Učinak olova na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišajeva Flavoparmelia caperata (L.) Hale i Evernia prunastri (L.) Ach

Čuček, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:217:007852

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

Marija Čuček

Učinak olova na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišajeva *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale i *Evernia prunastri* (L.) Ach

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Od srca zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec na nesebičnoj pomoći, strpljenju i razumijevanju. Hvala Vam na prenesenom znanju i izdvojenom vremenu prilikom provedbe i pisanja ovog rada.

Također, hvala Maji na svoj pomoći i korisnim savjetima.

Hvala svim djelatnicima Laboratorija za fiziologiju bilja na pomoći i ugodnom društvu.

Veliko hvala Adamu, Matei i Jeleni na potpori i strpljenju u svim trenucima. Hvala i svim ostalim prijateljicama i prijateljima na vremenu koje smo proveli zajedno, posebice onom koje smo proveli u zajedničkim pustolovinama iznad i ispod površine Zemlje.

Hvala F. jer zajedno svijetlimo u mraku.

Najveće hvala mojim roditeljima i bratu na bezuvjetnoj podršci, neumornom strpljenju i ljubavi. Bez vas ovo me bi bilo moguće. Hvala!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Učinak olova na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišajeva *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale i *Evernia prunastri* (L.) Ach

Marija Čuček

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lišajevi su kozmopolitski organizmi i izvrsni bioindikatori zagađenja zraka. Sposobni su bioakumulirati teške metale, a toksičnost metala ovisi o kemijskim i fizikalnim faktorima. Cilj istraživanja je bio odrediti osjetljivost vrsta *Evernia prunastri* (L.) Ach i *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale na izlaganje olovu te utvrditi kako pH vrijednost otopine (4 i 6) i vrsta otopine (destilirana voda ili Hoaglandova otopina), modificiraju učinak olova nakon 1., 7. i 14. dana. U obje vrste tretman olovom je snizio QY_{max} (maksimalni kvantni prinos fotosustava II) nakon 1., 7. i 14. dana, što ukazuje na smanjenu učinkovitost fotosinteze. U vrste *E. prunastri* Hoaglandova otopina smanjila je negativan učinak olova osobito pri pH vrijednosti 6, dok je u vrste *F. caperata* Hoaglandova otopina smanjila negativan učinak olova tek nakon 14. dana. U obje vrste lišajeva tretman olovom je uglavnom snizio koncentraciju klorofila *a* i klorofila *b* te karotenoida tek nakon 14 dana tretmana. Niži koeficijent feofitinizacije ukazuje na degradaciju klorofila *a* uslijed tretmana olovom. Hoglandova otopina smanjila je negativan učinak olova na pigmente ali u vrste *E. prunastri* to se očitovalo kod pH vrijednosti 6, a u vrste *F. caperata* pri pH vrijednosti 4. U obje vrste lišaja tretman olovom je povisio razinu lipidnih peroksida osobito pri pH vrijednosti 6. Hoaglandova otopina pH vrijednosti 6 smanjila je negativan učinak olova na oštećenje membrana. Na temelju rezultata može se zaključiti da su obje vrste lišaja osjetljive na tretman olovom osobito pri pH vrijednosti 6 što je posljedica bolje dostupnosti olova pri toj pH vrijednosti. U obje vrste prisutnost iona iz Hoaglandove otopine smanjila je negativan učinak olova ali je efikasnost ovisila o pH vrijednosti otopine koja je bila različita za svaku vrstu.

(63 stranice, 16 slika, 14 tablica, 48 literaturnih navoda, hrvatski jezik)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, olovo, teški metali, fotosinteza, pigmenti, lipidna peroksidacija, lišajevi
Voditelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.
Ocjenitelji: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof., Dr. sc. Ana Galov, izv. prof, Dr. sc. Sandra Hudina, doc., Dr.sc. Renata Šoštarić, doc.
Rad prihvaćen: 16. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The effect of lead on photosynthetic efficiency and pigments in the lichens *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale and *Evernia prunastri* (L.) Ach

Marija Čuček

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lichens are cosmopolitan organisms and great bioindicators of air pollution. They bioaccumulate heavy metals whose toxicity depends on chemical and physical factors. Aim of this research was to determine sensitivity of *Evernia prunastri* (L) Ach and *Flavoparmelia* caperata (L) Hale to lead exposure and to determine if changes in pH value (4 or 6) and solution composition (Hoaglnd solution or destilled water) modulate lead toxicity after 1., 7. and 14. days of exposure. Both species showed lower QY_{max} (the largest light quantum efficiency of photosystem II) when tretated with lead after 1., 7. and 14. days of exposure which indicates decrease in photosynthetic efficiency. Hoagland solution reduced negative effect of lead especially at pH value 6 in *E. prunastri*, while in *F. caperata* it reduced negative effect of lead only after 14. days of exposure. In both species lead treatment mainly decreased chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid concentrations only after 14. days of treatment. Decreased phaeophytinization coefficient indicates chlorophyll *a* degradation due to lead treatment. Hoagland solution decreased negative effect of lead on pigments, in *E. prunastri* at pH value 6 and in *F. caperata* at pH value 4. In both species lead tretment increased concentration of lipid peroxides especially at pH value 6. Hoagland solution at pH value 6 decreased negative effect of lead on membrane damage. These results confirmed sensitivity of both lichen species to lead treatment, most notably at pH value 6 when lead availability is the highest. In both species availability od ions from Hoagland solution decreased negative effect od lead, but it depended on the pH value of solution and was different for each lichen species.

(63 pages, 16 figures, 14 tables, 48 references, original in: Croatian language)
Thesis deposited in the Central Biological Library

Supervisor: Dr. sc. Mirta Tkalec, Prof.
Key words: *Flavoparmelia caperata*, *Evernia prunastri*, lead, heavy metals, photosyntesis, pigments, lipid peroxidation, lichens
Reviewers: Dr. sc. Mirta Tkalec, Prof., Dr. sc. Ana Galov, Prof.,Dr. sc. Sandra Hudina, Asst. Prof., Dr. sc.Renata Šoštarić, Asst. Prof.
Thesis accepted: February 16, 2017.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Što su lišajevi? 2
1.2. Lišajevi- bioindikatori zagađenja u okolišu 2
1.2.1. Teški metali u zraku i njihov utjecaj na lišajeve 4
1.3. Fotosinteza u lišajeva i utjecaj olova na njenu učinkovitost 5
1.4. Istraživani lišajevi 8
1.4.1. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale 8
1.4.2. *Evernia prunastri* (L.) Ach 9
1.5. Ciljevi istraživanja 10

2. MATERIJALI I METODE 11

2.1. Istraživani materijal 12
2.2. Kemikalije 13
2.3. Tretiranje olovom 14
2.4. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* 14
2.5. Ekstrakcija i određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata 16
2.6. Spektofotometrijsko određivanje lipidnih peroksida 17
2.7. Određivanje masa uzoraka 17
2.8. Statistička obrada podataka 18

3. REZULTATI 19

3.1. Fluorescencija klorofila *a in vivo* 20
3.1.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach 20
3.1.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale 22
3.2. Fotosintetski pigmenti 24
3.2.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach 24
3.2.1.1. Koncentracija klorofila *a* 24
3.2.1.2. Koncentracija klorofila *b* 27
3.2.1.3. Koncentracija ukupnih karotenoida 28
3.2.1.4. Koeficijent feofitinizacije 30
3.2.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale 32
3.2.2.1. Koncentracija klorofila *a* 32
3.2.2.1. Koncentracija klorofila *b* 34
3.2.2.2. Koncentracija ukupnih karotenoida 36
3.2.2.3. Koeficijent feofitinizacije 38
3.3. Razina lipidnih peroksida 40
3.3.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach. 40
3.3.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale 42

4. RASPRAVA 45

5. ZAKLJUČAK 56

6. LITERATURA 58

7.ŽIVOTOPIS 63

1. UVOD

1.1. Što su lišajevi?

Lišajevi su organizmi koje čine najmanje dva predstavnika različitih carstava, gljiva (mikobiont) i član koji može vršiti fotosintezu (fotobiont). U ulozi fotobionta možemo naći zelenu algu ili cijanobakteriju pa se on tada naziva fikobiont odnosno cijanobiont. Neki lihenolozi smatraju da je taj odnos parazitski, međutim mnogi podaci idu u prilog tome da je mutualistički. Fotobiont fotosintetizira i mikobionta opskrbljuje ugljikohidratima. U slučaju zelene alge to su šećerni alkoholi, a kada je u odnos uključena cijanobakterija, onda je to glukoza. Cijanobakterija mikobionta opskrbljuje i dušikom jer ga može fiksirati iz atmosfere (Purvis, 2010). Mikobiont iz podloge ili atmosfere apsorbira vodu i mineralne tvari, ali i štiti fotobionta od previsokog intenziteta svjetlosti. Simbiotski odnos članova lišajevima omogućuje da nastanjuju područja ekstremnih ekoloških uvjeta. Mogu se prilagoditi visokim i niskim temperaturnim ekstremima, suši, poplavi, visokom salinitetu, visokim koncentracijama onečišćivača zraka, područjima koja su siromašna mineralnim tvarima te onima zasićenim dušikom. Ipak, većina je lišajeva osjetljiva na promjene okoliša u kojem žive i koji je karakterističan za njihovu vrstu (Paoli i sur, 2014, Stamenković i sur, 2013).

1.2. Lišajevi - bioindikatori zagađenja u okolišu

Tolerancija lišajeva na jaki stres u okolišu odvaja ih od ostalih eukariota i omogućava im prisutnost na gotovo svim područjima Zemljine površine pa se često nazivaju „pioniri vegetacije“. Dominantni su živući oblici na njenih 8% površine, većinom u polarnim krajevima i na vrhovima planina. Neke vrste nastanjuju ekstremna područja i kratke periode povoljnih uvjeta iskorištavaju za svoj brzi rast. Međutim, većina ih je ipak spororastuća i dugoživuća pa bismo mogli reći da tijekom dužih perioda zadržavaju prilično nepromijenjenu morfologiju (Nash, 2008). Za razliku od vaskularnih biljaka koje odbacuju listove ili neke druge dijelove, kod lišajeva nema te pojave. Građeni su od četiri sloja. Površinu čini kora koju grade gljive i njihove hife isprepletene u debeli sloj tvoreći tkivo nazvano plektenhim. Hife ulaze u alge koje se nalaze u drugom, gonidijalnom sloju i iz njih crpe ugljikohidrate koje su alge proizvele fotosintezom. Srž lišaja čini mreža hifa i gljiva i ovdje dolazi do izmjene plinova. Zadnji je sloj izgrađen poput prvog, od hifa gljiva i sadrži rizoide kojima se lišaj pričvršćuje za podlogu (Nash, 2008). Široka geografska distribucija i sama građa lišajeva omogućuje da se pomoću

njih dokumentiraju i prate zagađenja na svim prostorima planete (Garty, 2001). S obzirom da nemaju voštanu kutikulu, lišajevi cijelom svojom površinom mogu apsorbirati onečišćivače iz atmosfere. Možda najbitnije od svega, sposobni su akumulirati mnoge elemente do koncentracije koja premašuje njihove fiziološke potrebe, a za to su razvili posebne mehanizme. Tvari iz onečišćenog zraka apsorbiraju intracelularno procesom izmjene iona i pohranjuju u obliku čestica koje su bogate teškim metalima (Nash, 2008). Toksičnost pohranjenog metala ovisi o kemijskim i fizikalnim faktorima, primjerice kemijskom obliku, količini, topivosti u vodi, pH vrijednosti i temperaturi (Bačkor i Loppi, 2009).

Zagađenje zraka trenutno je zajednički problem većine gradova u svijetu i svakim danom sve više utječe na ljudsko zdravlje i cijeli ekosustav. Povećana urbanizacija, industrijalizacija, povećanje broja stanovnika i sve veći promet utječu na smanjenje kvalitete zraka. U takvim prostorima sve je manje vegetacijskog pokrova što također pridonosi problemu. Zimi je zagađenje intenzivnije jer uz sve navedeno dolazi i do temperaturne inverzije i smanjuje se brzina vjetra pa onečišćivači bivaju zarobljeni blizu površine zemlje. Raznolikost epifitskih lišajeva i promjene njihovih fizioloških parametara služe za praćenje okolišnog stresa u urbanim područjima. Izlaganje onečišćivačima dovodi do brojnih promjena. Potiče produkciju etilena, djeluje na gubitak elektrolita zbog oštećenja staničnih membrani, smanjen je sadržaj ATP-a i intenzitet fotosinteze, fiksacije N_2, respiracije, a degradacija klorofila je povećana (Garty i sur, 2003). Svi ti fiziološki odgovori vrlo su korisni indikatori i pomažu da se nepovoljne promjene detektiraju vrlo brzo i prilično jeftino. Onečišćenje mijenja ekološke uvjete staništa koje određena vrsta lišaja nastanjuje pa može doći do njenog nestanka. Tako je primjerice u Indiji, točnije Kolkati, 1865. godine zabilježeno 53 vrste, a sada ih je samo 25 (Majumder i sur, 2012). Iako se u posljednje vrijeme kontrolira način i količina ispušnih plinova (CO, SO_2, NO_x) iz vozila, oni nisu u potpunosti eliminirani. Osim plinova problem predstavljaju i teški metali. To su elementi gustoće veće od 4 g/cm^3. Toksični su ili otrovni u vrlo niskim koncentracijama. Esencijalni teški metali potrebni su za pravilno funkcioniranje organizma, a to su Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Ni, Cr i Co. Uz njih postoje i neesencijalni u koje spadaju Cd, Pb, Hg, As i Sn (Duruibe i sur, 2007). Metali se oslobađaju sagorijevanjem goriva, kvarenjem motora i drugih dijelova automobila te raspadom automobilskih guma (Paoli i sur, 2012).

1.2.1. Teški metali u zraku i njihov utjecaj na lišajeve

Provedena su mnoga istraživanja na lišajevima koja su pokazala da su sposobni vrlo brzo bioakumulirati metale (Loppi i sur, 1999, Pirintsos i sur, 2006). Primjerice, Monnet i suradnici (2006) tretirali su lišajeve otopinom soli bakra, i već nakon nekoliko sati njegova koncentracija u talusu se zamjetno povećala. S druge strane, u pokusima gdje su korišteni transplantati talusa promjene koncentracije metala u atmosferi mogle su se zabilježiti praćenjem fizioloških procesa u lišaju tijekom nekoliko mjeseci (Walther i sur, 1990). Iako bi bilo za očekivati da će sadržaj teških metala s funkcijom vremena biti sve veći, to nije uvijek slučaj. On ponekada pada i raste unutar proučavanog vremenskog intervala. Do toga dolazi zbog fizioloških procesa u lišaju ili zbog ispiranja čestica zagađivača s površine talusa u kišnim periodima (Bergamaschi i sur, 2007). Veza između morfologije lišaja i nakupljanja metala još nije potpuno razjašnjena, ali zna se da krustozni lišajevi mogu pohraniti značajne količine metala, čak do nekoliko posto svoje suhe mase (Pawlik-Skowrońska i sur, 2006). Kod folioznih lišajeva nađene su više koncentracije pojedinih metala u središnjem dijelu, koji je njima bio dulje izložen, nego na perifernim dijelovima, međutim to nije slučaj u svih vrsta. Elementi koji su esencijalni za metabolizam (Co, Cu, Mo, Zn) zabilježeni su u većim koncentracijama na perifernom dijelu talusa jer je taj dio metabolički najaktivniji. Koncentracija onih koji imaju manju metaboličku značajnost (Al, Cd, Pb) veća je u centralnom dijelu.

Fotobiont i mikobiont različito su uključeni u akumulaciju metala. Mikobiont sadrži 90% ukupne biomase lišaja i akumulira većinu metala, posebice u hifama koje formiraju gornji korteks. Na akumulaciju metala utječu pH vrijednost i temperatura. Smanjena pH vrijednost može povećati topivost nekih metala pa se oni lakše oslobađaju iz čestica u zraku ili tlu. Također, proporcionalno porastu temperature raste akumulacija metala (Bačkor i Loppi, 2009). Onaj dio teških metala koji lišaju nije nužan za obavljanje fizioloških procesa može biti pohranjen u obliku oksalata pa na taj način ne izaziva toksične učinke (Sarret i sur, 1998). Osim toga, mikobiont izlučuje sekundarne metabolite. Do sada ih je nađeno više od 800. Djeluju kao kelatori i na sebe vežu katione uključujući one metalne, no zasada još nije dokazano da time štite fotobionta od toksičnog učinka. Kationi, uključujući teške metale, mogu se vezati za negativno nabijena područja u staničnoj stijenci mikobionta s vanjske

strane. U tu interakciju uključene su karboksilne, fosfatne, amino i hidroksilne skupine (Monnet i sur, 2005).

Fiziološki parametri koji se primjenjuju kod viših biljaka da bi se procijenila razina stresa uzrokovana teškim metalima, primjenjuju se i kod lišajeva. Najjednostavniji test kojim se ispituje jesu li membrane stanica mikobionta ostale očuvane jest kada dio talusa biva uronjen u deioniziranu vodu te se nakon toga mjeri električna provodljivost. Povećana prisutnost iona u otopini, posebice kalija, pokazuje oštećenje membrana, a time i razinu stresa kojem je mikobiont izložen (Marques i sur, 2005). Spojevi koji nastaju kao produkt lipidne peroksidacije odnosno oštećenja membrana, primjerice malondialdehid (MDA), koriste se u istu svrhu (Carreras i sur, 2003). Što se tiče učinka na fotobionta, u pojedinih vrsta lišaja pod utjecajem metala, primjerice nikla ili bakra, dolazi do plazmolize stanica fotobionta, a kod fotobionta *Trebouxia jamesii* dokazano je da može doći do promjene veličine stanice bubrenjem ili smanjenjem volumena (Paul i sur, 2004). S obzirom da fotobiont vrši fotosintezu, proces koji je osjetljiv na teške metale, praćenjem sadržaja i degradacije fotosintetskih pigmenata možemo ustanoviti razinu stresa. Degradacija klorofila izražava se koeficijentom feofitinizacije (klorofil *a* / feofitin *a*) koji u zdravih lišajeva iznosi 1.4, a u prisutnosti teških metala vrijednost je niža (Bačkor i Loppi, 2009).

