Antioksidacijski odgovor vrste Lemna gibba na djelovanje ionskog koloidnog srebra

Barišić, Lara

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:220393

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Lara Barišić

Antioksidacijski odgovor vrste *Lemna gibba* na djelovanje ionskog koloidnog srebra

Diplomski rad

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Diplomski rad
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Antioksidacijski odgovor vrste *Lemna gibba* na djelovanje ionskog koloidnog srebra

Lara Barišić

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Mentor: Doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac
Neposredni voditelj: dr.sc. Martina Varga

Kratki sažetak:
Vodena leća *Lemna gibba* L. izložena je djelovanju različitih koncentracija ionskog koloidnog srebra u hranjivoj otopini. Akumulacija srebra u tkivu vrste *L. gibba* uzrokovala je oštećenje fotosintetskog sustava, smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata te smanjenje koncentracije proteina. Aktivnosti glutation-reduktaze i glutation-*S*-transferaze su se smanjivale povećavanjem koncentracije ionskog koloidnog srebra, dok su se aktivnosti ostalih antioksidativnih enzima (askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, katalaze i superoksid-dismutaze) povećavale. Koncentracije glavnih pokazatelja oksidacijskog stresa, vodikovog peroksida i produkata lipidne peroksidacije, povećavale su se s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog srebra. Ionsko koloidno srebro uzrokuje oksidacijski stres u stanicama vrste *L. gibba* čiji se intenzitet povećava s porastom koncentracije ionskoga koloidnoga srebra u hranjivoj otopini i u samoj biljci. Vodena leća *L. gibba* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje štetnog djelovanja metala na biljke u vodenim ekosustavima.

Broj stranica: 40
Broj slika: 15
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 114
Jezik izvornika: Hrvatski
Ključne riječi: *Lemna gibba*, srebro, oksidacijski stres, antioksidacijski odgovor

Datum obrane: 12.9.2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. dr. sc. *Elizabeta Has-Schön*, redoviti profesor
2. dr. sc. *Ivna Štolfa Čamagajevac,* docent
3. dr sc. *Janja Horvatić,* izvanredni profesor

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Master Thesis
Department of Biology
Graduate Study of Biology

Scientific area: Natural science
Scientific Field: Biology

Antioxidative response of *Lemna gibba* exposed to ionic colloidal silver

Lara Barišić

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek
Supervisor: Ph. D. *Ivna Štolfa Čamagajevac*
Assistant in charge: Ph. D. *Martina Varga*

Summary:
Lemna gibba plants were exhibited to different concentrations of ionic colloidal silver in the nutrient solution. The accumulation of silver in tissues of *L. gibba* caused damage to the photosynthetic system, reduced the concentration of photosynthetic pigments and proteins. Activities of glutathione reductase and glutathione-*S*-transferase were diminished by increasing concentrations of ionic colloidal silver, while activities of other antioxidant enzymes (ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase and superoxide dismutase) were increased. Concentrations of the main oxidative stress indicators, hydrogen peroxide and lipid peroxidation, were increased along with the increase of ionic colloidal silver concentration. Ionic colloidal silver caused oxidative stress in the cells of *L. gibba* whose intensity increases with increasing concentrations of ionic colloidal silver in the nutrient solution and also in the plant itself. *L. gibba* can be used as a model plant for further studies of toxic metal effects on plants in aquatic ecosystems.

Number of pages: 40
Number of figures: 15
Number of tables: 1
Number of references: 114
Original in: Croatian
Key words: *Lemna gibba*, silver, oxidative stress, antioxidative response

Date of thesis defense: 12.9.2016.

Reviewers:
1. Ph. D. *Elizabeta Has-Schön*, Full Professor
2. Ph. D. *Ivna Štolfa Čamagajevac*, Asisstant Professor
3. Ph. D. *Janja Horvatić*, Associate Professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and National and University Library in Zageb.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac na stručnoj pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskoga rada. Posebno zahvaljujem dr. sc. Martini Vargi na strpljenju, suradnji i nesebičnoj pomoći tijekom pisanja diplomskoga rada. Veliko hvala dugogodišnjoj prijateljici i profesorici hrvatskoga jezika i književnosti Antoniji Huljev na stručnoj pomoći i lektoriranju diplomskoga rada.

Veliko hvala svim dragim kolegama na prekrasno provedenom vremenu tijekom studija. Od srca hvala svim dragim prijateljima.

Najveća zahvala mojim roditeljima koji su mi omogućili studiranje, hvala na razumijevanju, strpljenju i podršci tijekom cijelog studija.

