosti akumuliranja različitih

organskih i anorganskih tvari vodene leće se rabe i za pročišćavanje otpadnih voda (Brix i Schierup, 1989; Lewis, 1995; Wang, 1992).

Vodena leća pri izloženosti stresu uzrokovanom povišenim koncentracijama teških metala pokazuje tolerantnost zbog adaptacija koje razvija. Kroz nekoliko generacija biljka izložena teškim metalima stvara potomke s izoformama esteraza koje joj omogućuju preživljavanje u takvim uvjetima tijekom duljeg razdoblja. Obzirom da aktivnost i sastav esteraza ovisi o intenzitetu i duljini izlaganja stresu, promjene ekspresije esteraza sve se češće korise kao biomarkeri izloženosti povišenim koncentracijama teških metala (Mukherjee i sur., 2004.)

Tijekom različitih stadija razvitka biljnog organizma esteraze također imaju važnu ulogu na što ukazuje njihov polimorfizam, te se njihova aktivnost kao i sastav izoformi može koristit kao pokazatelj diferencijalne ekspresije gena tijekom embriogeneze i organogeneze (Tamás i sur., 2004.).

Također je u prijašnjim istraživanjima dokazana različita aktivnost esteraza u organiziranom i neorganiziranom tkivu, kao i snažan porast aktivnosti u tumorskom tkivu (Balen i sur., 2004.). Istraživanja su također provedena na vrsti *Myzus persicae* u svrhu proučavanja uloge esteraza pri razvoju otpornosti organizma na pesticide pri čemu je uočeno da stimulacija esterazne aktivnosti osigurava viši stupanj otpornosti na pesticide (Devonshire, 1977.).

Dobiveni rezultati ukazuju na moguću uključenost esteraza u prilagodbi vodene leće na stres izazvan teškim metalima. Aktivnost esteraza mogla bi se koristiti kao biomarker toksičnosti uzrokovane različitim onečišćivaćima.

Na temelju provedenog istraživanja učinka teških metala na aktivnost esteraza u vodenoj leći *Lemna minor* L. u uvjetima *in vitro* mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- U svim uzorcima koji su sadržavali povišene koncentracije teških metala žive, olova i kroma u odnosu na kontrolu dolazi do smanjenja ukupnog sadržaja proteina, naročito kod biljaka uzgajanih u otpadnoj vodi ZGOS.

- Aktivnost esteraza uz supstrat 2-naftilacetat, u odnosu na kontrolu, povišena je u svim uzorcima koji su sadržavali povišene koncentracije navedena tri teška metala, naročito u onim koji su sadžavali otpadnu vodu ZGOS i Jakuševac, te površinsku SŽ i SJ.

- Elektroforetskom analizom utvrđena je pojava tri izoenzima esteraza kod svih uzoraka, pri čemu nije primjećena pojava novih izoenzima.

- Na temelju dobivenih podataka može se zaključiti da se aktivnost esteraza može koristiti kao vrlo osjetljiv bioindikator u praćenju stupnja onečišćenja površinskih voda.

Axtell NR, Sternberg SPK, Claussen K (2003) Lead and nickel removal using Microspora and Lemna minor. Bioresour Technol 89: 41–48

Balen B, Krsnik-Rasol M, Zadro I, Simeon-Rudolf V (2004) Esterase activity and isoenzymes in relation to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff.tissue culture. Acta Bot Croat 63: 83-91

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Brix H, Schierup HH (1989) The use of aquatic macrophytes in water pollution control. Ambio 18: 101–107

Burlina A, Galzigna L (1972) A new and simple procedure for serum arylesterase. Clin Chim Acta 39: 255-257

Burlina A, Michielin E, Galzigna L (1977) Characteristics and behaviour of arylesterase in human serum and liver. Eur J Clin Invest 7: 17-20

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

Chaoui A, Jarrar B, El Ferjani E (2004) Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. J Plant Physiol 161: 125-134

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

Devonshire AL (1977) The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. Biochem J 167: 675-683

Drost W, Matzke M, Backhaus T (2007) Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the timedepence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67: 36-43

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

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

Krajnčić B, Devidė Z (1980) Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia. Berichte des Geobot. Inst.ETH, Stiftung Rübel, Zürich, 47: 75-86

Krsnik-Rasol M, Jelaska S, Šerman D (1982) Isoperoxidases- early indicatorsof somatic embryoid differentiation in pumpkin tissue. Acta Bot Croat 41: 33-39

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

Mallick N (2004) Copper- induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. J Plant Physiol 161: 591-597

Mejáre M, Bülow L (2001) Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals.Trends Plant Physiol 19: 67-73

Miretzky P, Saralegui A, Fernández Cirelli A (2004) Aquatic macrophytes potential for simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). Chemosphere 57: 997–1005

Mishra VK, Upadhyaya AR, Pandey SK, Tripathi BD (2008) Heavy metal pollution induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic ecosystem and its management through naturally occuring aquatic macrophytes. Bioresour Technol 99: 930–936

Mukherjee S, Mukherjee S, Bhattacharyya P, Duttagupta AK (2004) Heavy metals levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed Lemna minor: field and laboratory studies. Environ Int 30: 811-814

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

Naumann B, Eberius M, Appenroth KJ (2007) Growth rate based doseresponse relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St.J Plant Physiol (u tisku) , doi: 10.1016/j.jplph.2006.10.011

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

Perl-Trevers R, Perl A (2002) Oxidative stress: an introduction. U: Oxidative Stress in Plants. Inzė D, Van Montagu M (ur). Taylor & Francis Inc.,London and New York, str 1-32

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

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

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

Sanita di Toppi L, Prasad MNV, Ottonello S (2002) Metal chelating peptides and proteins in plants. U: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad MNV, Strzalka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 59-94

Satoh T (2005) Toxicological implications of esterases- from molecular structures to functions. Toxicol App Pharmacol 207: S11-S18

Skoog DA, West DM, Holler FJ (1999) Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb

Stipaničev D (2009) Učinak toksičnih sastojaka prirodnih i otpadnih voda na biljne testne organizme. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2002) Biochemistry, W.H.Freeman and Company, New York

Tamás L, Huttová J, Mistrík, Šimonovičova M, Široka B (2005) Aluminium induced esterase activity and isosyme pattern in barley root tip. Plant Soil Environ 51: 220-225

Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ 13: 195-206

Wang W (1986) Toxicity test of aquatic pollutans by using common duckweed. Environ Pollut 11: 1-14

Wang W (1992) Use of plants for the assesment of environmental contaminants. Environ Contam Toxicol 126: 87-127