1.3. Fotosinteza u lišajeva i utjecaj olova na njenu učinkovitost

Fotosinteza je proces u kojem djelovanjem energije Sunčevog zračenja dolazi do pretvorbe anorganskih tvari u organske spojeve. Svjetlosna energija se pretvara u kemijsku, a ugljikov dioksid iz atmosfere i voda tvore organske spojeve. Fotosintezu čine svjetlosne reakcije i biokemijske reakcije (Calvinov ciklus). U prvima dolazi do oksidacije vode i otpuštanja kisika, a u drugima do redukcije ugljikovog dioksida. Svjetlosnim reakcijama nastaju ATP i NADPH iz kojih se u konačnici sintetiziraju ugljikohidrati.

Sunčeva svjetlost je skup fotona različitih frekvencija. Fotone iz područja crvene i plave svjetlosti elektromagnetskog spektra organizmi iskorištavaju za fotosintezu. U lišajeva nalazimo klorofil *a*, klorofil *b* te karotenoide, a ukoliko je fotobiont cijanobakterija tada uz klorofil *a*, i karotenoide sadrže i fikobiline i fikoeritrine (Nash, 2008). Klorofil *a* maksimalno

apsorbira svjetlost valnih duljina 430 i 662 nm, a klorofil *b* valnih duljina 453 i 642 nm. Karotenoidi najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm i time proširuju spektar valnih duljina koje pokreću fotosintezu. Također, imaju zaštitnu ulogu u fotosintezi i štite organizam od fotooksidacije. U lišaja sama morfologija također pridonosi zaštiti od intenzivnog osvjetljenja. Naime, fotobiont se obično nalazi u sloju ispod kontraktilnog tkiva hifa, tako da samo dio svjetlosti koji dopire do površine talusa probija do fotobionta. Kada je lišaj u suhom stanju taj postotak svjetlosti iznosi 54-79 %, a u potpuno hidriranom stanju 24-54 % (Nash, 2008).

Spomenuti kolorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi nalaze se u tilakoidnim membranama. U tilakoidnim membranama postoje dva tipa fotosustava - fotosustav I i fotosustav II koji se sastoje od antenskog dijela te reakcijskog središta. Karotenoidi i molekule klorofila u antenskom dijelu apsorbiraju fotone i prevode energiju do reakcijskog središta. U reakcijskom središtu nalazi se klorofil *a* i primarni akceptor elektrona koji može primiti pobuđeni elektron od molekule klorofila *a*. U reakcijskom središtu fotosustava I nalazi se molekula klorofila *a* s maksimumom apsorpcije pri valnoj duljini 700 nm (tamno crvena svjetlost, naziva se P700), dok reakcijsko središte fotosustava II čini molekula klorofila *a* (P680) koja maksimalno apsorbira svjetlost valne duljine 680 nm (Pevalek-Kozlina, 2003). Transportni lanac elektrona povezuje reakcijska središta fotosustava I i fotosustava II. Pet proteinskih kompleksa (fotosustav II, kompleks citokrom $b_{6\text{-}f}$, fotosustav I, $NADP^+$ reduktaza i ATP-aza) zaslužni su za većinu kemijskih procesa koji čine svjetlosne reakcije fotosinteze. U svjetlosnim reakcijama postoje dva načina na koje se elektroni mogu prenijeti - ciklički i neciklički. Necikličkim tokom elektrona nakon osvjetljenja fotosustava I i II, nizom redoks sustava elektroni bivaju preneseni od vode do $NADP^+$ pri čemu nastaje NADPH i ATP i oslobađa se kisik. Cikličkim tokom elektrona stvara se dodatni ATP onda kada nema potrebe za NADPH, a u njega je uključen samo fotosustav I. Nakon što se u svjetlosnim reakcijama fotosinteze voda fotokemijski oksidira do molekularnog kisika i nastanu ATP i reducirani NADPH, slijedi Calvinov ciklus. U Calvinovom ciklusu ATP i NADPH služe kako bi se CO_2 ugradio u organske spojeve, reducirao do ugljikohidrata, odnosno saharoze ili škroba (Pevalek-Kozlina, 2003).

Na učinkovitost fotosinteze u lišaja dosta utječe sadržaj vode. Naime, lišaj apsorbira vodu cijelom svojom površinom i vodni potencijal uvelike utječe na njegov metabolizam.

Ukoliko je talus visoko dehidriran, lišaj je dormantan i nema izmjene CO_2 niti je moguća fotosinteza. Tek kada je sadržaj vode u lišaju 20%, stanice prelaze u gel stanje i počinje fotosinteza. U cijanolišajeva sadržaj vode mora biti čak 85 % da bi pokazali istu razinu fotosintetske aktivnosti. Ukoliko lišajevi žive pričvršćeni na stablu i talus im je razgranat slobodno u zraku kao u vrste *Usnea*, tada brzo gube vodu i brza je izmjena energije pa je i temperatura talusa jednaka temperaturi zraka kada su u suhom i mokrom stanju. Talus folioznih lišajeva ima deblji sloj koji ih štiti od gubitka vode (Nash, 2008).

Energija koju apsorbiraju molekule klorofila u lišaja, isto kao i u biljaka, može biti iskorištena u tri procesa. Može pokrenuti fotosintezu, osloboditi se u obliku topline ili se osloboditi u obliku fotona crvene svjetlosti što predstavlja fluorescenciju klorofila. Ta tri načina iskorištenja energije, međusobno su zavisni, primjerice, ukoliko se smanji neki od njih, druga dva će se povećati (Maxwell i Johnson, 2000). Mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo* možemo dobiti podatke o učinkovitosti fotosustava II. Fotosustav II je najskloniji oštećenjima pri različitim stresnim uvjetima tako da određivanjem fluorescencije klorofila *a in vivo* možemo dobiti pouzdanu informaciju o stanju fotosintetskog aparata odnosno o učinkovitosti procesa fotosinteze (Maxwell i Johnson, 2000). Izloženost lišajeva teškim metalima kao što su kobalt, olovo i bakar djeluje na sniženje maksimalnog prinosa fotosustava (Yiğittürk i sur, 2016, Garty i sur, 2001). Također, sadržaj i sastav fotosintetskih pigmenata jedan je od najosjetljivijih i najraširenijih parametara za procjenu stresa koji uzrokuju teški metali. Određeni metali oksidiraju metilne skupine na drugom pirolskom prstenu klorofila *a*, nastaje klorofil *b* i ukupni sastav klorofila (*a*+*b*) ostaje stabilan, no omjer klorofila *a*/*b* se smanjuje. Neki drugi metali pak smanjuju količinu klorofila *a* i klorofila *b* podjednako (Bačkor i Zetíková, 2003). Stres teškim metalima uzrokuje i degradaciju klorofila koju izražavamo već spomenutim koeficijentom feofitinizacije. (Bačkor i Loopi, 2009).

Izlaganje teškim metalima, posebno olovu, djeluje na povišenje produkcije reaktivnih kisikovih radikala (ROS), uključujući superoksidne radikale, hidroksilne radikale i hidrogen perokside (Verma i Dubey, 2003). Ukoliko su stanice fotobionta izložene visokim koncentracijama metala ne mogu učinkovito neutralizirati ROS pa ih oni oštećuju. Reaktivni kisikovi radikali mogu reagirati sa staničnim komponentama (lipidi, proteini, pigmenti, nukleinske kiseline) i uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje membrana, inaktivaciju enzima i na te načine utjecati na mnoge fiziološke procese kao i na vijabilnost stanice.

Fotosinteza je osjetljiva na količinu ROS-a zbog njihovog štetnog utjecaja na sastave dijelove fotosintetskog aparata. Oni djeluju na kloroplaste, uzrokuju strukturna oštećenja tilakoida, kvantitativne i kvalitativne promjene kompozicije pigmenata, promjene u kompoziciji lipida, mijenjaju aktivnost PSI i PSII te lanca prijenosa elektrona. Olovo inhibira fotosintezu tako da inhibira karboksilaznu aktivnost ribuloza-1, 5-bisfosfat karboksilaza oksigenaze (Rubisco), uzrokuje njegovu disocijaciju čime on postaje neaktivan. Olovo može utjecati na enzimatsku aktivnost, ili direktno tako da reagira s SH grupama, ili indirektno stvaranjem ROS-a koji zatim oksidiraju SH skupine proteina. Fotobionti mogu izbjeći toksični učinak teških metala, tako da brzo povećaju produkciju tiolnih peptida koji se nazivaju fitohelatini. Fitohelatini formiraju komplekse sa Cd, Pb i Zn i ti kompleksi mogu biti transportirani i akumulirani intracelularno. Drugi način obrane čine antioksidativni enzimi i proteini koji imaju funkciju šaperona. Primjerice neki od enzima mogu radikale superoksidnih aniona pretvoriti u hidrogen peroksid koji alge i biljke tada reduciraju u vodu (Alvarez i sur, 2012).

1.4. Istraživani lišajevi

Dvije vrste lišaje, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale i *Evernia prunastri* (L.) Ach pokazuju različitu osjetljivost na teške metale iz okoliša pa tako i na olovo (Lackovičová i sur, 2013).

1.4.1. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

Flavoparmelia caperata (L.) Hale je epifitski foliozni lišaj čiji talus može narasti od 5 do 20 cm u promjeru. Talus je zelenkasto- žute ili sivo- zelene boje i čine ga režnjevi širine 0,05 do 0,13 cm (slika 1). Donja strana talusa u sredini je crna, a prema rubnim dijelovima prelazi u smeđu boju. Gornji korteks sadrži usninsku kiselinu i atranorin, dok se u meduli nalaze protocetrarična i kaperatična kiselina. Ovaj lišaj živi na otvorenim staništima, najčešće na stablima (vrlo često hrast), grmovima, a ponekada i na kamenu. Rasprostranjen je diljem svijeta, u Južnoj i Sjevernoj Americi, Europi, Aziji i Africi (Nash, 2010). Velika površina talusa ovoj vrsti omogućuje dobru akumulaciju elemenata što je čini pogodnim kandidatom za istraživanje atmosferskog onečišćenja (Majumder, 2012). Također, široko je rasprostranjena

na područjima koja su istraživana u ovom diplomskom radu. *F.caperata* neutrofilna je i nitrofilna vrsta tolerantna na povišenu razinu dušika (http://mason.gmu.edu/~jlawrey/CUE/sensitivity) nastalu oslobađanjem ispušnih plinova iz automobila i od strane industrije.



Slika 1. Vrsta *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. Preuzeto i prilagođeno prema: http://lichenportal.org/imglib /lichens/CNALH/201602/Flavoparmelia_caperata_De.JPG

1.4.2. *Evernia prunastri* (L.) Ach

Evernia prunastri (L.) Ach fruktikozni je lišaj koji pripada porodici Parmeliaceae kao i prethodna vrsta. Talus ove vrste čine dihotomski razganjeni ogranci, kojih može biti manje ili više, a širina im se kreće između 0,5 do 3 mm (slika 2). Gornja površina lišaja je zelenkasto-siva ili blijedo zeleno-žute boje. Ukoliko je lišaj star ili oštećen, izblijedio je i sivkaste je boje. Donja površina talusa obojena je poput gornje ili je nešto svjetlija. Sekundarni metaboliti ove vrste su usninska kiselina, atranorin, kloratranorin i everična kiselina. *E. prunastri* najčešće obitava na neutralnoj ili kiseloj kori hrasta ili nekog drugog listopadnog stabla. Većinom nastanjuje područja koja su vlažna, osunčana i često vjetrovita. Nalazimo je na nižim nadmorskim visinama, no ponekad može nastaniti i više (do 1675 m) (Nash, 2001). Ova vrsta je široko rasprostranjena na području Slavonije i utjecaj teških metala na nju prilično je

dobro istražen u mnogim studijama pa sam je zato koristila prilikom svog pokusa. *E. prunastri* acidofilna je vrsta (Spier i sur, 2010) osjetljiva na dušik i teške metale prisutne u zagađenom okruženju (Lackovičová i sur, 2013).



Slika 2. Vrsta *E. prunastri*. Fotografirao: Marko Doboš

1.5. Ciljevi istraživanja

Zbog svojih brojnih karakteristika lišajevi su izvrsni bioindikatori onečišćenja okoliša. Različita osjetljivost pojedine vrste omogućuje praćenje koncentracije onečišćivača u okolišu. Cilj ovog rada bio je:

- ustanoviti osjetljivost vrsta *E. prunastri* i *F. caperata* na izlaganje olovu praćenjem učinkovitosti fotosinteze, određivanjem koncentracije fotosintetskih pigmenata te razine lipidnih peroksida,
- utvrditi kako pH vrijednost (4 i 6) otopine i vrsta otopine (destilirana voda ili Hoaglandova otopina), kojom se lišajevi prskaju, modificiraju učinak olova nakon 1., 7. i 14. dana

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Istraživani materijal

Istraživanje sam provela na dvije vrste lišajeva - *Evernia prunastri* (L.) Ach i *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale. Uzorci su sakupljeni krajem ožujka 2016. godine u blizini Požege na staništu bez poznatog onečišćenja. Nakon uzorkovanja lišajevi su stavljeni u kartonsku kutiju kako bi se što manje isušili prije nego što budu dopremljeni u laboratorij gdje sam nastavila pokus. Uzorci *E. prunastri* sakupljani su u napuštenom voćnjaku s kore ili zajedno s grančicama, ukoliko se na terenu nisu mogli odvojiti. Prvi korak u laboratoriju bio je odvojiti lišajeve od kore i potpuno ih očistiti od svih stranih materijala. Vrsta *F. caperata* sakupljana je u šumi zajedno sa korom te sam i kod te vrste najprije morala potpuno očistiti uzorke. Nakon što sam uzorke očistila, izabrala sam lišajeve što sličnijeg oblika talusa i podjednakih masa. Mase su se kretale između 0,09 i 0,2 g. Kod vrste *F. caperata* pazila sam da uzorci sadrže dio talusa koji je mlađi, odnosno onaj koji se nalazi oko 1 cm uz rub lišaja. Time sam osigurala da svi uzorci budu podjednako metabolički aktivni (Bjerke i sur. 2004, 2005). Lišajevi su zatim smješteni na mrežice učvršćene na petrijevim posudama čije sam dno prethodno prekrila s nekoliko slojeva filter papira natopljenog destiliranom vodom (slika 3).



Slika 3. Uzorci vrste *E. prunastri* smješteni na aklimatizaciju u klima-komoru na mrežice učvršćene na petrijeve posude.

Petrijeve posudice su stavljene na aklimatizaciju u klima-komoru tijekom 3 dana kako bi se uzorci prilagodili uvjetima u kojima će se odvijati pokus. Uvjeti u klima komori su bili 16 h svjetla (60 µmol fotona m^2 s^{-1}) i 8 h tame uz temperaturu 22 ± 2 °C. Nakon aklimatizacije uzorci su tretirani olovom.

2.2. Kemikalije

U istraživanju sam koristila kemikalije proizvođača Kemika: $(NH_4)_2H_2PO_4$, KNO_3, $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$, $MgSO_4 \times 7H_2O$, KH_2PO_4, H_3BO_3, $MnCl_2 \times 4H_2O$, $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $NaMoO_4 \times 2H_2O$, $MgCO_3$ i trikloroctena kiselina (TCA) te proizvođača Sigma: Fe-Na-EDTA, dimetil sulfoksid (DMSO), tiobarbituratna kiselina (TBA). Uzorke sam prskala deioniziranom vodom ili 1/10 Hoaglandovom otopinom (tablica 1) čiju sam pH vrijednost prilagodila pomoću HCl i NaOH otopina. Prilikom pripravljanja otopine olova koristila sam spoj $Pb(NO_3)_2$.

Tablica 1. Sastav Hoaglandove otopine za pripremu 1 L otopine (Hoagland i Arnon, 1950).

Volumen (ml)	Koncentracija matične otopine	Spoj
0.5	1 M	$(NH_4)_2H_2PO_4$
6	1 M	KNO_3
4	1 M	$Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$
2	1 M	$MgSO_4 \times 7H_2O$
0.5	1 M	KH_2PO_4
1	0.75 %	Fe-Na-EDTA
1	2.86 g 1.81 g 0.22 g 0.089 g 0.039 g	H_3BO_3 $MnCl_2 \times 4H_2O$ $ZnSO_4 \times 7H_2O$ $CuSO_4 \times 5H_2O$ $NaMoO_4 \times 2H_2O$
	do 1 L	destilirana H_2O

2.3. Tretiranje olovom

Nakon aklimatizacije uzorke lišajeva sam podijelila u dvije skupine. Jednu sam uronila, u trajanju od pola sata, u otopinu olova koncentracije 20 mM i pH vrijednosti 4, a drugu u otopinu olova iste koncentracije, ali pH vrijednosti 6. Lišajeve koji su mi služili kao kontrola, uronila sam u vodu odgovarajuće pH vrijednosti, odnosno pH 4 i pH 6. Tijekom daljnjeg trajanja pokusa dio lišajeva iz svake skupine prskala sam destiliranom vodom odgovarajuće pH vrijednosti, dok sam drugi dio prskala 1/10 Hoaglandove otopine odgovarajuće pH vrijednosti. Prskala sam ih dva puta dnevno, od čega sam ih jednom prskala destiliranom vodom odgovarajuće pH vrijednosti, a drugi put je dio lišajeva prskan 1/10 Hoaglandove otopine. Provela sam tri uzorkovanja. Prvo nakon 1., drugo nakon 7. i treće nakon 14. dana (tablica 2). Tretmani su bili jednaki za obje vrste.

Tablica 2. Opis tretmana. Uzorci su bili podijeljeni u 8 grupa. Dio je bio uronjen pola sata u otopinu olova koncentracije 20 mM i pH vrijednosti 4, a dio u otopinu olova iste koncentracije, ali pH vrijednosti 6. Kao kontrola korišteni su lišajevi uronjeni u vodu odgovarajuće pH vrijednosti. Tijekom pokusa uzorci su bili prskani medijem odgovarajuće pH vrijednosti, a medij je bio ili Hoaglandova otopina ili destilirana voda. Lišajevi su uzorkovani u tri vremenske točke, nakon 1., 7. i 14. dana.