SADRŽAJ

1. UVOD 2

1.1. Pokazatelji oksidacijskoga stresa 2

1.1.1. Vodikov peroksid 2

1.1.2. Lipidna peroksidacija 3

1.2. Antioksidacijski odgovor biljke 3

1.3. Enzimske komponente antioksidacijskoga sustava 4

1.4. Srebro – osnovne značajke i značaj za floru vodenoga ekosustava 6

1.5. *Lemna gibba* L. kao model istraživanja – biologija vrste 8

1.6. Cilj diplomskog rada 9

2. MATERIJALI I METODE 10

2.1. Kultura vodene leće *Lemna gibba* L. 10

2.2. Određivanje utjecaja ionskoga koloidnoga Ag na vodenu leću (*Lemna gibba* L.) 10

2.3. Određivanje koncentracije srebra 11

2.4. Određivanje koncentracije proteina 11

2.5. Određivanje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* 12

2.6. Komponente antioksidacijskoga odgovora 13

2.6.1. Enzimske antioksidacijske komponente 13

2.6.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze 13

2.6.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze 13

2.6.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze 14

2.6.1.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze 14

2.6.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-*S*-transferaze 14

2.6.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze 15

2.7. Pokazatelji oksidacijskoga stresa 16

2.7.1. Određivanje koncentracije vodikovoga peroksida 16

2.7.2. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije 16

2.8. Statistička obrada 17

3. REZULTATI 18

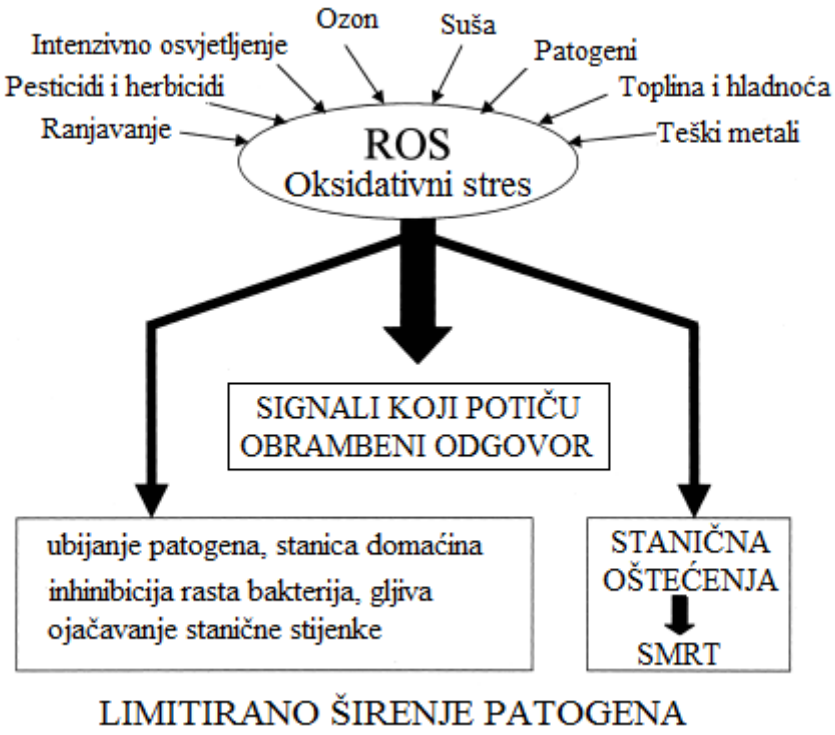
3.1. Koncentracija proteina 18

3.2. Koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* 18
3.2.1. Omjer klorofila *a* i klorofila *b* 20
3.3. Komponente antioksidacijskoga odgovora 20
3.3.1. Enzimske komponente 20
3.3.1.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze 20
3.3.1.2. Aktivnost gvajakol-peroksidaze 21
3.3.1.3. Aktivnost katalaze 22
3.3.1.4. Aktivnost glutation-reduktaze 23
3.3.1.5. Aktivnost glutation-*S*-transferaze 23
3.3.1.6. Aktivnost superoksid-dismutaze 24
3.3.2. Pokazatelji oksidacijskoga stresa 25
3.3.2.1. Koncentracija vodikovoga peroksida 25
3.3.2.2. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije 25
3.4. Koncentracija srebra u tkivu *L.gibba* 26
4. RASPRAVA 27
5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK 32
6. LITERATURA 33

1. UVOD

Biljke se, zbog važnosti u ekosustavima i velike primarne produkcije, smatraju najbitnijom karikom hranidbenoga lanca. Tijekom životnoga ciklusa na njih utječu brojni abiotički i biotički čimbenici. U abiotičke čimbenike ubrajaju se svjetlost, temperatura, salinitet, voda i vlažnost, strujanje zraka, promjene u koncentraciji i dostupnosti nutrijenata, zasjena, ozon i anaerobni stres. Biotički čimbenici uključuju intraspecijske i interspecijske odnose među jedinkama, infekcije patogenima (bakterijama, gljivama, virusima i nematodama) te biljojede (Suzuki i sur., 2014). Osim abiotičkih i biotičkih čimbenika, na biljke u velikoj mjeri utječe i antropogeno djelovanje na okoliš. Antropogeni uzročnici onečišćenja okoliša za razliku od prirodnih onečišćivača imaju dalekosežnije i ozbiljnije posljedice koje se ogledaju u eroziji tla, povećanju ozonske rupe zbog nedostatnoga smanjenja stakleničkih plinova, klimatskim promjenama koje vode k izumiranju pojedinih biljnih i životinjskih vrsta, zagađenju pitkih voda i mora, korištenju fosilnih goriva, kemijskim onečišćivačima zraka, pesticidima i toksinima koji dospijevaju u okoliš (Gaspar i sur., 2002). Nutrijenti potrebni za rast i razvoj biljke mogu se podijeliti na esencijalne i neesencijalne elemente. Srebro (Ag) pripada neesencijalnim elementima, kako za animalne, tako i za biljne organizme. Uz arsen (As), kadmij (Cd) i nikal (Ni), Ag je jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima, neovisno o tome radi li se o otopljenom ili ionskom obliku (Fisher i sur., 1984). Ioni Ag, pohranjeni u vakuolama i staničnim stijenkama, u interakcijama s aminokiselinama, nukleinskim kiselinama i tiolnim skupinama enzima i proteina neophodnih za rast i razvoj biljaka, inhibiraju staničnu diobu. Ioni Ag u biljkama uzrokuju inaktivaciju membranskih proteina, ometaju sustav prijenosa elektrona, inhibiraju respiratorne enzime što potiče prekomjernu akumulaciju reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *reactive oxygen species*, ROS) te pojavu oksidacijskog stresa (Chudobova i sur., 2013). Prilagodba na promjene okoliša neophodna je za rast i preživljavanje biljaka, stoga je ROS, kao središnja komponenta adaptacije, podrobno proučavana u brojnim studijama. ROS ima dvojaku ulogu u odgovoru biljke na uvjete u okolišu (*Slika 1*): sudjeluju u signalizaciji aktivacije obrambenoga odgovora biljke na nepovoljne uvjete u okolišu (Dat i sur., 2000), dok prekomjerna akumulacija ROS-a u stanicama dovodi do oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (skraćeno DNK, eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA), proteina i lipida (Gill i Tuteja, 2010). Stanični antioksidacijski sustav sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti koje

sudjeluju u izravnom uklanjanju i/ili obnavljaju oksidirane molekule (Karuppanapandian i sur., 2011).