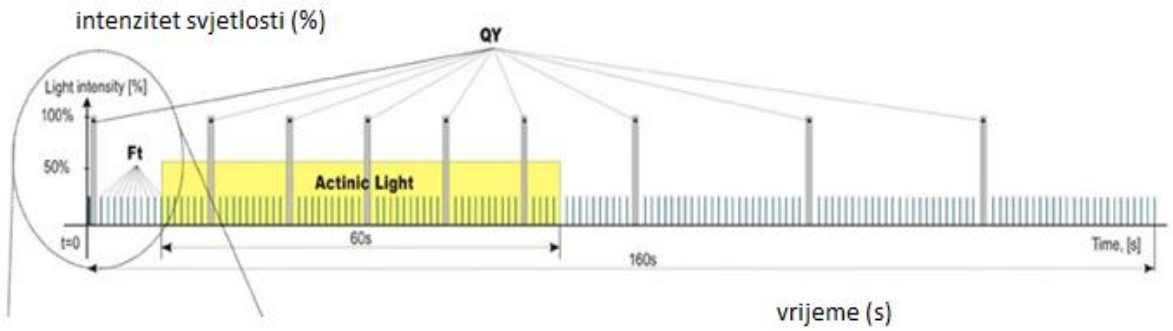
Tretman	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
pH	4	4	6	6	4	4	6	6
medij	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	Hoaglandova otopina	Hoaglandova otopina	Hoaglandova otopina	Hoaglandova otopina
Pb	+	-	+	-	+	-	+	-

Nakon svakog uzorkovanja izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a in vivo* te odredila fluorescencijske parametre (Lichethaler i sur, 2005.). Zatim sam uzorke sušila u liofilizatoru te usitnila kako bih iz njih ekstrahirala klorofile i spektrofotometrijski odredila udio lipidnih peroksida. Svi uzorci mjereni su u 5 ili 6 replika.

2.4. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo*

Prije samog mjerenja fluorescencije uzorke sam poprskala odgovarajućom otopinom i stavila u tamu na 30 minuta. Za mjerenje fluorescencije klorofila a *in vivo* koristila sam uređaj FluorPen fluorimetar i pripadajuća uputstva (FluorPen Manual and User Guide, 2015).

Talus svakog lišaja smjestila sam u „kvačicu“ koju sam pričvrstila na fluorimetar. Najbitnije je bilo lišajnim materijalom prekriti otvor kroz koji prolazi snop svjetlosti. Na fluorimetru sam odabrala protokol koji omogućuje mjerenje OY_{max} (maksimalni kvantni prinos fotosustava II). U tom protokolu definirani su parametri aktiničkog i saturacijskog svjetla. Za prvi iznose 30%, a za drugi 70%. Mjerenje po tom protokolu počinje obasjavanjem talusa lišaja svjetlošću niskog intenziteta i tada uređaj zabilježi minimalnu fluorescenciju (F_0). Nakon toga slijedi osvjetljenje kratkim saturacijskim pulsom koji smanjuje „pool“ plastokinona i bilježi se maksimalna fluorescencija u tami (F_m). Zatim se uzorak izlaže kratkom aktiničkom zračenju u trajanju od nekoliko desetaka do nekoliko stotina sekundi kako bi se izazvao kratkotrajan Kautsky-jev efekt odnosno pad intenziteta fluorescencije do ujednačene vrijednosti F_t zbog pokretanja fotokemijskih reakcija. Na kraju ponovno slijedi osvjetljavanje saturacijskim pulsom i biva zabilježena vrijednost kvantni prinos fotosustava II (quantum yield - QY) u uvjetima svjetla. Nakon izlaganja kontinuiranom osvjetljenju slijedi faza oporavka pomoću saturacijskih pulseva u tami (slika 4).



Slika 4. Prikaz postupka mjerenja parametra QY_{max} pomoću uređaja FluorPen, sa označenim intenzitetom svjetlosti na y osi u određenom vremenskom intervalu koji je naznačen na x osi grafa. Preuzeto i prilagođeno prema FluorPen Manual and User Guide, 2015.

Nakon mjerenja, na računalu sam pokrenula program koji je povezan sa FluorPen fluorimetrom kako bih prenijela dobivene podatke i očitala dobivene vrijednosti. Uređaj Fluorpen određuje vrijednosti fluorescencijskih parametara prema formulama (FluorPen Manual and User Guide, 2015):

$QY_{max} = F_v/F_m$

$F_v = F_m - F_0$

QY_{max} = maksimalni kvantni prinos fotosustava II
F_0 = prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame
F_m =maksimalni prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame dobiven tijekom saturacijskog pulsa
F_v = varijabilna fluorescencija

2.5. Ekstrakcija i određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Prije ekstrakcije i određivanja koncentracije fotosintetskih pigmenata uzorke sam osušila u liofilizatoru (Alfa 1-2, Christ, Njemačka). Od svakog uzorka najprije sam izvagala 20 mg usitnjenog talusa. Nakon što sam usitnjeni materijal stavila u tubice za centrifugiranje, dodala sam 1,5 ml DMSO i na vrhu spatule $MgCO_3$. Tako pripravljene uzorke sam vorteksirala, a zatim stavila na inkubaciju 40 minuta pri 60 °C. Nakon inkubacije, homogenate sam centrifugirala pri sobnoj temperaturi, 10 minuta na 20 000 g. Supernatant , u kojem se nalaze fotosintetski pigmenti, prelila sam u prethodno označene čiste tubice. Pripremljene ekstrakte koristila sam za mjerenje klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida i računanje koeficijenta feofitinizacije (FC). Uzorke sam prelila u staklenu kivetu te pomoću spektrofotometra odredila apsorbanciju pri valnim duljinama od 415, 435, 480, 649 te 665 nm. Koncentraciju fotosintetskih pigmenata odredila sam prema formulama (Kranner i sur, 2002):

a) Za klorofil *a*: $c_a = \frac{12{,}19x\ \mathrm{A665} - 3{,}45x\ \mathrm{A649}}{m\ x\ 1000}$
b) Za klorofil *b*: $c_b = \frac{21{,}99x\ \mathrm{A649} - 5{,}32\ x\ \mathrm{A665}}{m\ x\ 1000}$
c) Za ukupne karotenoide: $c_k = \frac{(1000\ x\ \mathrm{A480} - 2{,}14\ x\ \mathrm{ca} - 70{,}16\ \mathrm{x\ cb})/\ 220}{m\ x\ 1000}$
d) Koeficijent feofitinizacije: $FC = \frac{\mathrm{A435}}{\mathrm{A415}}$

c_a = sadržaj klorofila *a* (mg/g suhe tvari)
c_b = sadržaj klorofila *b* (mg/g suhe tvari)
c_k = sadržaj karotenoida (mg/g suhe tvari)
FC = koeficijent feofitinizacije
$A_{480/665/649/435/415}$ = apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama
m = masa uzorka

2.6. Spektofotometrijsko određivanje lipidnih peroksida

Razinu lipidnih peroksida odredila sam spektrofotometrijski prema prilagođenoj metodi Majumder i suradnici (2012). Izvagala sam 50 mg talusa lišaja koji sam potom homogenizirala u tarioniku sa 1 ml 0,1%-tne (w/v) trikloroctene kiseline (TCA). Sadržaj sam prebacila u tubice te sonificirala 15-ak minuta. Zatim sam uzorke centrifugirala 20 minuta na sobnoj temperaturi (24 °C) i 12 000 g. U staklene epruvete stavila sam 0,5 ml uzorka i dodala 1,5 ml 0,6%-tne tiobarbituratne kiselina (TBA) u 10% TCA. Uzorke sam nakon toga stavila u sušionik 30 minuta na 95 °C. Nakon što sam ih izvadila, naglo sam ih ohladila u hladnjaku 10-ak minuta. Na spektrofotometru sam izmjerila apsorbanciju pri valnim duljinama 532 i 600 nm. Kao slijepu probu sam koristila reagens kojim sam ekstrahirala uzorke. Lipidni peroksidi, među kojima je najzastupljeniji malondialdehid (MDA) reagiraju s TBA i daju mjerljivo obojenje te se smatraju pouzdanim indikatorom oksidacijskog oštećenja, odnosno lipidne peroksidacije. Apsorbanciju sam mjerila na 600 nm zbog nespecifične zamućenosti, od toga sam oduzela apsorbanciju pri 532 nm. Razinu lipidnih peroksida izrazila sam u nmol po gramu suhe tvari (nmol/g_{st}) koristeći ekstincijski koeficijent za MDA (ε = 157 $mM^{-1}\,cm^{-1}$) prema formuli (Hodges i sur. 1998):

$$\text{MDA} = \frac{(A_{532} - A_{600}) \ /157\,000 \times 10^{6}}{m \times 1000}\ [\text{nmol}/g_{st}]$$

MDA - udio malondialdehida (nmol/g_{st})
$A_{532/600}$ - apsorbancija pri 532, 600 nm
m - masa suhe tvari (g_{st})

2.7. Određivanje masa uzoraka

Prije tretmana svim uzorcima sam izvagala masu u suhom stanju. Nakon što je završio neki od 8 tretmana, uzorci su ostavljeni u liofilizatoru (Alfa 1-2, Christ, Njemačka) otprilike 24 sata pri temperaturi -65 °C i tlaku 0,05 mbara kako bi se u potpunosti osušili. Nakon toga izvagala sam suhu masu uzorka.

2.8. Statistička obrada podataka

Rezultate istraživanja prikazala sam u računalnom programu Microsoft office Excel 2007 i Statistica 13.1. Dobivene vrijednosti najprije sam izrazila u postotku od kontrole i zatim prikazala grafički kao srednju vrijednost 5 ili 6 replika po tretmanu ± standardna pogreška. Provela sam faktorijalnu analizu varijance kako bih ustanovila koji čimbenici ili njihove kombinacije utječu na uzorke prilikom pojedinog mjerenja. Zatim sam provela analizu varijance (one-way ANOVA), a koristeći Fisher's LSD test za svaki pojedini pokazatelj utvrdila sam koji se uzorci značajno razlikuju na razini $p \leq 0,05$. U slučaju značajnije razlike rezultatima sam na grafu pridružila različita slova.

3. REZULTATI

Statističkom analizom prirasta masa dobila sam rezultate koji su pokazali da uopće nije bilo prirasta tijekom pokusa pa taj pokazatelj nisam prikazala u rezultatima.

3.1. Fluorescencija klorofila *a in vivo*

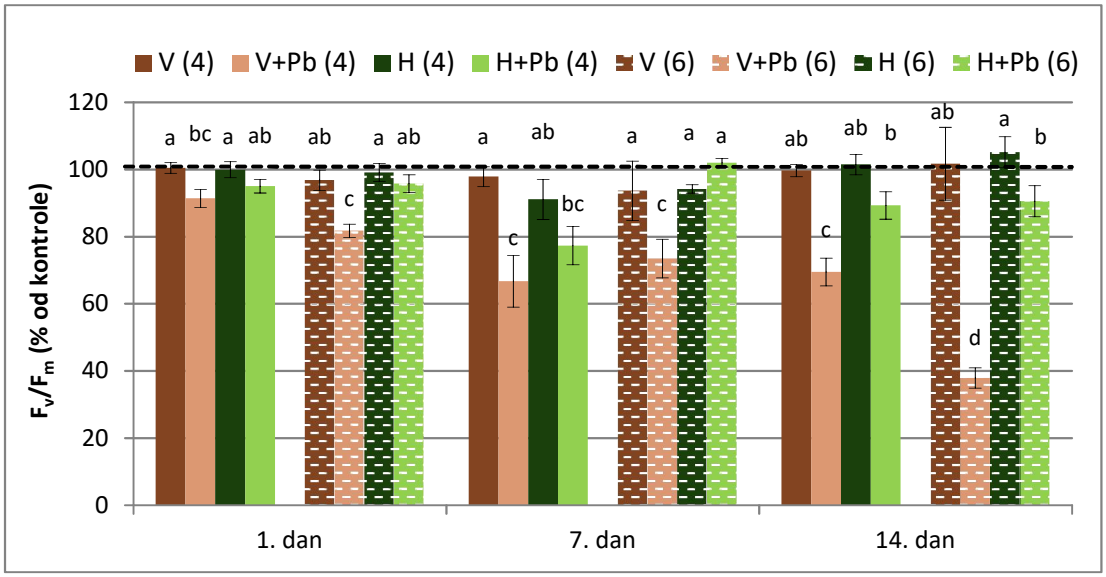
3.1.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach

Zbog velikog broja čimbenika navesti ću samo one za koje je faktorijalna analiza varijance pokazala da statistički značajno utječu na mjereni pokazatelj. Kod vrste *E. prunastri* maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) nakon 1. i 7. dana značajno ovisi o mediju i olovu. I kombinacija tih dvaju čimbenika prilikom oba uzorkovanja utječe na QY_{max}. Utjecaj medija, olova i njihove kombinacije značajan je i nakon 14. dana. U lišaja uzorkovanih nakon 14. dana, osim spomenutih čimbenika, na QY_{max} utječe i pH vrijednost u kombinaciji s medijem te u kombinaciji s olovom. Sva tri čimbenika zajedno (medij, olovo, pH vrijednost) također pokazuju statistički značajan utjecaj na QY_{max} (tablica 3).

Tablica 3. Faktorijalna analiza varijance napravljena za maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastri* (L.). Faktori koji značajno utječu na QY_{max} podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	***medij***	***284,1***	***8,76***	***0,005144***
	pH	131,4	4,05	0,050866
	olovo	***789,2***	***24,35***	***0,000015***
	medij*pH	131,4	4,05	0,050866
	medij*olovo	***188,0***	***5,80***	***0,020749***
	pH*olovo	14,6	0,45	0,506051
	medij*pH*olovo	42,5	1,31	0,259130
7. dan	***medij***	***814,7***	***4,183***	***0,047447***
	pH	691,4	3,550	0,066819
	olovo	***2467,0***	***12,667***	***0,000977***
	medij*pH	475,3	2,440	0,126138
	medij*olovo	***1546,9***	***7,943***	***0,007470***
	pH*olovo	789,2	4,052	0,050874
	medij*pH*olovo	84,9	0,436	0,512860
14. dan	***medij***	***4417,4***	***29,406***	***0,000003***
	pH	441,0	2,936	0,094578
	olovo	***10673,7***	***71,054***	***0,000000***
	medij*pH	***866,5***	***5,768***	***0,021184***
	medij*olovo	***3315,9***	***22,074***	***0,000032***
	pH*olovo	***946,7***	***6,302***	***0,016319***
	medij*pH*olovo	***716,7***	***4,771***	***0,035015***

Jednosmjerna analiza varijance pokazala je značajno smanjenje QY_{max} nakon 1. dana tretmana olovom i prskanja destiliranom vodom pH vrijednosti 4 i 6 u usporedbi s onim uzorcima koji su prskani samo destiliranom vodom odgovarajućeg pH. Kombinacija olova i Hoaglandove otopine pri obje pH vrijednosti nije pokazala značajan učinak na ovaj parametar. Nakon 7. dana tretman olovom i destiliranom vodom pri obje pH vrijednosti i dalje je utjecao na smanjenje QY_{max}. Kod uzoraka tretiranih olovom i Hoaglandovom otopinom kod obje pH vrijednosti nije bilo statistički značajne razlike s obzirom na kontrolne skupine koje nisu bile tretirane olovom. Trend snižavanja QY_{max} u uzoraka tretiranih olovom i prskanih destiliranom vodom, nastavio se i nakon 14. dana. Učinak olova bio je veći u lišaja koji su prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6 , nego u lišaja prskanih vodom pH vrijednosti 4. Što se tiče lišaja koji su bili izloženi olovu i Hoaglandovoj otopini, statistički značajno smanjenje mjerenog parametra zabilježila sam samo kod pH vrijednosti 6 (slika 5).



Slika 5. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II ($QY_{max}=F_v/F_m$), izražen kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.1.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

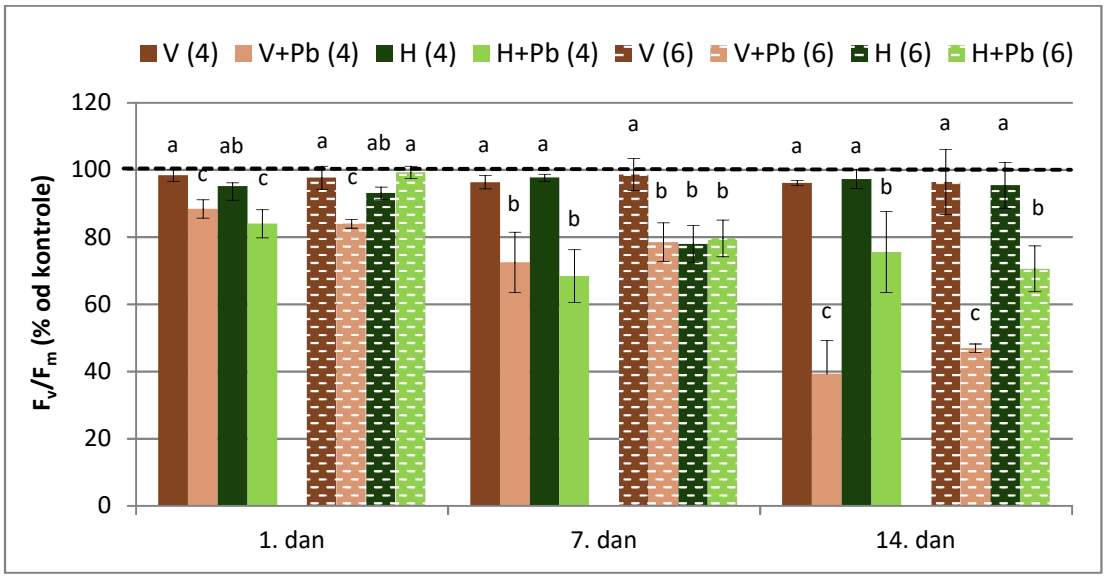
Faktorijalna analiza varijance za vrstu *F. caperata* za maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) pokazala je značajan učinak olova nakon prvog dana tretmana. Osim olova, kombinacija medija i pH te kombinacija sva tri čimbenika utjecala je na QY_{max}. Nakon 7 dana vidljiv je značajan utjecaj pH vrijednosti te kombinacija pH vrijednosti i medija. Analiza nakon 14 dana pokazala je da medij i olovo, utječu na QY_{max} svaki zasebno, ali i u kombinaciji (tablica 4).