Slika 1. Oksidacijski stres, povećanje koncentracije ROS-a (preuzeto i modificirano s Gaspar i sur., 2002).

1.1. Pokazatelji oksidacijskoga stresa

1.1.1. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) umjereno je reaktivan ROS koji nastaje jednovalentnom redukcijom superoksidnoga radikala (Gill i Tuteja, 2010). Ima prilično dug životni vijek (1ms), za razliku od ostalih ROS-a (Gill i Tuteja, 2010), te je stoga jedan od najstabilnijih ROS-a s fiziološkom funkcijom u stanici (Apel i Hirt, 2004; Foyer i Noctor, 2009). H_2O_2 nastaje kao proizvod djelovanja urat oksidaze, glukoza oksidaze, D-aminokiselinske oksidaze ili superoksid dismutaze. Tijekom normalnoga metabolizma H_2O_2 nastaje Mehlerovom reakcijom u kloroplastima, prijenosom elektrona u mitohondrijima i fotorespiracijom u peroksisomima, a stresni čimbenici potiču stvaranje veće količine H_2O_2 (Neill i sur. 2002). H_2O_2 lako može prolaziti kroz staničnu membranu, a u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale (Štefan i sur., 2007). Razgrađuje se djelovanjem katalaze, glutation peroksidaze te pojedinih drugih peroksidaza (Štefan i sur., 2007). H_2O_2 ima dvojaku ulogu u stanicama: pri niskim koncentracijama u ulozi je signalne molekule u procesu pokretanja mehanizama prilagodbe, dok pri visokim koncentracijama dovodi do programirane smrti

stanica (Gill i Tuteja, 2010). H_2O_2 također ima ulogu ključnoga regulatora većine fizioloških procesa, poput senescencije (Peng i sur., 2005), fotorespiracije i fotosinteze (Noctor i Foyer, 1998), pokretanja puči (Bright i sur., 2006), staničnoga ciklusa (Mittler i sur., 2004), rasta i razvoja (Foreman i sur., 2003).

1.1.2. Lipidna peroksidacija

Kada je riječ o oksidacijskom stresu i nakupljanju ROS-a, daleko najštetnije posljedice nastaju procesom lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija složena je lančana reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina potaknuta prekomjernim nakupljanjem ROS-a, ali i reaktivnih dušikovih spojeva. U sastavu lipida svih bioloških membrana nalaze se višestruko nezasićene masne kiseline koje su jako osjetljive na oštećenja uzrokovana ROS-om. U kontroliranim uvjetima u stanicama se proizvode oksidirani produkti polinezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) pod utjecajem enzima koji djeluju kao medijatori oštećenja **(**Farmer i Mueller, 2013). Zasićene masne kiseline i masne kiseline koje sadrže jednu dvostruku vezu, mnogo su otpornije prema djelovanju ROS-a nego PUFA-e. Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH•), međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. Proces lipidne peroksidacije sastoji se od triju stupnjeva: inicijacije, propagacije i terminacije (Farmer i Mueller, 2013). Posljedice peroksidacije lipida su smanjenje fluidnosti membrana, povećana propusnost membrana za molekule čiji prijenos u normalnim uvjetima nije moguć bez prisutnosti specifičnih kanala, oštećenje membranskih proteina, inaktivacija enzima, receptora i ionskih kanala (Gill i Tuteja, 2010; Demidchik, 2015).

1.2. Antioksidacijski odgovor biljke

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama dovode do odgađanja ili inhibicije oksidacije supstrata (Štefan i sur., 2007). Kada se koncentracija ROS-a neznatno poveća aktivira se antioksidacijski sustav koji ih učinkovito razgrađuje, ali kada stanica izgubi nadzor nad njihovim stvaranjem i razgradnjom, ROS uzrokuje stanična oštećenja. Biljke posjeduju vrlo učinkovit antioksidacijski obrambeni sustav (Sarvajeet i Narendra, 2010). Antioksidansi inaktiviraju slobodne radikale donirajući im elektrone i tako zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje (Štefan i sur., 2007). Djelovanje antioksidansa obuhvaća: utjecanje na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika, uklanjanje

metalnih iona, uklanjanje ciljnih ROS-a kao superoksida ili vodikova peroksida, uklanjanje slobodnih radikala i uklanjanje singletnoga kisika (Štefan i sur., 2007). Antioksidacijski mehanizmi nisu ograničeni samo na stanične organele već su prisutni u manjoj mjeri i u citoplazmi i apoplastu. Komponente antioksidacijskoga obrambenog sustava dijele se na enzimske i neenzimske antioksidanse. Najdjelotvorniji enzimski antioksidansi u biljakama obuhvaćaju superoksid-dismutazu, katalazu i enzime glutation-askorbatnog ciklusa. Neenzimski antioksidansi uključuju glutation (GSH), askorbinsku kiselinu, vitamin E, karotenoide, tiolne antioksidanse (glutation, tioredoksin i lipoičnu kiselinu), flavonoide te druge fenolne spojeve (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010).