Tablica 4. Faktorijalna analiza varijance napravljena za maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *F. caperata*. Faktori koji značajno utječu na QY_{max} podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	7,1	0,21	0,650327
	pH	48,6	1,43	0,238987
	olovo	***604,4***	***17,80***	***0,000142***
	medij*pH	***247,7***	***7,29***	***0,010184***
	medij*olovo	***255,1***	***7,51***	***0,009196***
	pH*olovo	136,1	4,01	0,052275
	medij*pH*olovo	***327,1***	***9,63***	***0,003548***
7. dan	medij	0,0	0,000	0,990182
	pH	***4102,1***	***25,656***	***0,000010***
	olovo	359,0	2,245	0,142056
	medij*pH	***721,2***	***4,511***	***0,040075***
	medij*olovo	205,3	1,284	0,264065
	pH*olovo	125,4	0,784	0,381328
	medij*pH*olovo	420,8	2,632	0,112788
14. dan	***medij***	***2519,3***	***8,8167***	***0,005214***
	pH	0,9	0,0032	0,955219
	olovo	***16311,8***	***57,0859***	***0,000000***
	medij*pH	150,6	0,5270	0,472451
	medij*olovo	***2488,7***	***8,7096***	***0,005466***
	pH*olovo	12,6	0,0442	0,834576
	medij*pH*olovo	76,6	0,2682	0,607630

Jednosmjerna analiza varijance pokazala je da je već nakon prvog dana tretman olovom u kombinaciji s vodom pri obje pH vrijednosti djelovao na smanjenje QY_{max} u usporedbi s pripadajućim kontrolnim skupinama. Kombinacija olova i Hoaglandove otopine pri pH vrijednosti 6 nije imala značajan utjecaj dok je pri pH vrijednosti 4 uočeno smanjenje mjerenog parametra. Nakon 7. dana kod lišajeva tretiranih olovom i destiliranom vodom QY_{max} je i dalje bio niži nego kod pripadajućih kontrolnih skupina i to kod obje pH vrijednosti. Također tretman olovom u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pri pH 4 statistički je značajno snizio QY_{max} u odnosu na kontrolnu skupinu dok pri pH 6 nije bilo značajne razlike s obzirom na kontrolnu skupinu. Uspoređujući lišajeve koji su prskani samo Hoaglandovom otopinom QY_{max} je bio statistički značajno niži pri pH vrijednosti 6. Također vrijednosti su bile niže u odnosu na lišajeve prskane destiliranom vodom pH vrijednosti 6. Na kraju pokusa (nakon 14. dana) najniži QY_{max} imali su lišajevi tretirani olovom i destiliranom vodom pri obje

istraživane pH vrijednosti. Tretmani kombinacijom olova i Hoaglandove otopine pri obje pH vrijednosti imali su nešto viši QY_{max} (slika 6), ali su njegove vrijednosti bile značajno više od onih izmjerenih u kontrolnih lišajeva prskanih Hoaglandovom otopinom.



Slika 6. Maksimalni kvantni prinos fotosustava (QYmax=Fv/Fm), izražen kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.2. Fotosintetski pigmenti

3.2.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach

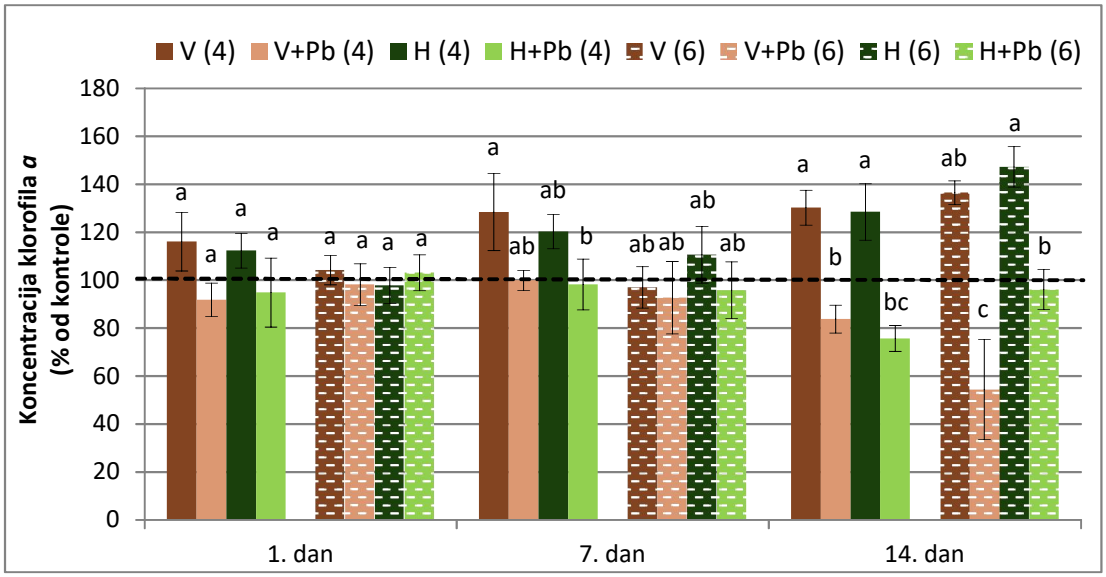
3.2.1.1. Koncentracija klorofila *a*

Faktorijalnom analizom varijance dobila sam rezultate koji ne pokazuju značanije razlike između tretmana nakon prvog dana. Sedmog dana značajan utjecaj na koncentraciju klorofila *a* imalo je olovo. Četrnaesti dan, osim olova, utjecala je i kombinacija medija i pH vrijednosti (tablica 5).

Tablica 5. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentracije klorofila *a* s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastri*. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju klorofila *a* podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	3,744	0,007	0,936
	pH	104,943	0,182	0,672
	olovo	1344,116	2,337	0,134
	medij*pH	0,352	0,001	0,980
	medij*olovo	242,339	0,421	0,520
	pH*olovo	1259,553	2,190	0,147
	medij*pH*olovo	15,609	0,027	0,870
7. dan	medij	36,859	0,047	0,830
	pH	1923,493	2,447	0,126
	olovo	***3650,773***	***4,644***	***0,037***
	medij*pH	526,624	0,670	0,418
	medij*olovo	12,082	0,015	0,902
	pH*olovo	737,620	0,938	0,339
	medij*pH*olovo	216,949	0,276	0,602
14. dan	medij	1365,020	2,165	0,149
	pH	192,990	0,306	0,583
	olovo	***40532,041***	***64,288***	***0,000***
	medij*pH	***2918,708***	***4,629***	***0,038***
	medij*olovo	455,136	0,722	0,401
	pH*olovo	866,471	1,374	0,248
	medij*pH*olovo	1039,876	1,649	0,206

Jednosmjerna analiza varijance za prvi dan pokazala je da nema statistički značajne razlike u koncentraciji klorofila *a* između tretmana. Nakon sedam dana značajna razlika uočena je samo između lišajeva tretiranih olovom i Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 4 te onih koji su bili prskani destiliranom vodom iste pH vrijednosti. Nakon 14. dana tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom značajno je snizio koncentraciju klorofila *a*, a značajno veće sniženje uočila sam pri pH vrijednosti 6. Tretman olovom u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom također je djelovao na sniženje koncentracije klorofila *a* i to slično pri obje pH vrijednosti. Međutim, lišajevi tretirani olovom u kombinaciji s Hoaglandovim medijem pH vrijednosti 6 imali su višu koncentraciju klorofila *a* nego oni tretirani olovom u kombinaciji s vodom (slika 7).



Slika 7. Koncentracija klorofila *a*, izražena kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.2.1.2. Koncentracija klorofila *b*

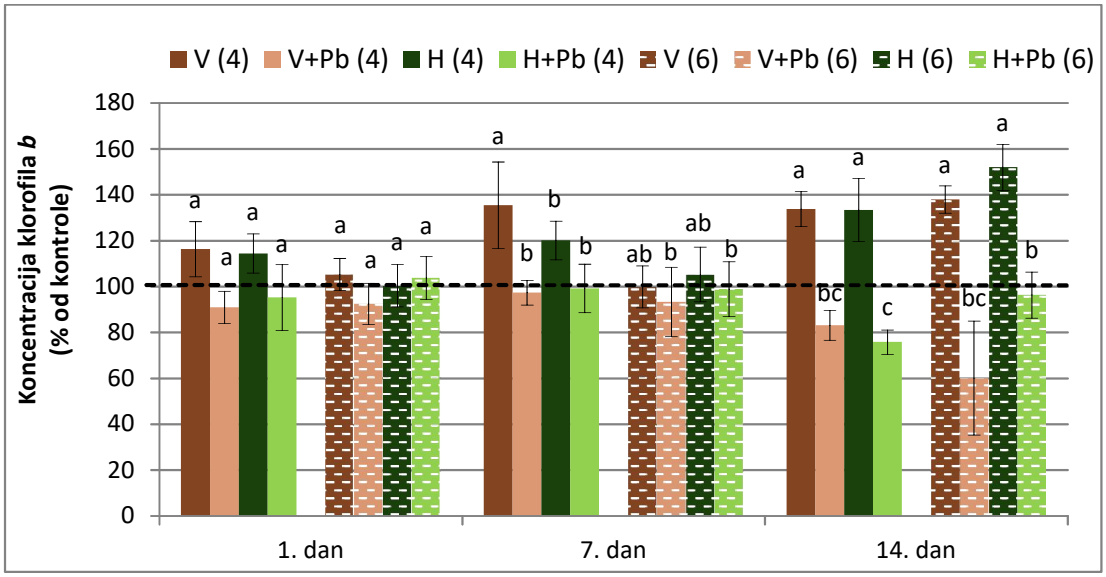
Obradom podataka faktorijalnom analizom varijance uočila sam da 1. dan nije bilo značanog utjecaja tretmana na koncentraciju klorofila *b*. Nakon 7. i 14. dana olovo je imalo značajan utjecaj na koncentraciju klorofila *b* (tablica 6).

Tablica 6. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentraciju klorofila *b* s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *Evernia prunastri* (L.) Ach. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju klorofila *b* su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	58,416	0,088	0,768
	pH	167,695	0,253	0,618
	olovo	2188,492	3,301	0,077
	medij*pH	12,933	0,020	0,890
	medij*olovo	368,316	0,555	0,460
	pH*olovo	919,689	1,387	0,246
	medij*pH*olovo	73,217	0,110	0,741
7. dan	medij	4,570	0,005	0,943
	pH	2254,286	2,520	0,120
	olovo	***3893,244***	***4,352***	***0,043***
	medij*pH	453,367	0,507	0,481
	medij*olovo	223,686	0,250	0,620
	pH*olovo	1596,148	1,784	0,189
	medij*pH*olovo	218,168	0,244	0,624
14. dan	medij	1354,994	1,524	0,224
	pH	311,958	0,351	0,557
	olovo	***43840,833***	***49,320***	***0,000***
	medij*pH	2514,946	2,829	0,100
	medij*olovo	174,615	0,196	0,660
	pH*olovo	480,545	0,541	0,466
	medij*pH*olovo	635,082	0,714	0,403

Jednosmjerna analiza varijance pokazala je da nakon 1. dana nije bilo značajne razlike između tretmana. Nakon 7. dana koncentracija klorofila *b* smanjila se u uzoraka tretiranih olovom pri pH vrijednosti 4 i prskanih vodom pripadajućeg pH u odnosu na kontrolnu skupinu. Isti tretman pri pH vrijednosti 6 nije imao utjecaja. Tretmani koji su uključivali olovo i Hoaglandovu otopinu nisu imali značajan utjecaj na koncentraciju klorofila *b*. Međutim lišajevi koji su tretirani Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 4 imali su značajno nižu

koncentraciju klorofila *b* od onih koji su bili prskani destiliranom vodom iste pH vrijednosti. Nakon 14. dana tretmani olovom i u kombinaciji s vodom i u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom značajno su snizili koncentraciju klorofila *b* u odnosu na kontrolne skupine koje nisu bile tretirane olovom. Olovo u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 4 uzrokovalo je značajno sniženje koncentracije klorofila *b* u odnosu na pH vrijednost 6 (slika 8).



Slika 8. Koncentracija klorofila *b*, izražena kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.2.1.3. Koncentracija ukupnih karotenoida

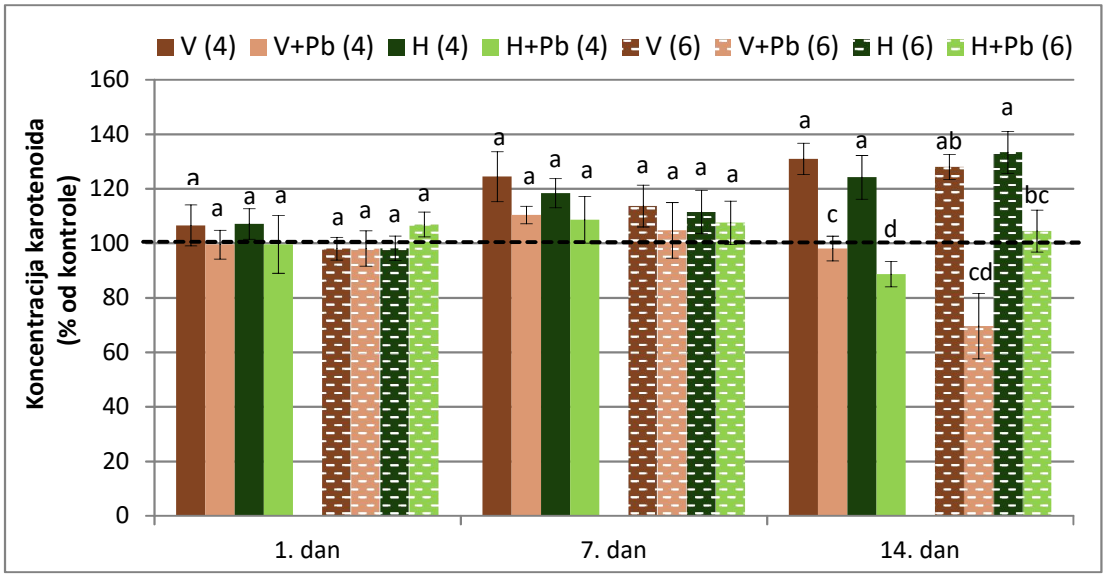
Faktorijalna analiza varijance u vrste *E. prunastri* nije pokazala značajan učinak faktora na ukupne karotenoide prilikom prava dva uzorkovanja. Analizom lišajeva

uzorkovanih 14. dana vidi se značajan utjecaj olova, kao i kombinacije olova i medija (tablica 7).

Tablica 7. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentraciju ukupnih karotenoida s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastri*. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju ukupnih karotenoida podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	67,659	0,226	0,637
	pH	100,723	0,336	0,565
	olovo	24,190	0,081	0,778
	medij*pH	52,670	0,176	0,677
	medij*olovo	50,102	0,167	0,685
	pH*olovo	407,203	1,358	0,251
	medij*pH*olovo	62,717	0,209	0,650
7. dan	medij	39,203	0,097	0,757
	pH	442,506	1,098	0,301
	olovo	1005,889	2,497	0,122
	medij*pH	52,923	0,131	0,719
	medij*olovo	66,460	0,165	0,687
	pH*olovo	89,366	0,222	0,640
	medij*pH*olovo	0,302	0,001	0,978
14. dan	medij	435,614	1,392	0,245
	pH	29,826	0,095	0,759
	olovo	***18177,778***	***58,085***	***0,000***
	medij*pH	***2389,970***	***7,637***	***0,009***
	medij*olovo	539,857	1,725	0,197
	pH*olovo	266,350	0,851	0,362
	medij*pH*olovo	773,370	2,471	0,124

Jednosmjerna analiza varijance pokazala je da 1. i 7. dana nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih karotenoida kod uzoraka tretiranih olovom u odnosu na pripadajuće kontrole bez obzira kojim medijem su prskani i pri kojoj pH vrijednosti. Utjecaj olova vidljiv je tek četrnaestog dana kada je uočeno statistički značajno sniženje koncentracije ukupnih karotenoida u lišajeva tretiranih olovom i u kombinaciji s vodom i u kombinaciji s Hoaglandovim medijem i to pri obje pH vrijednosti. U lišajeva tretiranih olovom u kombinaciji s Hoaglandovim medijem uočila sam nižu koncentraciju karotenoida pri pH vrijednosti 4 (slika 9).



Slika 9. Koncentracija ukupnih karotenoida izražena kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

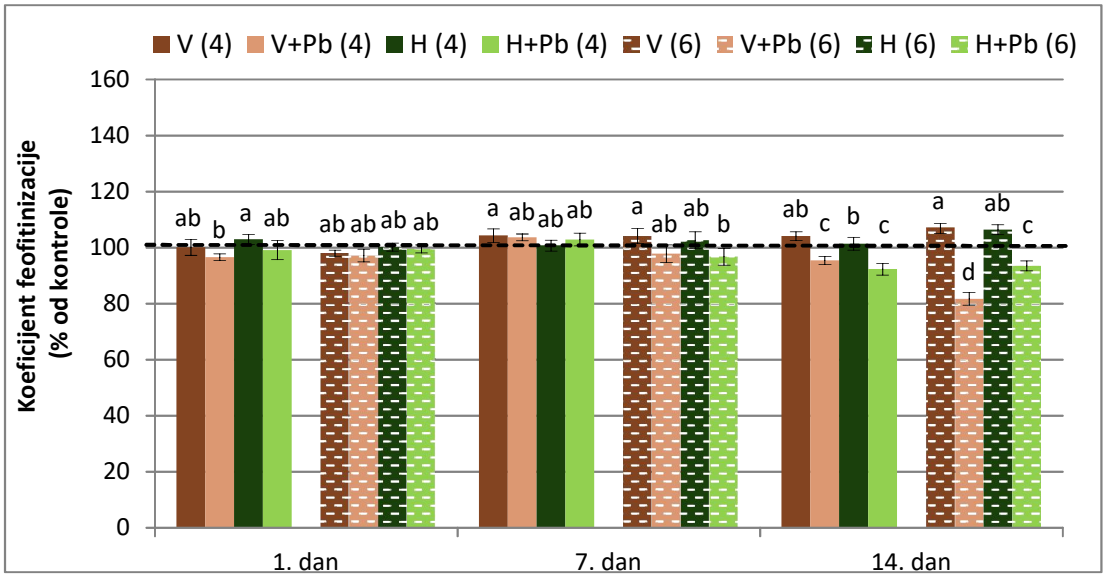
3.2.1.4. Koeficijent feofitinizacije

Faktorijalnom analizom varijance u vrste *E. prunastri* ustanovila sam da olovo, kombinacija olova i pH vrijednosti, kombinacija olova i medija, kao i kombinacija sva tri čimbenika imaju statistički značajan utjecaj na koeficijent feofitinizacije nakon 14. dana. 1. i 7. dan nije bilo značajnog utjecaja istraživanih čimbenika na koeficijent feofitinizacije (tablica 8).