1.3. Enzimske komponente antioksidacijskoga sustava

Katalaza (engl. *catalase* – CAT, EC 1.11.1.6) ili H_2O_2-oksidoreduktaza je tetramerni enzim, građen od četiriju polipeptidnih lanaca, svaki sadrži preko 500 aminokiselina i ima molekularnu masu od 60 kDa (Halliwell i Gutteridge 2007). Svaki taj lanac sadrži atom Fe u svom aktivnom mjestu. U većini eukariotskih stanica CAT je primarno lokalizirana u peroksisomima (Subramani 1993). U peroksisomima se odvija nekoliko ključnih metaboličkih procesa kao što su β-oksidacija masnih kiselina, sinteza kolesterola, metabolizam purina, poliamina, aminokiselina (Singh 1997). CAT katalizira razlaganje vodikovoga peroksida (H_2O_2) na vodu (H_2O) i kisik (O_2) neophodna za detoksikaciju ROS-a (Mittler, 2002). Jedna molekula CAT može reducirati oko 6 milijuna molekula H_2O_2 u jednoj minuti stoga ovaj enzim predstavlja neizostavnu komponentu antioksidacijskoga obrambenog sustava (Gill i Tuteja, 2010).

Superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase* – SOD, EC 1.15.1.1) metaloenzim, najučinkovitiji je unutarstanični antioksidans prisutan u svim aerobnim organizmima, u svim subcelularnim odjeljcima koji su skloni stvaranju ROS-a uslijed oksidacijskoga stresa (Gill i Tuteja, 2010). Obitelj SOD uključuje tri enzima od kojih svaki ima jedan metal u svom aktivnom mjestu (Miller, 2012). Fe-SOD lokalizirane su u kloroplastima, Mn-SOD u mitohondrijima i Cu/Zn-SOD u kloroplastima, peroksisomima i citosolu (del Rio i sur.,1996). SOD uklanja $O_2^{\bullet-}$ katalizirajući njegovu dismutaciju. Jedan anion $O_2^{\bullet-}$ reducira se do H_2O_2, a drugi se oksidira do O_2 (Bafana i sur., 2011). Uklanjanjem superoksidnoga radikala smanjuje se rizik nastanka izuzetno reaktivnih hidroksilnih radikala (OH•) u metalima kataliziranoj Haber-Weissovoj reakciji. Ova je reakcija 10 000 puta brža nego spontane reakcije dismutacije (Gill i Tuteja, 2010).

Gvajakol-peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase* – GPOX, EC 1.11.1.7) pripada biljnim peroksidazama skupine III (Mathé i sur., 2010). Peroksidaze III igraju važnu ulogu u obrani biljnih stanica od štetnoga djelovanja ROS-a. Ovi su enzimi glikoproteini koji sadrže hem u strukturi i sudjeluju u brojnim fiziološkim procesima u biljkama: katabolizam auksina, promjene stanične stijenke (lignifikacija, suberinizacija), zacjeljivanje rana, sustav obrane (Gaspar i sur., 1991, Asada 1999). Peroksidaza također sudjeluje i u nadziranju razine H_2O_2 i štite stanice od štetnoga utjecaja oksidacijskoga stresa (del Rio i sur., 1998). Peroksidaze kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije između H_2O_2 i različitih reduktanata. GPOX razgrađuje indol-3-octenu kiselinu (IAA)- te ima ulogu u biosintezi lignina i obrani biljnih stanica od biotičkoga stresa (Asada, 1999**)**. GPOX preferira aromatske elektron donore kao što su gvajakol i pirogalol (Asada, 1999). Oksidacijom gvajakola u prisutnosti H_2O_2 i GPOX nastaje tetragvajakol, spoj žuto-smeđe boje. Aktivnost GPOX znatno varira ovisno o biljnim vrstama te stanju stresa (Milone i sur., 2003).

Askorbat-peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase* – APX, EC 1.11.1.11) ima esencijalnu ulogu u uklanjanju ROS-a i zaštiti stanica kod viših biljaka, algi, euglena i drugih organizama. APX je uključena u reakcije uklanjanja H_2O_2 u askorbat-glutationskom ciklusu koristeći askorbat kao elektron donor (Gill i Tuteja, 2010). Reakcija koju katalizira je prijenos elektrona s askorbata na peroksid, stvarajući dehidroaskorbat i vodu kao produkte (Raven, 2000). Obitelj APX sastoji se od najmanje pet različitih izoformi, ovisno o odjeljku u stanici gdje se nalaze, pa tako postoji tilakoidna APX (tAPX), izoforma u membranama glioksisoma (gmAPX) te u stromi kloroplasta (sAPX) i citosol (cAPX) (Noctor i Fojer, 1998). APX ima veći afinitet za H_2O_2 nego CAT (μM raspon koncentracije) i GPOX (mM raspon koncentracije) i zbog toga ima ključnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru i pri nižim koncentracijama H_2O_2 (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation-reduktaza (engl. *glutathione reductase* – GR, EC 1.6.4.2) je flavoprotein pronađen u prokariotima i eukariotima (Romero-Puertas i sur., 2004). Važna je komponenta askorbat-glutationskog ciklusa u kojem održava reducirano stanje glutationa (GSH) tako što koristi reduciranu energiju (NADPH) **(**Gill i Tuteja, 2010). Čak i kada su prisutne velike količine H_2O_2 ovaj enzim veoma je učinkovit u održavanju staničnih rezervi glutationa. Intracelularni odnos oksidiranoga i reduciranoga glutationa (GSSG/GSH) odraz je oksidacijskoga stanja stanice i pokazatelj staničnih detoksikacijskih kapaciteta (Gill i Tuteja, 2010). Pretežno je lokalizirana u kloroplastima, no mala količina ovoga enzima nalazi se u mitohondrijima i citosolu (Edwards i sur., 1990, Creissen i sur., 1994). Oksidirani glutation (GSSG) sastoji se od dviju molekula GSH koje su povezane disulfidnim mostom. U prisutnosti

NAD(P)H enzim GR katalizira reakciju redukcije GSSG u GSH (Gill i Tuteja, 2010; Anjum i sur., 2012).