Tablica 8. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koeficijent feofitinizacije s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastri*. Faktori koji značajno utječu na koeficijent feofitinizacije podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	73,767	2,627	0,113
	pH	10,951	0,390	0,536
	olovo	59,238	2,110	0,154
	medij*pH	0,779	0,028	0,869
	medij*olovo	0,016	0,001	0,981
	pH*olovo	25,344	0,903	0,348
	medij*pH*olovo	0,197	0,007	0,934
7. dan	medij	35,383	0,972	0,330
	pH	79,537	2,184	0,147
	olovo	86,944	2,387	0,130
	medij*pH	2,556	0,070	0,792
	medij*olovo	7,665	0,210	0,649
	pH*olovo	143,073	3,928	0,054
	medij*pH*olovo	4,044	0,111	0,741
14. dan	medij	19,347	0,857	0,360
	pH	14,717	0,652	0,424
	olovo	***2363,619***	***104,758***	***0,000***
	medij*pH	***209,766***	***9,297***	***0,004***
	medij*olovo	***113,401***	***5,026***	***0,031***
	pH*olovo	***320,013***	***14,183***	***0,001***
	medij*pH*olovo	***127,878***	***5,668***	***0,022***

Jednosmjerna analiza varijance za prva dva uzorkovanja nije pokazala statistički značajnu razliku utecaja različitih tretmana na koeficijent feofitinizacije kod ove vrste lišaja. Tek nakon 14. dana tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom značajno je snizio koeficijent feofitinizacije, a sniženje je bilo značajno niže nakon prskanja vodom pH vrijednosti 6. Tretman olovom u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom, također je doveo do značajnog smanjenja ovog koeficijent u odnosu na pripadajuću kontolu i to pri obje pH vrijednosti podjednako (slika 10).



Slika 10. Koeficijent feofitinizacije izražen kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.2.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

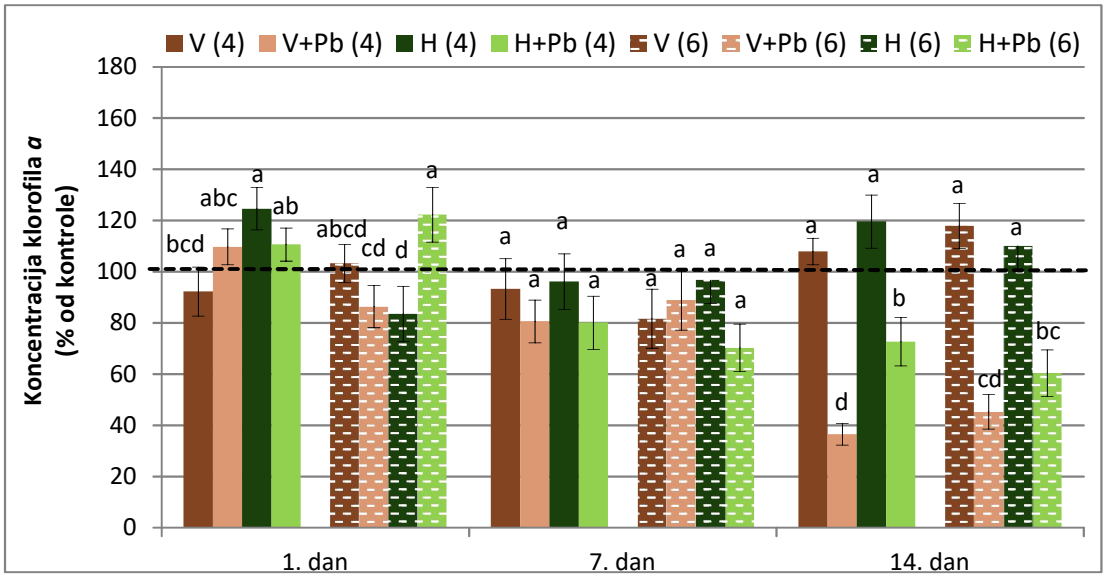
3.2.2.1. Koncentracija klorofila *a*

Faktorijalna analiza varijance pokazala je značajan utjecaj medija i kombinacije sva tri čimbenika (medij, pH i olovo) nakon 1. dana. Niti jedan od istraživanih čimbenika nije utjecao na koncentraciju klorofila *a* nakon 7. dana. Četrnaestog dana značajan utjecaj imali su olovo i medij te njihova kombinacija (tablica 9).

Tablica 9. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentraciju klorofila *a* s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *F. caperata*. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju klorofila *a* podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	***medij***	***1706,5***	***4,563***	***0,039354***
	pH	1211,6	3,240	0,080037
	olovo	450,5	1,205	0,279483
	medij*pH	203,5	0,544	0,465407
	medij*olovo	406,6	1,087	0,303857
	pH*olovo	235,1	0,629	0,432879
	medij*pH*olovo	***5268,9***	***14,088***	***0,000598***
7. dan	medij	0,9	0,0015	0,969630
	pH	110,7	0,1880	0,667008
	olovo	1636,7	2,7796	0,103697
	medij*pH	24,7	0,0420	0,838716
	medij*olovo	976,1	1,6577	0,205707
	pH*olovo	63,9	0,1085	0,743642
	medij*pH*olovo	653,0	1,1090	0,298953
14. dan	***medij***	***2119,9***	***5,9186***	***0,019935***
	pH	180,7	0,5046	0,481958
	olovo	***40464,8***	***112,9738***	***0,000000***
	medij*pH	323,9	0,9042	0,347821
	medij*olovo	***1563,1***	***4,3639***	***0,043643***
	pH*olovo	368,2	1,0281	0,317201
	medij*pH*olovo	298,1	0,8322	0,367551

Nakon faktorijalne analize varijance napravila sam jednosmjernu analizu varijance. Rezultati su pokazali da je nakon 1. dana samo kombinacija olova i Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6 značajno povisila koncentraciju klorofila *a* s obzirom na pripadajuću kontrolnu skupinu kao i u usporedbi s vrijednošću dobivenom nakon tretmana olovom u kombinaciji s vodom pH vrijednosti 6. Također, lišajevi prskani Hoaglandovim medijem pH vrijednosti 4 imali su više klorofila *a* u odnosu na one prskane samo vodom. Nakon 7. dana nema značajnih razlika između učinaka pojedinih tretmana, kao ni njihovih kontrolnih skupina. Dugoročan tretman olovom (14. dana) u obje kombinacije i pri obje pH vrijednosti pokazao je značajno smanjenje koncentracije klorofila *a* u usporedbi s kontrolnom skupinom pojedinog tretmana. Pri pH vrijednosti 4 veći učinak imao je tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom, nego u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom (slika 11)



Slika 11. Koncentracija klorofila *a* izražena kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

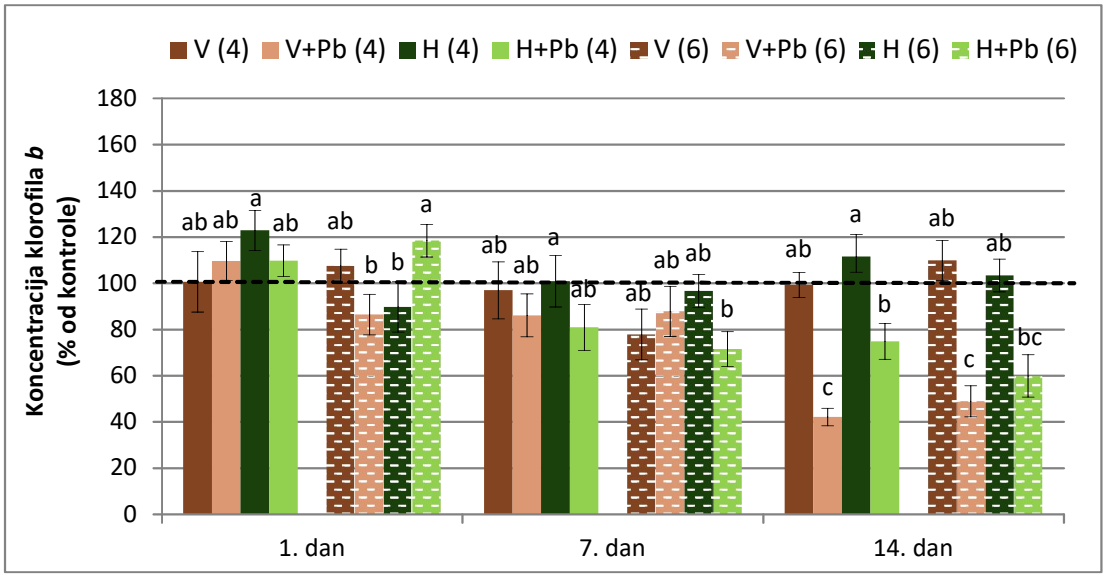
3.2.2.1. Koncentracija klorofila *b*

Faktorijalnom analizom varijance u vrste *F. caperata* ustanovila sam značajan utjecaj kombinacije sva tri čimbenika (medij, pH i olovo) na koncentraciju klorofila *b* nakon prvog dana. Nakon 7. dana nijedan faktor nije pokazao značajno djelovanje, no nakon 14. dana i medij i olovo utjecali su na koncentraciju klorofila *b* (tablica 10).

Tablica 10. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentraciju klorofila *b* s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *F. caperata*. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju klorofila *b* podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	941,5	2,137	0,152245
	pH	1162,9	2,639	0,112737
	olovo	8,9	0,020	0,887611
	medij*pH	46,6	0,106	0,746834
	medij*olovo	528,6	1,200	0,280440
	pH*olovo	96,7	0,220	0,642159
	medij*pH*olovo	***3605,6***	***8,183***	***0,006913***
7. dan	medij	0,9	0,0016	0,967876
	pH	684,2	1,2227	0,275783
	olovo	1514,5	2,7065	0,108185
	medij*pH	9,2	0,0164	0,898673
	medij*olovo	1411,0	2,5215	0,120588
	pH*olovo	177,1	0,3165	0,576998
	medij*pH*olovo	484,7	0,8662	0,357884
14. dan	***medij***	***1717,6***	***6,004***	***0,019126***
	pH	79,6	0,278	0,600942
	olovo	***27439,8***	***95,916***	***0,000000***
	medij*pH	405,7	1,418	0,241275
	medij*olovo	1004,8	3,512	0,068828
	pH*olovo	503,7	1,761	0,192659
	medij*pH*olovo	264,7	0,925	0,342301

Jednosmjerna analiza varijance pokazala je značajno više koncentracije klorofila *b* kod uzoraka tretiranih olovom i Hoaglandovom otopinom pri pH vrijednosti 6 nakon prvog dana u odnosu na pripadajuću kontrolu bez olova. Također lišajevi prskani samo Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6 imali su niže vrijednosti klorofila b od onih prskanih istom otopinom, ali pH vrijednosti 4. Nakon 7. dana nije bilo utjecaja tretmana na mjereni pokazatelj u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine. Četrnaestog dana rezultati su pokazali da tretman olovom pri obje pH vrijednosti snižava koncentraciju klorofila *b* s obzirom na kontrolne skupine koje su bile tretirane destiliranom vodom. Kod kombinacije olova i Hoaglandove otopine također je uočeno sniženje klorofila *b*, ali je statistički značajan učinak s obzirom na kontrolnu skupinu bio samo pri pH vrijednosti 4 (slika 12).



Slika 12. Koncentracija klorofila *b* izražena kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

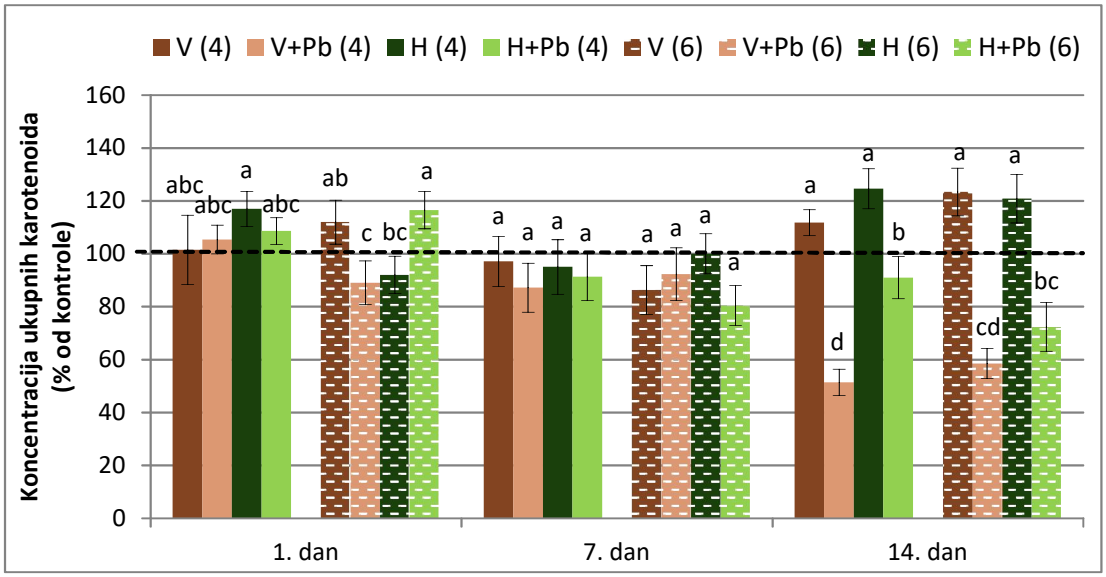
3.2.2.2. Koncentracija ukupnih karotenoida

Što se tiče faktorijalne analize varijance za koncentraciju ukupnih karotenoida kod vrste *F. caperata* . nakon prvog dana jedino je kombinacija sva tri čimbenika (medij, pH, olovo) pokazala značajan utjecaj. Na koncentracije izmjerene 7. dana niti jedan čimbenik nije imao značajnog utjecaja, no nakon 14. dana značajan utjecaj su imali olovo i medij zasebno, te ta dva čimbenika u kombinaciji (tablica 11).

Tablica 11. Faktorijalna analiza varijance napravljena za za ukupne karotenoide s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastri*. Faktori koji značajno utječu na za ukupne karotenoide podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	475,3	1,493	0,229537
	pH	367,0	1,152	0,290015
	olovo	6,0	0,019	0,891790
	medij*pH	85,7	0,269	0,606986
	medij*olovo	862,2	2,708	0,108347
	pH*olovo	26,1	0,082	0,776130
	medij*pH*olovo	***2483,1***	***7,798***	***0,008232***
7. dan	medij	10,1	0,0228	0,880781
	pH	96,5	0,2184	0,642942
	olovo	530,7	1,2010	0,280029
	medij*pH	0,0	0,0001	0,993827
	medij*olovo	269,7	0,6103	0,439517
	pH*olovo	0,0	0,0000	0,996522
	medij*pH*olovo	715,4	1,6189	0,210973
14. dan	***medij***	***2832,8***	***9,910***	***0,003244***
	pH	10,1	0,035	0,852029
	olovo	***29981,8***	***104,882***	***0,000000***
	medij*pH	788,6	2,759	0,105181
	medij*olovo	***1292,8***	***4,523***	***0,040185***
	pH*olovo	504,3	1,764	0,192234
	medij*pH*olovo	226,7	0,793	0,378987

Jednosmjerna analiza varijance nakon prvog dana nije pokazala značajnu razliku u lišaja tretiranih olovom i destiliranom vodom pH vrijednosti 4 te njihove kontrolne skupine. U lišajeva tretiranih olovom i destiliranom vodom pri pH vrijednosti 6 također je izmjerena znatno niža koncentraciju ukupnih karotenoida od pripadajuće kontrolne skupine. Međutim, kod uzoraka koji su bili tretirani olovom i Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6 koncentracija ja bila značajno povišena u odnosu na kontrolu. Nakon 7. dana koncentracija ukupnih karotenoida nije se značajno razlikovala s obzirom na tretman. Tek četrnaesti dan svi tretmani olovom su značajno snizili koncentraciju ukupnih karotenoida s obzirom na pripadajuće kontrolne skupine. Jače djelovanje imao je tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom u odnosu na Hoaglandov medij pri pH vrijednosti 4 (slika13).



Slika 13. Koncentracija ukupnih karotenoida izražena kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.2.2.3. Koeficijent feofitinizacije

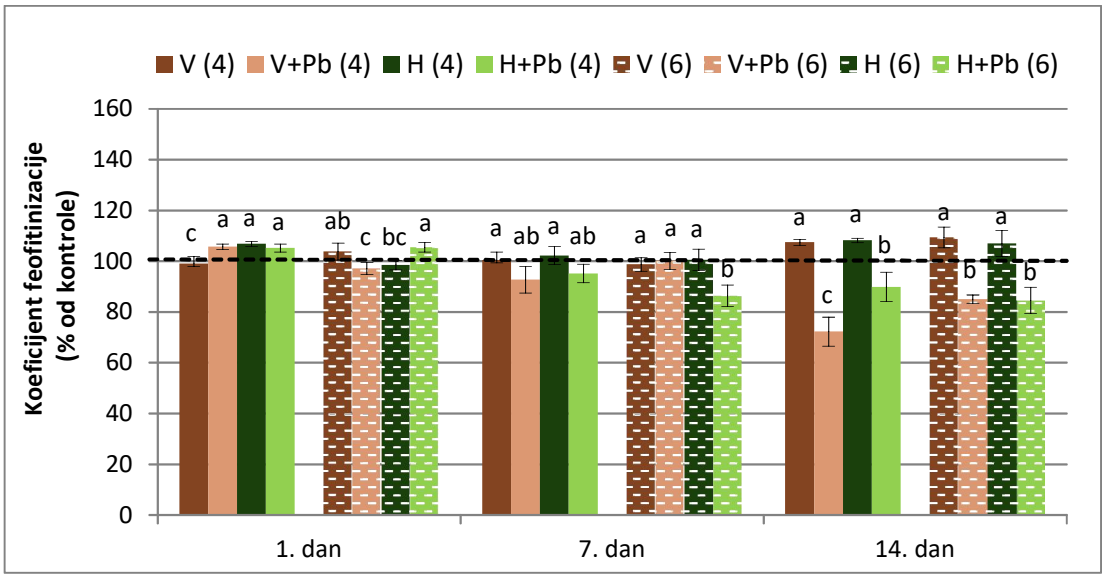
Faktorijalnom analizom varijance za koefiijent feofetinizacije u vrste *F. caperata* dokazan je učinak pH vrijednosti te kombinacije sva tri čimbenika (pH, medij i olovo) nakon prvog dana. Sedmog i četrnaestog dana samo je olovo utjecalo na mjereni pokazatelj (tablica 12).

Tablica 12. Faktorijalna analiza varijance napravljena za koeficijent feofitinizacije s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu vrste *F. caperata*. Faktori koji značajno utječu na koeficijent feofitinizacije podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	72,8	3,26	0,078962
	pH	***97,5***	***4,37***	***0,043476***
	olovo	20,1	0,90	0,348454
	medij*pH	11,9	0,54	0,469099
	medij*olovo	20,3	0,91	0,346733
	pH*olovo	15,6	0,70	0,408552
	medij*pH*olovo	***337,5***	***15,13***	***0,000403***
7. dan	medij	42,0	0,594	0,445519
	pH	15,3	0,216	0,644880
	olovo	***542,1***	***7,670***	***0,008636***
	medij*pH	185,2	2,621	0,113752
	medij*olovo	157,3	2,225	0,144026
	pH*olovo	2,6	0,037	0,847620
	medij*pH*olovo	187,4	2,652	0,111698
14. dan	medij	167,6	2,009	0,164742
	pH	79,1	0,948	0,336439
	olovo	***7006,3***	***83,981***	***0,000000***
	medij*pH	248,1	2,974	0,092949
	medij*olovo	245,3	2,941	0,094737
	pH*olovo	13,3	0,159	0,692459
	medij*pH*olovo	211,9	2,539	0,119549

Zatim sam provela jednosmjernu analizu varijance koja je za lišajeve uzorkovane nakon prvog dana pokazala značajan utjecaj olova u kombinaciji s vodom u odnosu na pripadajuće kontrolne skupine pri obje pH vrijednosti. Pri pH vrijednosti 4 došlo je do povišenja vrijednosti, a pri pH vrijednosti 6 do sniženja. Što se tiče kombinacije olova i Hoaglandove otopine, pri pH vrijednosti 4 nije bilo učinka, a pri vrijednosti 6 ta je kombinacija povisila mjereni pokazatelj s obzirom na kontrolu. Međutim, uočila sam i neke razlike između različitih kontrolnih skupina. Tako su lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 4 imali niže vrijednosti od onih prskanih Hoaglandovom otopinom iste pH vrijednosti te od onih prskanih vodom pH vrijednosti 6. Također višu vrijednost su imali lišajevi prskanih Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 4 u odnosu na one prskane istim medijem, ali pH vrijednosti 6. Nakon 7. dana samo je olovo u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6 djelovalo na sniženje koeficijenta feofitinizacije. U lišajeva uzorkovanih na kraju pokusa značajno niži koeficijent feofitinizacije bio je kod onih uzoraka koji su tretirani

olovom i destiliranom vodom, kao i kod onih tretiranih olovom i Hoaglandovom otopinom i to pri obje pH vrijednosti. Kombinacija olova i destilirane vode pri pH vrijednosti 4 najznačajnije je snizila mjereni pokazatelj (slika 14).



Slika 14. Koeficijent feofitinizacije izražen kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

3.3. Razina lipidnih peroksida

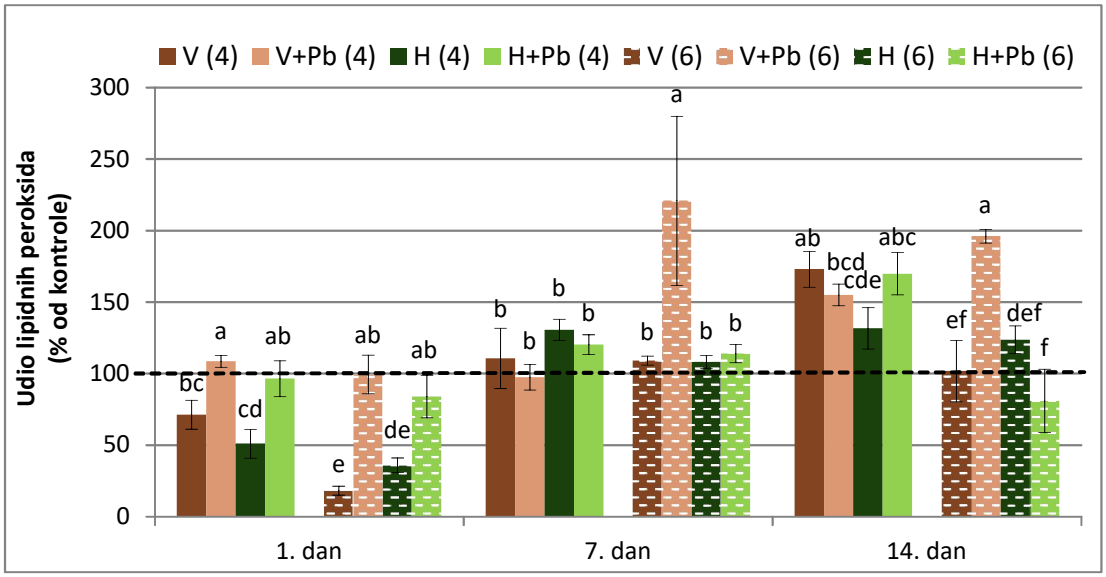
3.3.1. *Evernia prunastri* (L.) Ach.

U lišaja koji su uzorkovani nakon prvog dana značajan utjecaj imali su pH vrijednost i olovo. Nakon 7. dana na razinu lipidnih peroksida utjecala je pH vrijednost u kombinaciji s medijem te s olovom. Nakon 14. dana pokusa na mjereni pokazatelj djelovali su medij, pH, kombinacija medija i olova, te kombinacija sva tri čimbenika (medij, olovo, pH) (tablica 13).

Tablica 13. Faktorijalna analiza varijance napravljena za razinu lipidnih peroksida s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *E. prunastr*. Faktori koji značajno utječu na razinu lipidnih peroksida podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	632,2	1,0036	0,322938
	pH	***5625,0***	***8,9305***	***0,004959***
	olovo	***31352,6***	***49,7764***	***0,000000***
	medij*pH	845,2	1,3418	0,254132
	medij*olovo	438,3	0,6958	0,409551
	pH*olovo	1510,1	2,3974	0,130047
	medij*pH*olovo	1189,4	1,8883	0,177659
7. dan	medij	3047,2	1,2508	0,271019
	pH	6062,9	2,4887	0,123666
	olovo	5481,4	2,2500	0,142582
	medij*pH	***14404,0***	***5,9125***	***0,020292***
	medij*olovo	7434,2	3,0516	0,089430
	pH*olovo	***13651,4***	***5,6036***	***0,023584***
	medij*pH*olovo	7412,1	3,0425	0,089888
14. dan	***medij***	***9902,7***	***9,0689***	***0,004667***
	pH	***11131,9***	***10,1946***	***0,002874***
	olovo	3534,9	3,2373	0,080140
	medij*pH	3068,0	2,8097	0,102128
	medij*olovo	***4531,2***	***4,1497***	***0,048844***
	pH*olovo	676,3	0,6194	0,436284
	medij*pH*olovo	***25726,0***	***23,5598***	***0,000022***

Jednosmjerna analiza varijance za prvo uzorkovanje pokazala je značajno višu razinu lipidnih peroksida u lišaja tretiranih olovom i prskanih destiliranom vodom ili Hoaglandovom otopinom pri obje pH vrijednosti, s obzirom na pripadajuće kontrolne skupine. Najnižu razinu lipidnih peroksida izmjerila sam kod lišajeva prskanih destiliranom vodom ili Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6. Nakon 7. dana kombinacija olova i destilirane vode pH vrijednosti 6 i dalje značajno djeluje na povišenje razine lipidnih peroksida. Olovo u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pri pH vrijednostima 4 i 6 nije imalo značajan učinak na razinu lipidnih peroksida. Na kraju pokusa tretman olovom i vodom pH vrijednosti 6 i dalje je imao višu razinu lipidnih peroksida, nego kontrolna skupina gdje su uzorci prskani samo destiliranom vodom spomenute pH vrijednosti. Uzorci tretirani olovom i prskani Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6 imali su značajno nižu razinu lipidnih peroksida nego uzorci tretirani olovom i vodom iste pH vrijednosti (slika 15).



Slika 15. Razina lipidnih peroksida izražena kao postotak od kontrole, u vrste *E. prunastri* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

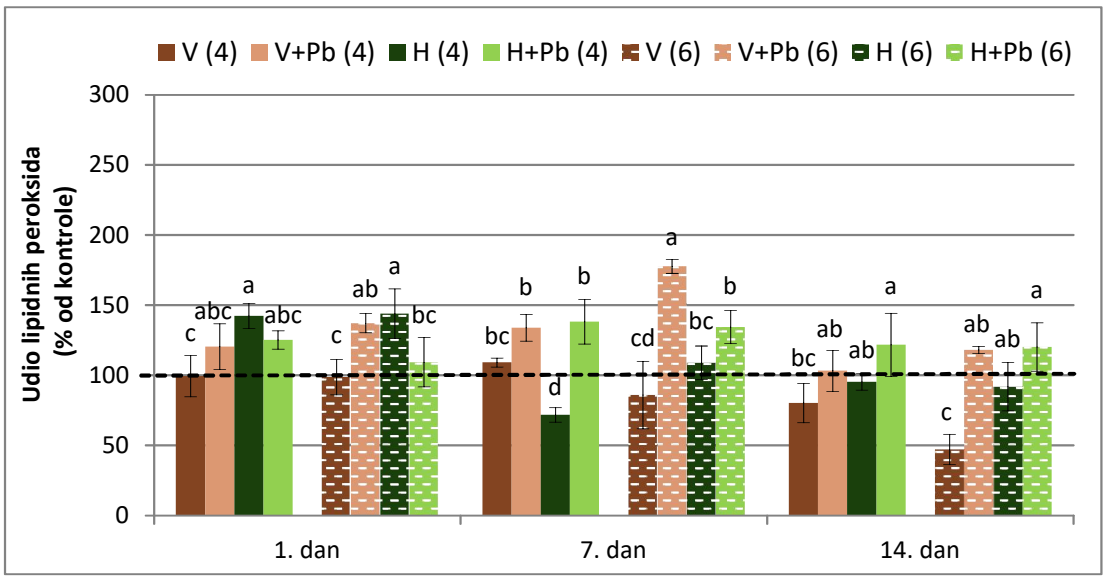
3.3.2. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

Faktorijalna analiza varijance za razinu lipidnih peroksida pokazala je značajan utjecaj medija u kombinaciji s olovom nakon prvog dana. Na mjereni pokazatelj nakon 7 dana značajan učinak imalo je olovo te kombinacija sva tri čimbenika. Prilikom zadnjeg uzorkovanja učinak su imali olovo i pH vrijednost (tablica 14).

Tablica 14. Faktorijalna analiza varijance napravljena za razinu lipidnih peroksida s obzirom na medij kojim su uzorci prskani tijekom pokusa, njegovu pH vrijednost te prisutnost olova za vrstu *F. caperata*. Faktori koji značajno utječu na razinu lipidnih peroksida podebljani su i u kurzivu ($p \leq 0,05$).

	efekt	sume kvadrata	F vrijednost	p
1. dan	medij	2959,6	3,7539	0,060345
	pH	2,0	0,0026	0,959936
	olovo	42,0	0,0533	0,818772
	medij*pH	647,2	0,8209	0,370791
	medij*olovo	***8600,3***	***10,9086***	***0,002129***
	pH*olovo	0,0	0,0000	1,000000
	medij*pH*olovo	847,0	1,0743	0,306705
7. dan	medij	1902,2	2,3360	0,135402
	pH	1944,7	2,3883	0,131243
	olovo	***28925,6***	***35,5227***	***0,000001***
	medij*pH	110,3	0,1354	0,715104
	medij*olovo	396,6	0,4870	0,489877
	pH*olovo	451,9	0,5549	0,461276
	medij*pH*olovo	***7779,9***	***9,5543***	***0,003899***
14. dan	medij	180,4	0,1885	0,666855
	pH	***4311,8***	***4,5053***	***0,040938***
	olovo	***14735,0***	***15,3964***	***0,000389***
	medij*pH	273,7	0,2859	0,596214
	medij*olovo	1230,6	1,2858	0,264524
	pH*olovo	1029,8	1,0760	0,306707
	medij*pH*olovo	1876,7	1,9609	0,170219

Jednosmjerna analiza varijance nakon prvog dana pokazala je značajno višu razinu lipidnih peroksida jedino kod uzoraka tretiranih olovom i destiliranom vodom pH vrijednosti 6, s obzirom na njihovu kontrolnu skupinu. Lišajevi koji su pri istom pH bili tretirani olovom i prskani Hoaglandovom otopinom imali su neočekivano značajno nižu razinu lipidnih peroksida u odnosu na pripadajuću kontrolnu skupinu. Nakon 7. dana tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom pH vrijednosti 6 značajno je povisio razinu lipidnih peroksida, no pri nižoj pH vrijednosti nije bilo značajnog učinka. Međutim, u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 4 olovo je značajno povisilo razinu lipidnih peroksida. Nakon 14. dana tretman olovom i destiliranom vodom pH vrijednosti 6 i dalje ima značajno višu količinu lipidnih peroksida s obzirom na odgovarajuću kontrolnu skupinu dok kod ostalih tretmana nisam uočila značajne razlike (slika 16).



Slika 16. Razina lipidnih peroksida izražena kao postotak od kontrole, u vrste *F. caperata* nakon 1., 7. i 14. dana pokusa. Crtkana linija označava kontrolnu skupinu lišajeva na početku pokusa prije tretiranja različitim otopinama. Uzorci lišajeva tretirani su na slijedeći način: V (4) - kontrolna skupina lišajeva prskana tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa destiliranom vodom pH vrijednosti 4, V (6) - kontrolna skupina prskana destiliranom vodom pH vrijednosti 6, V+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani destiliranom vodom pH vrijednosti 6; H (4) - lišajevi prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H+Pb (4) - lišajevi tretirani olovom te prskani tijekom pokusa 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 4, H (6) - lišajevi prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6, H+Pb (6) - lišajevi tretirani olovom te prskani 1/10 Hoaglandove otopine pH vrijednosti 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od najmanje pet replika ± standardna pogreška. Različita slova iznad stupaca označuju da su vrijednosti međusobno statistički značajno različite ($p \leq 0,05$) unutar istog dana.

4. RASPRAVA

Lišajevi su organizmi koji se koriste kao bioindikatori okolišnog zagađenja. Pojedine vrste različito bioakumuliraju teške metale (Rola i sur, 2015) i različito su osjetljive na njih (Sett i Kundu, 2016). Ovisno o osjetljivosti vrste ona nastanjuje područje gdje je koncentracija metala viša ili niža te na taj način pokazuje stupanj zagađenja (Davies i sur, 2007). Pojedini teški metali mogu smanjiti fertilnost lišaja, smanjiti količinu pigmenata, a u najosjetljivijih vrsta mogu izazvati i smrt (Loppi i Pirintsos, 1999). Okolišni faktori poput temperature, pH vrijednosti, dostupnih mineralnih tvari, vlage ili svjetlosti mogu različito utjecati na određenu vrstu lišaja. Zato je u ovom radu istraženo koliko su dvije vrste lišaja, *Evernia prunastri* (L.) Ach te *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, osjetljive na olovo ukoliko na njih utječu različiti faktori. Jedan od čimbenika čiji utjecaj sam istražila jest medij (Hoaglandova otopina ili destilirana voda). Hoaglandova otopina sadrži anione kao što su NO_3^-, PO_4^{3-}, $Mo_7O_2^{6-}$, SO_4^{2-}, itd., te katione K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, NH_4^+, a oni u laboratorijskim uvjetima zamjenjuju mineralne tvari kojima bi lišaj bio opskrbljen da obitava u svom prirodnom staništu (Welch, 2006). Osim utjecaja medija, ispitala sam i utjecaj pH vrijednosti. Naime poznato je da je bioakumulacija i toksičnost olova u lišajeva putem aerosolnih čestica i u prisutnosti kiselih kiša učinkovitija ukoliko je pH vrijednost niža (Cervantes i sur, 2008). Gubitak vode uzrokuje nakupljanje teških metala pa su više koncentracije zabilježene ljeti, nego u jesen kada ima više padalina i vlage (Conti i Ceccheti, 2001).

Koliko je metal toksičan za pojedinu vrstu lišaja može se detektirati praćenjem pojedinih parametara, primjerice očuvanjem integriteta membrana, sadržajem klorofila, praćenjem fotosintetske učinkovitosti i respiracije, mjerenjem QY fotosustava II, količinom produkcije etilena, sintezom različitih enzima ili sekundarnih metabolita u lišaja (Carreras i sur, 2006). Pokazatelji praćeni u ovom radu bili su koncentracija klorofila *a*, klorofila *b*, ukupni karotenoidi, koeficijent feofitinizacije, maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QY_{max}) te razina lipidnih peroksida.