Glutation-*S*-transferaza (engl. *Glutathione-S-transferase* – GST, EC 2.5.1.18) enzim je koji pripada velikoj i raznolikoj skupini enzima koji kataliziraju konjugaciju elektrofilnoga ksenobiotičkoga supstrata s tripeptidnim glutationom (GSH; γ-glu-cys-gly) (Gill i Tuteja, 2010). Biljni GST ima funkciju u detoksifikaciji herbicida, hormonskoj homeostazi, metabolizmu tirozina, detoksifikaciji H_2O_2, regulaciji apoptoze i odgovoru biljaka na abiotički i biotički stres (Dixon i sur., 2010). Noctor i sur. (2002) utvrdili su da GST ima potencijal za uklanjanje citotoksičnih i genotoksičnih spojeva koji mogu oštetiti DNA, RNA i proteine. Uglavnom su lokalizirani u citosolu (Sheehan i sur., 2001), ali pronađene su i izoforme u plastidima, jezgri i apoplastu (Gill i Tuteja, 2010).

1.4. Srebro – osnovne značajke i značaj za floru vodenoga ekosustava

Teški metali poznati su zagađivači u akvatičkim ekosustavima. Akvatički su ekosustavi vrlo osjetljivi na zagađivače zbog vrlo niske biomase na različitim trofičkim razinama što može dovesti do akumulacije teških metala (Singh i sur., 2006). Dakle, vodene su biljke često prve u doticaju s metalima u vodenom okolišu (Singh i sur., 2006). Nedavno je identificfirano nekoliko slobodno-plutajućih vodenih biljnih vrsta, ključnih u biomonitoringu teških metala te mogu koristiti u postupcima fitoremedijacije koja se koristi za poboljšanja kakvoće voda (Ali i sur., 1999). Nakupljanje teških metala izaziva niz simptoma koji su uvijek povezani s vidljivim oštećenjima na vodenim biljkama, npr. otežan rast, inhibicija fotosintetskih enzima, oksidacijski stres i ultrastrukturna oštećenja (Ding i sur., 2007). U prirodnim vodama, gdje je kontaminacija srebrom od velike važnosti, dokaza o toksičnosti otopljenim ionima srebra manje je nego u laboratorijskim testiranjima zbog bogate mogućnosti koloidnoga vezanja i stvaranja kompleksa srebra s različitim reaktantima (Shafer i sur., 1998).

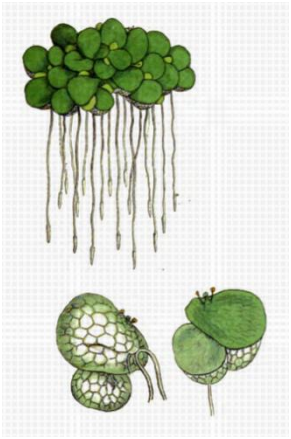
Srebro (Ag) pripada neesencijalnim elementima, kako za animalne, tako i za biljne organizme. Uz arsen, kadmij i nikal, Ag je jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima, neovisno o tome radi li se o otopljenom ili ionskom obliku (Fisher i sur., 1984). Percepcija je štetnih učinaka srebra već dugo u skladu s činjenicom da se u laboratorijskim istraživanjima toksičnosti koristi $AgNO_3$ koji se lako otapa i otpušta otrovan slobodni Ag^+ ion (Benoit i sur., 1994). Godišnje se u okoliš iz industrijskih otpada i emisija ispusti otprilike 2500 tona srebra, od čega se 150 tona ispušta u mulj iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda i 80 tona u površinske vode (Smith i Carson, 1977). U vodene ekosustave srebro ulazi ponajviše

antropološkim djelovanjem: kompleksi s tiosulfatima iz tekućina za razvijanje fotografija koje kao otpatci odlaze u kanalizacije, kanalizacijski mulj, biocidi, emisija tijekom topljenja rude, izgaranje ugljena (Xu i sur., 2010). Najveći dio Ag dobiva se iz ruda Ag koje se često javljaju zajedno s rudama olova, bakra i cinka kao sulfidi i oksidi. U biljne stanice dospijeva transporterom, sulfat/tiosulfat transportnim kompleksom ili pasivnim transportom, kompleksom s klorom (Fortin i Campbell, 2001). Unutar stanice stvara komplekse s aminokiselinama i nukleotidima, kao i s makromolekulama koje ih sadrže (Fortin i Campbell, 2001). Ioni Ag utječu na proces sinteze fotosintetskih pigmenata što uz izravno oštećenje fotosintetskoga aparata dovodi do smanjenja fotosintetske aktivnosti (Xu i sur., 2010). Također, dovode do narušavanja ravnoteže makronutrijenata kao što su N i P, ali i mikronutrijenata kao što su kalij, cink, bakar i željezo (Jiang i sur., 2012). Danas se koncentracija Ag u vodenim staništima povećava kao posljedica sve veće upotrebe proizvoda koji sadrže nanočestice Ag (engl. *silver nanopasticles*, AgNP) (Liu i Hurt, 2010). Nanočestice Ag jedan su od najčešće korištenih nanomaterijala koje su našle upotrebu u elektroničkim napravama, u pakiranju prehrambenih proizvoda, u tekstilnim proizvodima koji djeluju baktericidno, u medicinskim uređajima, u zavojima te kao dezinficijens vode (Liu i Hurt, 2010). Na stotine su proizvoda koji sadrže nanočestice Ag trenutno na tržištu i njihov broj ubrzano raste. Zbog sve veće primjene nanočestica Ag i sve veće količine srebrnih nanočestica akumuliraju se u otpadnim vodama, a na kraju i u rijekama i potocima, što ishodi neočekivanim toksičnim učinkom na čitav vodni ekosustav (Liu i Hurt, 2010). Koloidi nanosrebra sadrže Ag u trima oblicima: kruti Ag^0, slobodni Ag^+ oblik i njegove komplekse te Ag^+ adsorbiran na površinu koloida (Liu i Hurt, 2010; Lowry i sur., 2012). Poznato je da ioni Ag ulaze u metaboličku interakciju s Cu i selenom i vežu sulfhidrilne skupine fotosintetskih enzima (kao što je RUBISCO) što može dovesti do njihove inaktivacije (Ouzounidou i Constantinidou, 1999). Ag također tvori komplekse s aminokiselinama, pirimidinima, purinima i nukleotidima, kao i s njihovim odgovarajućim makromolekularnim oblicima (Ouzounidou i Constantinidou, 1999). Mehanizam djelovanja iona Ag uključuje inaktivaciju membranskih proteina, ometanje sustava prijenosa elektrona, inhibiciju respiratornih enzima što potiče prekomjernu akumulaciju ROS-a i pojavu oksidacijskoga stresa (Chudobova i sur., 2013).