U lišaja mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo* dobivamo podatke o aktivnosti fotosustava II, a on je najskloniji oštećenjima pri različitim stresnim uvjetima (Bačkor i Loopi, 2009). Izloženost teškim metalima za lišajeve predstavlja stres, a mnogi autori su dokazali da to djeluje na sniženje maksimalnog prinosa fotosustava (QY_{max}). Yiğittürk i suradnici (2016) zaključili su kako je učinak kobalta u vrste *Pseudoevernia furfuracea* gradacijski veći ovisno o

dozi i vremenu (mjereno nakon 1, 3 i 24 sata) te djeluje na sniženje QY_{max}. Isti učinak na QYmax dokazan je za bakar i olovo (Garty i sur, 2001). U ovom radu faktorijalna analiza fluorescencije klorofila *a in vivo* za vrstu *E. prunastri* pokazala je da olovo, ali i sam medij kojim su lišajevi bili tretirani imaju značajan učinak već od 1. dana pokusa. Analiza je pokazala i značajan učinak kombinacije olova i medija sve dane pokusa te pH vrijednosti u kombinaciji s olovom te u kombinaciji s medijem što ukazuje da postoji značajna interakcija pojedinih faktora. Detaljnija analiza, odnosno jednosmjerna analiza varijance pokazala je da je u lišajeva tretiranih samo olovom bez obzira na pH vrijednost medija QY_{max} bio niži nego u lišajeva prskanih samo vodom. Međutim, nakon 1. dana tretmana bilo je vidljivo kako je QY_{max} bio viši u lišaja kojima su uz olovo bili dostupni ioni sadržani u Hoaglandovoj otopini za razliku od onih koji su tretirani samo olovom, osobito pri pH vrijednosti 6. Taj se trend nastavlja nakon 7. i 14. dana. U mnogih vrsta lišajeva dokazano je kako kationi Pb^{2+} zauzimaju vezna mjesta u staničnoj stijenci mikobionta, a na ista mjesta se mogu vezati sekundarni metaboliti samog lišaja i time smanjiti toksičnost olova (Carreras i sur, 2006). Cakmak (2014) utvrdio je da u slučaju aluminija kationi Ca^{2+} i Mg^{2+} mogu ublažiti njegovu toksičnost pa bi tako kationi iz Hoaglandove otopine mogli imati slično djelovanje u slučaju olova. Iako sama pH vrijednost nije utjecala na QY_{max} uočeno je da utječe na učinak olova, ali da to ovisi i o mediju. Nakon 7. dana tretman olovom u kombinaciji s Hoaglandovim medijem doveo je do nižeg QY_{max} pri pH vrijednosti 4 nego 6. S druge strane nakon 14. dana učinak olova bio je jači u lišajeva koju su prskani destiliranom vodom pri pH vrijednosti 6, nego u onih pri vrijednosti 4. Mnogi su autori do sada u svojim istraživanjima dokazali da različite vrste lišajeva pokazuju različitu toleranciju na pH vrijednost, te da se optimalna pH vrijednost za rast u pojedinih vrsta mijenja kada je prisutan stres i zagađenje (Riga- Karandinos, 1998). Osim toga, prilikom akumulacije teškog metala u lišaju razlikujemo količinu intracelularnog i totalnog sadržaja metala. Sanita di Toppi i suradnici (2005) ustanovili su da se prilikom kratkoročnog izlaganja kadmij u lišaju veže za staničnu stjenku i time teški metal trenutno ne ostvaruje svoj biokemijski i fiziološki toksični potencijal. Nakon dužeg izlaganja, ukoliko ta mjesta zauzimaju drugi kationi, toksičnost raste, što se pokazalo i u našem slučaju prilikom izlaganja olovu. Moguće je da je veća toksičnost olova pri pH vrijednosti vode 6 posljedica bolje topivosti olova budući da je pri lagano kiselim pH vrijednostima većina tvari bolje topiva nego pri jako kiselim kao što je na primjer 4 gdje se topivost a time i dostupnost iona smanjuje (Sewards, 2014).

U vrste *F. caperata* olovo je značajno utjecalo na QY_{max} nakon prvog i 14. dana. Zanimljivo je da je nakon 7. dana učinak imala i pH vrijednost, a 14. dana medij. Uočene su i različite interakcije pojedinih faktora osobito medija s olovom i medija s pH vrijednosti. Kao i u prethodne vrste, i kod *F. caperata* tretman olovom i destiliranom vodom pri obje pH vrijednosti djelovao je na sniženje QY_{max} nakon sva tri mjerenja što ukazuje da je i ova vrsta i njen fotosintetski aparat osjetljiva na izlaganje olovu. U slučaju kombinacije olova i Hoaglandovog medija učinak olova je bio slabiji u odnosu na učinak kad je olovo bilo u kombinaciji s vodom što nam potvrđuje da prisutnost drugih iona u otopini može smanjiti toksični učinak metala. Međutim, u odnosu na one prskane samo Hoaglandovom otopinom lišajevi koji su bili tretirani olovom u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom imali su niži QY_{max} pri pH vrijednosti 4, dok je pri vrijednosti 6 smanjenje uočeno samo nakon 14. dana. Iz ovog bi se moglo zaključiti da i kod vrste *F. caperata* efikasnost kationa u smanjivanju toksičnosti ovisi o pH vrijednosti otopine koja vjerojatno utječe na dostupnost i izmjenu tih kationa. Čini se da na početku pokusa vrsta *F. caperata* bolje iskorištava mineralne tvari iz Hoaglandove otopine pri nižoj pH vrijednosti, dok nakon 14. dana one bivaju iskorištene podjednako pri obje pH vrijednosti i ublažavaju toksični učinak olova. Međutim neobično je da je nakon 7. dana uočeno smanjenje QY_{max} u lišajeva tretiranih samo Hoaglandovom otopinom pri pH vrijednosti 6 u odnosu na one tretirane vodom pri istoj vrijednosti i onih tretiranim Hoaglandovom otopinom, ali pri pH vrijednosti 4. Postoji mogućnost da je pri pH vrijednosti medija od 6 previše dostupnih tvari za lišaj budući da je kod te pH vrijednosti većina tvari maksimalno topiva u vodi što djeluje toksično na lišaj za razliku od pH vrijednost 4 pri kojoj su neke tvari kao što su Ca i Mg te fosfatni i sulfatni ioni teže topive i dostupne (Sewards, 2014).

Mnogi autori dokazali su učinak teških metala na smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata u različitih vrsta lišaja i utjecaj na fiziološki status lišaja (Boopragob, 2002, Majumder i sur, 2012, Bačkor i sur, 2009, Pisani i sur, 2010, Alvarez i sur, 2012). Nekoliko fizioloških mehanizama objašnjava takvo djelovanje. Molekula klorofila građena je tako da se u njenom središnjem dijelu nalazi magnezij, a pojedini metali mogu ga zamijeniti i time narušiti funkcionalnost klorofila (Guptai Chandra, 1998). Drugi mehanizam jest da metal inhibira sintezu klorofila stvaranjem kompleksa sa –SH skupinama enzima lišaja (Pisani i sur, 2010). U istraživanjima učinka bakra, kobalta i cinka na fotosintetske pigmente dokazano je

da je klorofil *a* osjetljiviji nego klorofil *b* te da se njihov omjer smanjuje dok im suma ostaje konstantna, a do toga dolazi zato što oksidacijom metilnih grupa klorofil *a* biva transformiran u klorofil *b* (Bačkor i Zetikova, 2003, Bačkor i Dzubaj, 2004). Teški metali poput kadmija, nikla ili bakra dokazano djeluju na sniženje koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* te ukupnih karotenoida (Bačkor i sur, 2003). Također, Sharma i Dubey (2005) su pokazali višestruke učinke olova na kloroplaste vaskularnih biljaka, strukture tilakoida, te kvalitative i kvantitativne promjene u kompoziciji fotosintetskih pigmenata. Pisani i suradnici (2010) dokazali su da je pod utjecajem žive, ukoliko su joj lišajevi bili izloženi pri dovoljno visokoj koncentraciji, koncentracija klorofila *a*, *b* te ukupnih karotenoida niža u vrsta *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) te *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb.

Rezultati ovog rada pokazali su da je olovo imalo vrlo sličan učinak na klorofil *a* i klorofil *b* u vrste *E. prunastri*, zato ću ih u daljnjem testu navoditi kao klorofile, a posebno ću naglasiti razlike ukoliko one postoje. Faktorijalna analiza pokazala je da je olovo imalo značajna učinak na koncentraciju klorofila nakon 7. i 14. dana tretmana dok je na klorofil *a* nakon 14. dana utjecala i kombinacija medija i pH vrijednosti. Detaljna analiza utvrdila je da različiti tretmani nisu imali značajnog učinka na koncentraciju klorofila nakon prvog dana iako su nešto niže koncentracije izmjerene nakon tretmana olovom. Nakon 7. dana tretman olovom i destiliranom vodom pri pH vrijednosti 4 smanjio je koncentraciju klorofila u odnosu na kontrolne skupine lišajeva tretiranih samo vodom što je i bilo za očekivati s obzirom na već ranije spomenut negativan učinak metala na fotosintetske pigmente. Međutim zanimljivo je da su lišajevi tretirani Hoaglandovom otopinom pri pH vrijednosti 4 imali značajno nižu koncentraciju klorofila, osobito klorofila *b* od onih koji su bili prskani destiliranom iste pH vrijednosti što bi ukazivalo da su možda neki sastojci Hoaglandovog medija imali negativan učinak pri nižoj pH vrijednosti. Međutim, pri višoj pH vrijednosti takav učinak nije primijećen, a i vrijednosti koncentracije klorofila su općenito bile nešto niže i sličnije kontrolnim uzorcima lišajeva prije tretmana pa je moguće da je u stvari destilirana voda pH vrijednosti 4 iz nekog nama nepoznatog razloga imala pozitivan učinak na sintezu klorofila. Nakon 14. dana olovo je očekivano značajno snizilo koncentraciju klorofila pri obje pH vrijednosti u odnosu na tretman bez olova, bez obzira je li bilo prskano Hoaglandovom otopinom ili vodom. Međutim, pri pH vrijednosti 6 kod kombinacije olova i Hoaglandove otopine uočena je nešto viša koncentracija klorofila u odnosu na samo olovo te u odnosu na

kombinaciju olova i Hoaglandove otopine pri pH vrijednosti 4. To potvrđuje ideju da sastojci Hoaglandovog medija mogu imati zaštitni učinak pri odgovarajućoj pH vrijednosti, odnosno onoj kod koje su maksimalno dostupni. Tako na primjer veća koncentracija dostupnih magnezijevih i kalcijevih iona može stabilizirati i osigurati pravilnu funkciju staničnih struktura kao što su stanična stijenka, membrane, molekula klorofila, itd (Cakmak, 2014). Rezultati učinka tretiranja olovom na klorofile se uglavnom slažu s rezultatima fluorescencije klorofila *a in vivo* što ukazuje da je smanjenje koncentracije klorofila dovelo do smanjenja fotosintetske učinkovitosti lišajeva tretiranih olovom (Cakmak, 2014).

Na koncentraciju ukupnih karotenoida u vrste *E. prunastri* također je djelovalo olovo te kombinacija pH vrijednosti s medijem, ali tek nakon 14. dana pokusa. Tada je olovo u kombinaciji s vodom i u kombinaciji s Hoaglandovim medijem pri obje pH vrijednosti djelovalo na sniženje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na tretmane bez olova što sam i očekivala. Međutim, neočekivano je pri pH vrijednosti 4 negativniji učinak olovo imalo u kombinaciji s Hoaglandovim medijem. Budući da su i koncentracije klorofila u toj kombinaciji bile niže za pretpostaviti je da su pri toj pH vrijednosti sastojci medija u kombinaciji s olovom imali negativno djelovanje na fotosintetske pigmente. S druge strane to nije odrazilo na maksimalni prinos fluorescencije koji je bio viši u odnosu na tretman samim olovom. S obzirom da se koncentracija svih fotosintetskih pigmenata smanjila bez djelovanja na učinkovitost fotosinteze moguće je da je došlo do neke adaptacije fotosintetskog sustava na novonastale uvjete.

Koeficijent feofitinizacije jest fiziološki parametar koji ukazuje na razgradnju klorofila u lišaja stoga se često koristi za procjenu učinka teških metala u industrijskim područjima *in situ* ili u transplantiranih lišaja (Bačkor i Loopi, 2009). Prilikom ovog istraživanja podaci za koeficijent feofitinizacije u vrste *E. prunastri* pokazali su da su olovo, olovo u kombinaciji s pH vrijednosti odnosno medijem te kombinacija sva tri čimbenika imali značajan učinak, ali tek nakon 14. dana. Detaljnija analiza pokazala je da je tretman olovom u kombinaciji s destiliranom vodom snizio koeficijent feofitinizacije odnosno doveo do razgradnje klorofila *a* i to značajnije pri pH vrijednosti 6. Tretman olovom u kombinaciji s Hoaglandovim medijem pri pH vrijednosti 6 imao je viši koeficijent feofitinizacije u odnosu na tretman samim olovom. Ovi rezultati se poklapaju s rezultatima mjerenja klorofila. Gledajući sve rezultate zajedno možemo zaključiti da je tretman olovom vjerojatno inhibirao sintezu novih molekula

klorofila budući da je u lišajeva koji nisu bili tretirani olovom uočeno povećanje količine pigmenata tijekom 14. dana pokusa (vrijednosti su bile više od onih izmjerenih u lišajeva na početku pokusa), a tek nakon određenog vremena došlo je do značajnije degradacije postojećeg klorofila što je dovelo do niže koncentracije klorofila te nižeg koeficijenta feofitinizacije. Dodatak Hoaglandovog medija pri pH vrijednosti 6 smanjio je degradaciju klorofila uzrokovanu tretmanom olovom. Međutim, zanimljivo, prskanje Hoaglanovim medijem nije dovelo do značajnije više koncentracije klorofila u odnosu na prskanje vodom što bi bilo za očekivati s obzirom da medij sadrži izvor dušika i ostalih iona koji su potrebni u sintezi klorofila. Moguće objašnjenje je da su lišajevi bili izloženi relativno niskom intenzitetu osvjetljenja pa nije bilo dovoljno ugljikohidrata potrebnih za sintezu „kostura“ molekule klorofila.

U vrste *F. caperata* na koncentraciju klorofila *a* i karotenoida utjecali su medij te kombinacija sva tri čimbenika već nakon 1.dana, a nakon 14. dana utjecaj su imali olovo i medij zasebno te u kombinaciji. Što se tiče koncentracije klorofila *b* u ove vrste, nakon prvog dana samo je kombinacija sva tri čimbenika imala značajan utjecaj, a nakon 14. dana medij odnosno olovo. Rezultati prvog dana pokazali su da je prskanje Hoaglandovim medijem u odnosu na vodu pri pH vrijednosti 4 dovelo do povišenja koncentracije pigmenata, osobito klorofila *a*. Iako je to razlika u odnosu na rezultate kod vrste *E. prunastri*, takav rezultat nije neočekivan budući da medij sadržava nitrate i ostale mineralne tvari potrebne za sintezu klorofila. No iznenađujuće je bilo što je tretiranje medijem pri pH vrijednosti 6 u kombinaciji s olovom dovelo do povećanja koncentracije klorofila i karotenoida u odnosu na sam medij bez olova te na vodu u kombinaciji s olovom. Moguće objašnjenje je da je pri pH vrijednosti 6 došlo do nekog neobjašnjivog međudjelovanja između olova i sastojaka medija koje je dovelo do takvog rezultata. Sličan rezultat uočen je i kod mjerenja fluorescencije klorofila *a*. Međutim taj efekt se gubi 7. dana pokusa pa je moguće da su primijećeni rezultati na početku pokusa u stvari posljedica nedovoljne aklimatizacije vrste *F. caperata* na laboratorijske uvjete. To potvrđuje i činjenica da koncentracije pigmenata nisu značajnije rasle tijekom pokusa bez obzira na primjenjivani tretman. Dugoročan tretman olovom (14 dana) pri obje pH vrijednosti i oba medija snizio je koncentraciju klorofila i karotenoida. Veći učinak imalo je olovo u kombinaciji s destiliranom vodom nego s Hoaglandovom otopinom što sam očekivala iz već prije spomenutih razloga. Međutim kod ove vrste je pozitivan učinak

medija bio zamjetniji kod pH vrijednosti 4, za razliku od vrste *E. prunastri* gdje je taj učinak bio vidljiv samo kod pH vrijednosti 6. Vrsta *F. caperata* spada u nitrofilnu vrstu koja tolerira prilično visoke razine zagađenja (Spier i sur, 2010) pa je moguće da posjeduje određene fiziološke mehanizme koji joj osiguravaju da se prilagodi. Na primjer poznato je da neke vrste lišajeva posjeduju sekundarne metabolite koji mogu specifično inhibirati unos toksičnih količina metala u stanicu ili u slučaju nedostatka mogu potaknuti ulazak esencijalnih mikroelemenata kao što je Cu^{2+} (Hauck, 2009).

Također, kao i kod klorofila *a*, na koeficijent feofitinizacije u vrste *F. caperata* (L.) Hale nakon prvog dana utjecala su sva tri čimbenika u kombinaciji. Prilikom druga dva mjerenja samo je olovo utjecalo na mjereni parametar. Statistička analiza pojedinih tretmana nakon prvog dana pokazala je povišenje koeficijenta kod svih tretmana pri pH vrijednosti 4 u odnosu na tretman samo vodom. Također olovo u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pH vrijednosti 6 dovelo je do povišenja koeficijenta. Ovi rezultati su bili začuđujući osobito u slučaju tretmana samim olovom jer sam očekivala da olovo potakne degradaciju klorofila, no kao što sam već spomenula moguće je da period aklimatizacije nije bio dovoljno dug za ovu vrstu. Nakon 7. dana olovo ali samo u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom pri pH vrijednosti 6 djelovalo je na sniženje koeficijenta feofitinizacije što je opet neobično ali može biti posljedica dostupnosti svih iona zajedno koji onda imaju toksično djelovanje. Nakon 14. dana niži koeficijent feofitinizacije imali su uzorci tretirani olovom i destiliranom vodom odnosno Hoaglandovom otopinom i to pri obje pH vrijednosti što je bilo za očekivati. Iz ovog se može zaključiti da učinci olova na koncentraciju pigmenata i degradaciju klorofila do izražaja dolaze tek nakon duljeg izlaganja osobito kod vrsta koje su nešto manje osjetljive kao što je *F. caperata*. Najveći učinak imala je kombinacija olova i destilirane vode pri pH vrijednosti 4 što se poklapa s rezultatima za klorofile i karotenoide, međutim suprotno je od rezultata u vrste *E. prunastri* gdje je učinak bio vidljiv samo kod pH vrijednosti 6. Ukoliko se koeficijent feofitinizacije razlikuje u različitih vrsta, to ne mora biti nužno zbog njihove osjetljivosti. Treba biti oprezan da to nije zbog različitog sadržaja samog klorofila *a*, što se može provjeriti primjenom više koncentracije metala. Ukoliko u obje vrste u konačnosti dođe do potpune razgradnje klorofila *a*, tada one imaju podjednaku osjetljivost na spomenuti metal (Pisani i sur, 2010).

Prethodno spomenutim parametrima pokušala sam objasniti utjecaj olova na fotobionta, a utjecaj na mikobionta pokušat ću objasniti razinom lipidnih peroksida. Naime, teški metali mogu promijeniti strukturu staničnu stijenku mikobionta lišaja ukoliko se njihovi kationi vežu za nju. Ukoliko se intracelularna razina metala poveća, dolazi do biokemijskih i strukturnih promjena koje mogu oštetiti fotosintetski aparat koji potom apsorbira više svjetlosti nego što je sposoban iskoristiti za fiksaciju CO_2, energija se prenosi na molekule kisika i nastaju ROS. Oni mogu oštetiti membranske lipide, proteine, nukleinske kiseline i klorofile. S obzirom da ROS mogu oštetiti membranske lipide, razaraju membrane mikobionta, a posljedica toga je povišenje razine lipidnih peroksida što se može kvantificirati (Álvarez i sur, 2014). Učinak teških metala na povišene razine lipidnih peroksida vidljiv je kasnije nego primjerice na koncentraciju pigmenata. Razlog tome može biti to što lišajevi kao i biljke i ostali organizmi imaju obrambene mehanizme kojima se štite od ROS-a pomoću antioksidativnih enzima (Zhou i sur, 2007), fitokelatinima i glutationa. Međutim, ti mehanizmi mogu zaštititi lišaj samo određeno vrijeme (Pisani i sur, 2011). Ako dulje vremena prevladavaju povišene koncentracije ROS koje nisu neutralizirane one dovode do oksidativnog oštećenja staničnih struktura.

Analizom rezultata u vrste *E. prunastri* vidljiv je utjecaj olova i pH vrijednosti na razinu lipidnih peroksida već prvi dan što je bilo neočekivano jer sam očekivala da će pigmenti biti osjetljiviji pokazatelj učinka olova, a na njihovu koncentraciju je olovo djelovalo tek 7. dana. Međutim nakon 7 dana olovo je utjecalo samo u kombinaciji s pH vrijednosti dok su prilikom zadnjeg uzorkovanja (14. dana) učinak imali medij, pH, kombinacija olova i medija te kombinacija sva tri čimbenika što ukazuje na složene odnose različitih faktora. Detaljna analiza pokazala je najvišu razinu lipidnih peroksida nakon prvog dana u lišajeva tretiranih olovom i prskanih destiliranom vodom ili Hoaglandovom otopinom pri obje pH vrijednosti. Najnižu razinu lipidnih peroksida imali su lišajevi pri pH vrijednosti 6 ukoliko su bili prskani destiliranom vodom ili Hoaglandovom otopinom. Učinak olova bio je očekivan jer se kationi olova mogu vezati za negativno nabijena područja u staničnoj stijenci mikobionta, time uzrokovati nastajanje ROS i povišenje razine lipidnih peroksida kao što sam već spomenula. Međutim vrijednosti razine lipidnih peroksida nakon prvog dana bile su uglavnom niže od vrijednosti koju je imala nulta kontrola osobito u tretmanima bez olova i kod pH vrijednosti 6. To može biti posljedica prekratke rehidracije lišajeva nultog dana budući da su lišajevi bili

samo prskani vodom ili medijem dok su tijekom tretmana 1. dana bili uranjani 30 minuta u vodu i medij što je omogućilo bolju rehidraciju. Naime, poznato je da razina ROS raste prilikom procesa rehidracije (Weissman, 2004) pa ukoliko proces nije bio dovršen moglo je doći do nakupljanja ROS i oštećivanja membrana što je rezultiralo povišenom razinom lipidnih peroksida. Što se tiče učinka pH, moguće je da vrlo niska pH vrijednost od 4 poremetila ionsku ravnotežu te imala negativan učinak na membrane. Nakon 7. i 14. dana samo je olovo u kombinaciji s destiliranom vodom pri pH vrijednosti 6 uzrokovalo povišenje razine lipidnih peroksida što se donekle slaže s ostalim rezultatima, na primjer nižim koeficijentom feofitinizacije i nižim vrijednostima pigmenata. Čini se da je u ove vrste toksičan učinak olova na mikobionta i fotobionta pH vrijednost 6 vrlo sličan što upućuje da je olovo toksičnije pri pH vrijednosti 6, vjerojatno zato jer je topivije odnosno dostupnije. Uzorci tretirani olovom i prskani Hoaglandovim medijem pri pH vrijednosti 6 imali su nižu razinu lipidnih peroksida od onih tretiranih olovom i vodom pri istom pH što potvrđuje da ioni iz medija smanjuju dostupnost olova, a time i njegov toksičan učinak. Međutim pri pH vrijednosti 4 došlo je do povišenja razine lipidnih peroksida kod lišajeva tretiranih i vodom i Hoaglandovim medijem u odnosu na nulto stanje te nije bilo razlike u odnosu na tretman olovom što opet može biti posljedica nedovoljne rehidracije jer su lišajevi samo prskani vodom, i/ili osjetljivosti na vrlo kiseli pH dok olovo ne pokazuje toksično djelovanje jer je pri tom pH slabije dostupno lišaju.

Kod vrste *F. caperata* samo olovo imalo je učinak na razinu lipidnih peroksida tek nakon 7. i 14. dana što potvrđuje da je ova vrsta otpornija od vrste *Evernia*. Analiza nakon prvog dana pokazala je višu razinu lipidnih peroksida u lišaja tretiranih destiliranom vodom i olovom pri obje pH vrijednosti za razliku od kontrolnih skupina. To je i očekivano zbog već navedenih razloga, međutim neobično je da je razina lipidnih peroksida bila viša i u onih lišaja koji su bili tretirani samo Hoaglandovim medijem i to pri obje pH vrijednosti. Zanimljivo je da je paralelno pri pH vrijednosti 6 došlo i do smanjenja količine pigmenata dok je s druge strane kod pH vrijednosti 4 došlo do povišenja vrijednosti. S jedne strane to može ukazivati na značajnu ulogu pH vrijednosti koja utječe na dostupnost različitih iona iz medija, ili na nedovoljnu aklimatizaciju ove vrste lišajeva što je rezultiralo različitim odgovorima. Nakon 7. dana tretman olovom i destiliranom vodom pri pH vrijednosti 6 povisio je razinu lipidnih peroksida dok je u kombinaciji s medijem došlo do sniženja oštećenja što se slaže i s

rezultatima za prethodnu vrstu. Pri pH vrijednosti 4 olovo u kombinaciji s medijem je povećalo razinu oštećenja u odnosu na medij ali vjerojatno zbog pozitivnog učinka samog medija na stabilnost membrane (Cakmak, 2014). Nakon 14. dana olovo u svim kombinacijama je malo povisilo razinu lipidnih peroksida s obzirom na kontrolne skupine, međutim značajno samo u slučaju kada su uzorci bili prskani destiliranom vodom pri pH vrijednosti 6 što se također poklapa s rezultatima u vrste *E. prunastri*.

5. ZAKLJUČAK

- U vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach tretman olovom je snizio QY_{max} nakon 1., 7. i 14. dana, a u kombinaciji s Hoaglandovom otopinom učinak olova je bio manji osobito pri pH vrijednosti 6.
- U vrste *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale tretman olovom je snizio QY_{max} nakon 1., 7. i 14. dana, osobito u kombinaciji s vodom. Hoaglandova otopina smanjila je negativan učinak olova ali tek nakon 14. dana.
- U obje vrste lišajeva tretman olovom je snizio koncentraciju klorofila *a* i klorofila *b* te karotenoida uglavnom tek nakon 14 dana tretmana. Niži koeficijent feofitinizacije izmjeren nakon 14 dana ukazuje na degradaciju klorofila *a* uslijed tretmana olovom. Hoglandova otopina smanjila je negativan učinak olova na pigmente ali u vrste *E. prunastri* to se očitovalo kod pH vrijednosti 6, a u vrste *F. caperata* pri pH vrijednosti 4.
- U vrste *E. prunastri* tretman olovom je povisio razinu lipidnih peroksida osobito pri pH vrijednosti 6. Hoaglandova otopina pH vrijednosti 6 smanjila je negativan učinak olova na oštećenje membrana nakon 7. i 14. dana.
- U vrste *F. caperata* tretman olovom pri pH vrijednosti 6 je povisio razinu lipidnih peroksida. Tretman samom Hoaglandovom otopinom povisio je razinu lipidnih peroksida pri obje pH vrijednosti nakon 1. dana te pri pH vrijednosti 6 nakon 14. dana, ali je pri pH vrijednosti 6 smanjio toksičnost olova.
- Obje vrste lišaja pokazale su se osjetljivima na tretman olovom u laboratorijskim uvjetima. U obje vrste olovo je uglavnom bilo toksičnije pri pH vrijednosti 6 što je posljedica bolje dostupnosti olova pri toj pH vrijednosti.
- U obje vrste prisutnost iona iz Hoglandove otopine smanjila je negativan učinak olova ali je efikasnost ovisila o pH vrijednosti otopine i bila je različita kod svake vrste lišaja.

6. LITERATURA

1. Álvarez R, del Hoyo A, García- Breijo F, Reig- Armiñana J, del Campo EM, Guéra A, Barreno E, Casano LM, 2012. Different strategies to achieve Pb tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. Journal of Plant Physiology 169:1797-1806.
2. Bačkor M, Kováčik J, Piovár J, Pisani T, Loppi S, 2010. Physiological aspects of cadmium and nickel toxicity in the lichens *Peltigera rufescens* and *Cladina arbuscula* subsp. *mitis*. Water, Air, and Soil Pollution 207:253-262.
3. Bačkor M, Loppi S, 2009. Interactions of lichens with heavy metals. Biologia Plantarum 53:214–222.
4. Bačkor M, Zeitková J, 2003. Effects of copper, cobalt and mercury on the chlorophyll content of lichens *Cetraria islandica* and *Flavopamelia cucullata*. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 93:175-187.
5. Bergamaschi L, Rizzio E, Giaveri G, Loppi S, Gallorini M, 2007. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. Environmental Pollution 148:468-476.
6. Boonpragob K, 2002. Monitoring physiological change in lichens: Total chlorophyll content and chlorophyll degradation. U: Nimis PL, Sheidegger C i Wolseley PA (ur.), Monitoring with lichens- monitoring lichens, 323-326. Kluwer Academic Publishers, Nizozemska.
7. Boonpragob K i Nash III TH, 1991. Physiological Responses of the lichen *Ramalina menziesii* Tayl. to the Los Angeles urban environment. Enivironmental and Experimental Botany 31:229-238.
8. Cakmak I, 2014. Major functions of calcium and magnesium in crop plants. Technological innovation for a sustainable tropical agriculture 30.
9. Carreras HA, Wannaz E, Perez CA, Pignata ML, 2003. The role of urban air pollutants on the performance of heavy metal accumulation in *Usnea amblyoclada*. Environental Research 97:50-57.
10. Conti ME, Cecchetti G, 2000. Biological monitoring: licens as bioindictors of air pollution assessment- a review. Environmental Pollution 114 472-492.
11. Davies L, Bates JW, Bell JNB, James PW, Purvis OW, 2007. Diversity and sensitivity of epiphytes to oxides of nitrogen in London. Environmental Pollution 146:299-310.
12. Duruibe JO, Ogwuegbu MOC i Egwurugwu JN, 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. International Journal of Physical Sciences 2:112-118.
13. Garty J, 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: theory and application. Critical Reviews Plant Sciences 20:309-371.

14. Garty J, Tamir O, Hassid I, Eshel A, Cohen Y, Karnieli A i Orlovsky L, 2001. Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance inlLichens exposed to air pollution. Journal of Environmental Quality 30:884–893.
15. Garty J, Tomer S, Levin T, Lehr H, 2003. Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. Environental Researsc 91:186–198.
16. Gupta J, Chandra P, 1998, Bioaccumulation and toxicity of the mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. Environmental Pollution 103:327-332.
17. Hauck M, Willenbruch K, Leuschner C, 2009. Lichen substances prevent lichens from nutrient deficiency. Journal of Chemical Ecology 35(1):71-73.
18. Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK, 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive- substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207: 604- 611.
19. Hoagland DR, Arnon DI, 1950. The water- culture method for growing plants without soil, The College of Agriculture University of California, Berkeley.
20. Jensen M, 2002. Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. U: Kranner I, Beckett RP, Varma AK (ur.), Protocols in lichenology. Springer Verlag, Berlin, 135-151.
21. Lackovičová A, Guttová A, Bačkor M, Pišút P, Pišút I, 2013. Response of *Evernia prunastri* to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. The Lichenologist 45:89–100.
22. Loppi S, Pirintsos SA, Dominicis V de, 1999. Soil contribution to the elemental composition of epiphytic lichens (Tuscany, Central Italy). Environmental Monitoring and Assessment 58:121-131.
23. Majumder S, Mishra D, Ram SS, Jana NK, Santra S, Sudarshan M, Chakraborty A, 2012. Physiological and chemical response of the lichen, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, to the urban environment of Kolkata, India. Environmental Science and Pollution Research, 20:3077–3085.
24. Marques AP, Freitas MC, Wolterbeek HT, Steinebach OM, Verburg T, De Goeij JJM, 2005. Cell-membrane damage and element leaching in transplanted *Parmelia sulcata* lichen related to ambient SO_2, temperature, and precipitation. Environmental Science and Technology. 39:2624-2630.
25. Maxwell K, Johnson GN, 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. Journal of Experimental Botany 51:659-668.
26. Monnet F, Bordas F, Deluchat V, Baudu M, 2006. Toxicity of copper excess on the lichen Dermatocarpon luridum: antioxidant enzyme activities. Chemosphere 65:1806-1813.

27. Nash III TH, 2008. Lichen biology, second edition, Cambridge University Press, Cambridge.
28. Nash TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F, 2002. Lichen flora of the greater Sonoran Desert Region, vol. 1. Lichens unlimited, Arizona State University, Tempe.
29. Paul A, Hauck M, Langenfeld-Heyser R, 2004. Ultrastructural changes in soredia of the epiphytic lichen *Hypogymnia physodes* cultivated with manganese. Environmental and Experimental Botany 52:139-147.
30. Pawlik-Skowrońska B, Purvis OW, Pirszel J, Skowroński T, 2006. Cellular mechanisms of Cu-tolerance in the epilithic lichen Lecanora polytropa growing at a copper mine. Lichenologist 38:267-275.
31. Paoli L, Corsini A, Bigagli V, Vannini J, Bruscoli C, Loppi S, 2001. Long- term biological monitoring of environmental quality around a solid waste landfill assessed with lichens. Environmental Pollution 161:70- 75.
32. Pevalek-Kozlina B, 2003. Fiziologija bilja, Profil international, Zagreb.
33. Pisani T, Munzi S, Paoli L, Bačkor M, Loppi S, 2010. Physiological effects of arsenic in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th, Fr. Chemosphere 82:963-969.
34. Pisani T, Munzi S, Paoli L, Bačkor M, Loppi S, Kováčik J, Piovár J, Loppi S, 2010. Physiological effects of mercury int he lichens *Cladonia arbuscula* subsp. *mitis* (Sandst.) Ruoss and *Peltigera rufescens* (Weiss) Humb. Chemosphere 82:1030-1037.
35. Purvis OW, 2010. Lichens and industrial pollution. U: Batty LC, Hallberg K (ur.), Ecology of industrial pollution. Cambridge University Press, Cambridge, 41-69.
36. Riga- Karandinos AN, Karandinos MG, 1998. Assessment of air pollution from a lignite power plan tin the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. The Science of the Total Environment 215:167-183.
37. Sarret G, Manceau A, Cuny D, Van Haluwyn C, Déruelle S, Hazemann J.L, Soldo Y, Eybert-Bérard L, Menthonnex JJ, 1998. Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution. Environmental Science and Technology 32:3325-3330.
38. Sett R, Kundu M, 2016. Epiphytic Lichens: Their usefulness as bio-indicators of air pollution. Donnish Journal of Research in Environmental Studies 3:17-24.
39. Sewards J, 2014. Soil pH and its effect on nutrient availability, soil microbial activity and plant health .Backyard Gardener.
40. Sharma P, Dubey RS, 2005. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17:35-52.

41. Spier L, van Dobben H, van Dort K, 2010. Is bark pH more important than tree species in determining the composition of nitrophytic or acidophytic lichen floras? Environmental Pollution 158:3607-3611.
42. Stamenković SS, Mitrović TL, Cvetković VJ, Krstić NS, Baošić RM, Marković MS, Nikolić ND, Marković VLJ, Cviljan MV, 2013. Biological indication of heavy metal pollution in the areas of Donje Vlase and Cerje (southeastern Serbia) using epiphytic lichens. Archives of Biological Sciences 65:151-159.
43. Verma S, Dubey RS, 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164:645-655.
44. Welch AR, Gillman MP, John EA, 2006. Effect of nutrient application on growth rate and competitive ability of three foliose lichen species. The Lichenologist 38:177–186.
45. Yiğittürk G, Ünal-Özakça D, Çavuşoğlu T, Kılıç KD, Uyanıkgil Y, Sukatar A, 2016. Response to cobalt toxicity in lichen *Pseudevernia furfuracea*; uptake, photosynthetic quantum yield, membrane integrity and deoxyribonucleic acid fragmentation. Istanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Tıp Dergisi 1:25-31.
46. Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta SK, Zhang PC, Yang ZM, 2007. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. Environmental and Experimental Botany 65(1):27-34.
47. http://lichenportal.org/imglib/lichens/CNALH/201602/Flavoparmelia_caperata_De.JPG
48. http://mason.gmu.edu/~jlawrey/CUE/sensitivity

7.ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marija Čuček

Datum i mjesto rođenja: 29. 4. 1991., Zagreb

Obrazovanje:

2005.-2009.	X. gimnazija „Ivan Supek“, Zagreb
2009.-2014.	Preddiplomski studij biologije, Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek Naslov završnog rada: Mehanizmi uključeni u brzo zatvaranje stupica karnivornih biljaka
2014.-2017.	Diplomski studij eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunobiologija

Radna iskustva:

Administrativni poslovi, Studentski centar, Zagreb

Dodatne informacije:

- Višegodišnje sudjelovanje u manifestaciji „Noć biologije“
- Članica Udruge studenata biologije- BIUS te voditeljica Sekcije za leptire
- Posebna Rektorova nagrada za sudjelovanje na projektu „Grabovača 2014.“
- Članica speleološke udruge "Željezničar" sa završenim prvim stupnjem (speleolog pripravnik)
- Članica Hrvatskog biospeleološkog društva (HBSD)
- Sudjelovanje na seminaru „Neuroznanost i umjetnost“ održanog u organizaciji Medicinskog fakulteta u Zagrebu 14.1.2016.
- Sudjelovanje na međunarodnoj radionici „Lichens as a tool for air pollution research“ održanoj na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu 26.-28. 9. 2016.