1.5. *Lemna gibba* L. kao model istraživanja – biologija vrste

Vodene su leće male cvjetnice, monokotiledoni, koje se pojavljuju u stajaćicama i tekućicama diljem svijeta do nadmorske visine od 2000 m (Landolt, 1986). Pripadaju porodici *Lemnaceae* koja obuhvaća 38 vrsta u četirima rodovima: *Lemna, Spirodela, Wolffia* i *Wolffiella*. Ova je porodica obično na margini botaničkih zanimljivosti jer pripada u najjednostavnije i najmanje cvjetnice. No usprkos sitnoj i jednostavnoj građi vodena je leća bitna slatkovodna vrsta. Mala veličina, brzo, uglavnom vegetativno razmnožavanje, formiranje genetski jedinstvenih klonova, jeftin i lak uzgoj osobine su koje ovu vrstu čine pogodnim laboratorijskim subjektom u istraživanjima fotoperioda, morfogeneze lista, toksikološkoga učinka raznih tvari, utjecaja UV zračenja, oštećenja na biljkama uzrokovana ozonom i sl. (Jansen i sur., 2001). Upotrijebljavaju se kao istraživački organizmi za studije u fiziologiji, genetici, ekologiji, monitoringu okoliša i ekotoksikologiji. Za laboratorijska istraživanja najčešće se upotrebljavaju vrste *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Spirodela polyrrhiza* i *Wolffia arrhiza* (Les i sur., 2002). Vodene leće u prirodi žive na staništima koja imaju pH vrijednost prirodne vode u rasponu od 3,5 do 10,5 (Landolt, 1986). Temperaturni je optimum za većinu vrsta iz porodice *Lemnaceae* između 20 i 30° C, a ovisi o intenzitetu svjetlosti i sastavu podloge (osobito o sadržaju šećera) (Landolt, 1986). Vodena je leća nezahtjevna biljka kojoj odgovara mirna voda pa je zato u prirodi najčešće srećemo u jezerima, barama i mirnijim potocima (Landolt, 1986).

Lemna gibba L. ili grbasta vodena leća rasprostranjena je po Europi, Africi, Sjevernoj i Južnoj Americi i Aziji. Tijelo biljke jednostavne je građe, duljine oko 1 cm i promjera do 5 mm (*Slika 2*). Korijenje je u obliku tankih niti duljine do 1 cm. Kako se radi o flotantnoj vrsti, često stvara guste nakupine na vodenim površinama zajedno s drugim vrstama vodenih leća. Postoji teorija po kojoj širi dio biljke (distalni dio) odgovara listu, a uži (proksimalni dio) reduciranoj osi izdanka. Proksimalni se dio tako naziva zato što je kod vegetativnoga razmnožavanja taj dio biljke-kćeri bliže majčinskoj biljci. Na proksimalnom dijelu biljnoga tijela nalazi se sa svake strane po jedna tvorba nazvana reproduktivni džep u kojemu se nalazi meristemska regija. Unutar tih tvorbi započinje proces vegetativnoga razmnožavanja pupanjem ili razvoj cvijeta. U hranidbenoj otopini optimalnoga sastava vegetativno razmnožavanje je gotovo eksponencijalno (Landolt, 1986). Vodene leće cvjetaju rijetko i samo u optimalnim uvjetima (Krajnčić i Devidê, 1980). Mnoge vrste iz te porodice imaju sposobnost akumulacije nekih tvari (npr. teških metala) u količinama koje prelaze njihove fiziološke potrebe pa se stoga rabe i za pročišćavanje voda (Hillman i Culley, 1978, Bionardi i sur., 1994).



Slika 2. Ilustracija grbaste vodene leće, *Lemna gibba* L. (WEB1).

1.6. Cilj diplomskog rada

Cilj je ovoga istraživanja utvrditi utjecaj različitih koncentracija ionskoga koloidnoga srebra u hranjivoj otopini na pojavu oksidacijskoga stresa u stanicama *L. gibba* te utvrditi promjene u antioksidacijskom odgovoru biljke.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kultura vodene leće *Lemna gibba* L.

U ovom istraživanju korištena je grbasta vodena leća *Lemna gibba* L.. Uzorkovana je 2006. godine u drenažnim kanalima na području istočne Hrvatske, sterilizirana prema Krajnčić i Davidé (1980) te je od tada kultivirana u Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Kulture ove vrste uzgajane su u modificiranoj tekućoj hranjivoj otopini po Pirsonu i Seidlu (1950) (*Tablica 1*). Hranjivoj je otopini zatim podešen pH pomoću 0,1 M KOH te su otopine sterilizirane u autoklavu na temperaturi od 121^{0}C i tlaku od 0,1 MPa tijekom 15 minuta. Biljke su uzgajane u uzgojnoj komori pri sljedećim uvjetima: temperatura od 25±1° C, fotoperiod od 16 sati svjetla i 8 sati tame te količini svjetlosti od 70 μmol m^{-2} s^{-1}. Kulture su održavane redovnim presađivanjem u razmaku od četrnaest dana, prilikom čega je jedna zdrava kolonija prebačena u Erlenmeyerovu tikvicu sa svježom sterilnom hranjivom otopinom.

Tablica 1. Sastav modificirane tekuće hranjive otopine po Pirsonu i Seidlu (1950)

Makroelementi	**mg L^{-1}**	**mmol L^{-1}**
KNO_3	445	4,41
KH_2PO_4	200	1,47
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	300	1,21
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	804	5,46
Mikroelementi	**mg L^{-1}**	**mmol L^{-1}**
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	0,3	0,0015
H_3BO_3	0,5	0,0081
Na_2-EDTA $\cdot 2\ H_2O$	18,6	0,049
Fe-citrat	5	0,02
Organski dodatci	**g L^{-1}**	**mmol L^{-1}**
Saharoza	10	29,2
Asparagin	0,1	0,66

2.2.Određivanje utjecaja ionskoga koloidnoga Ag na vodenu leću (*Lemna gibba* L.)

Za određivanje utjecaja ionskoga koloidnoga Ag na vodenu leću u hranjivoj otopini korištene su kulture uzgajane pri uvjetima opisanim u prethodnom poglavlju. Sastav korištene hranjive otopine prikazan je u *tablici 1*. Za tretiranje vodene leće korištena je komercijalno dostupna otopina ionskoga koloidnoga Ag proizvođača iSrebro Hrvatska. Biljke su tretirane ionskim

koloidnom Ag koncentracija 100, 200, 500 i 1000 µg/L. U svaku Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 0,6 g svježe tvari biljaka. Kontrolne biljke uzgajane su u istim uvjetima, ali bez tretmana ionskim koloidnim Ag. Uzorci biljaka za analize prikupljeni su 48 sati nakon početka tretmana. Kulture vodene leće su u uzgojnoj komori raspoređene nasumično kako bi se umanjila prostorna razlika u temperaturi i osvjetljenju.

2.3. Određivanje koncentracije srebra

Koncentracija Ag u osnovnoj otopini određena je apsorpcijskom i/ili emisijskom tehnikom atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom (AAS). U svrhu kalibracije AAS, pripremljeno je niz standardnih otopina poznatih koncentracija analiziranoga elementa. Rezultati analiza izraženi su u µg mL^{-1} ili mg L^{-1} (prijašnje oznake ppm) i označavaju koncentraciju ispitivanoga elementa u osnovnoj otopini. Očitane vrijednosti koncentracije analiziranih elemenata preračunate su u sadržaj elemenata u mg/kg (Lisjak i sur., 2009).

2.4. Određivanje koncentracije proteina

Biljni materijal je, nakon ispiranja destiliranom vodom i sušenja papirnatim ubrusima, prebačen u porculanski tarionik te usitnjen u tekućem dušiku uz dodatak polivinil pirolidona (PVP). PVP je korišten jer veže polifenole koji ometaju mjerenje aktivnosti enzima. Usitnjeno tkivo prebačeno je u prethodno izvaganu kivetu. Masa svježe tvari potrebna za ekstrakciju topljivih proteina iznosila je oko 0,2 g. Tkivo je ekstrahirano pomoću 1 ml hladnoga ekstrakcijskoga pufera tijekom 15 minuta na ledu. Pufer je sadržavao 0,1 M K_2HPO_4, 0,1 M KH_2PO_4, 5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA, a pH je podešen na 7,0. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 20 000 g pri temperaturi 4°C. Supernatant je odvojen u zasebnu čistu kivetu. Talog je reekstrahiran dodatkom 1 ml navedenoga pufera. Spojeni supernatanti korišteni su za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze, askorbat-peroksidaze i katalaze. Ekstrakcijski pufer korišten za pripremu sirovih ekstrakata za određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze, gluation-reduktaze i superoksid-dismutaze sadržavao je 0,1 M K_2HPO_4, 0,1 M KH_2PO_4 i 1 mM EDTA, pH 7,0. Proteinski ekstrakti pripremljeni su u trima ponavljanjima. Koncentracija proteina mjerena je spektrofotometrijskom metodom prema Bradfordu (1976). Metoda se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije od 465 do 595 nm zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Comassie Brilliant Blue,* CBB) na proteine. Koncentracija proteina pojedinoga

uzorka izračunata je baždarnom krivuljom dobivenom mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja goveđega albuminskoga seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija. Konačna koncentracija proteina izražena je u jedinici μg/g sv. tv. Bradford radna otopina sastoji se od 95%-tnoga etilnoga alkohola, Bradford matične otopine, 88%-tne ortofosforne kiseline, i destilirane vode. Za Bradford matičnu otopinu 87,5 mg CBB G-250 otopi se u 25 ml 95%-tnoga etilnoga alkohola i doda 50 ml 88%-tne ortofosforne kiseline.

2.5. Određivanje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* biljno je tkivo usitnjeno do finoga praha u tekućem dušiku uz dodatak magnezijeva hidrogenkarbonata ($MgHCO_3$). Oko 0,1 g usitnjenoga tkiva odvagano je u prethodno izvagane i označene plastične kivete od 2 ml. Pigmenti su ekstrahirani 15 minuta na ledu u 1 ml hladnoga acetona. Nakon ekstrakcije centrifugirani su 10 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4°C. Supernatant je dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom na navoj, a na talog je ponovno dodano 1 ml acetona. Postupak reekstrakcije ponovljen je četiri do pet puta, do potpunoga obezbojenja biljnoga tkiva u talogu. Volumen supernatanata izmjeren je menzurom. Ekstrakt je pretočen u staklenu kivetu te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri valnim duljinama 644,8 i 661,6 nm. Koncentracija klorofila *a* (Chl*a*) i klorofila *b* (Chl*b*) izračunata je prema formulama (1 i 2) uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaler (1987):

$$\mathbf{Chl}a = (11{,}24 \times A_{661{,}6} - 2{,}04 \times A_{644{,}8}) \times V / m \times 10^3 \quad (1)$$

$$\mathbf{Chl}b = (20{,}13 \times A_{644{,}8} - 4{,}19 \times A_{661{,}6}) \times V / m \times 10^3 \quad (2)$$

pri čemu je:
V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u ml,
m = masa uzorka u gramima.

Suha tvar uzorka određena je vaganjem mase svježe tvari koja je zatim sušena 24 sata u sušioniku na 105^0C te nakon sušenja ponovno izvagana. Koncentracija klorofila *a* i klorofila *b* izražena je po masi suhe tvari (sh. tv.).

2.6. Komponente antioksidacijskoga odgovora

2.6.1. Enzimske antioksidacijske komponente

2.6.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost enzima askorbat-peroksidaza određena je prema Nakanu i Asadu (1981). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,05 M K_2HPO_4, 0,05 M KH_2PO_4, 0,1 mM EDTA, 5 mM askorbinske kiseline i 12 mM H_2O_2 (pH 7,0). U kivetu od kvarcnoga stakla dodano je 1790 µl 50mM kalij fosfatnoga pufeta (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA, 20 µl askorbinske kiseline, 180 µl proteinskog ekstrakta i 10 µl H_2O_2. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Svaki uzorak izmjeren je u triplikatu te je za konačan izračun aktivnosti prema priloženoj formuli (3) korištena srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost enzima (APXu) prikazana je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari.

$$\Delta A_{290} = X \cdot Y \cdot Vu / m \times Va \ [min^{-1}g^{-1} \text{ sv.tv.}] \quad (3)$$

pri čemu je:
X = srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu,
Y = faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije u minuti,
Vu = ukupni volumen proteinskoga ekstrakta,
m = masa svježe tvari (izražena u gramima),
Va = volumen mjerenoga alikvota proteinskoga ekstrakta.
Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APXs) određena je kao kvocijent APXu i koncentracije proteina i izražena u min^{-1} mg^{-1} prot.

2.6.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze određena je prema Siegelu i Galstonu (1967). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,2 M KH_2PO_4, 5 mM gvajakola, 0,2 M Na_2HPO_4 x 12 H_2O, a 5 mM H_2O_2 dodan je neposredno prije mjerenja. U 980 µl reakcijske smjese dodano je 20 µl ekstrakta proteina te je povećanje apsorbancije mjereno pri valnoj duljini 470 nm svake sekunde tijekom dvije minute. Svaki uzorak mjeren je u triplikatu i za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu)

izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GPOXs) kvocijent je GPOXu i koncentracije proteina, izražena u min^{-1} mg^{-1} prot.

2.6.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze određena je metodom prema Aebiu (1984), promjenom apsorbancije zbog smanjenja količine H_2O_2. Reakcijska smjesa sastojala se od 0,05 M KH_2PO_4, 0,05 K_2HPO_4 i 0,01 M H_2O_2. Reakcija je započeta dodatkom 50 µl sirovoga ekstrakta proteina u 1950 µl reakcijske smjese. Promjena apsorbancije mjerena je pri 240 nm svakih 10 sekundi tijekom jedne minute. Svaki uzorak mjeren je u triplikatu, a za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost katalaze (CATu) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (CATs) kvocijent je CATu i koncentracije proteina, izražena u min^{-1} mg^{-1} prot.

2.6.1.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze

Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze određena je prema Dolphinu i sur. (1989). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,1 M KH_2PO_4, 0,1 M K_2HPO_4, 1 mM EDTA, 2 mM NADPH i 2 mM GSSG. U kvarcnu kivetu dodano je 500 µL 2 mM GSSG, 440 µl 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH=7,5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, 50 µl sirovoga ekstrakta proteina te 50 µl 2 mM NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je svake sekunde tijekom jedne minute pri valnoj duljini od 340 nm. Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRu) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GRs) određena je kao kvocijent GRu i koncentracije proteina, izražena u min^{-1} mg^{-1} prot.

2.6.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-*S*-transferaze

Ukupna aktivnost enzima glutation-*S*-transferaze određena je metodom prema Habigu i sur. (1974). Metoda uključuje uporabu 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB, engl. *1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene*) kao supstrata na koji se veže tiolna grupa glutationa. Formiranjem konjugata glutation-2,4-dinitrobenzena dolazi do smanjenja apsorbancije pri valnoj duljini 340 nm. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,1 M KH_2PO_4, 0,1 M K_2HPO_4, 1 mM EDTA, 75 mM reduciranog glutationa i 30 mM otopine CDNB. U kivetu od kvarcnoga stakla dodano je 1300 µl 100 mM kalij-fosfatnoga pufera (pH=6,5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, 50 µl otopine

reduciranoga glutationa i 50 µl otopine CDNB. Nakon ekvilibriranja pri 25^0 C dodano je 100 µl ekstrakta proteina te je smjesa dobro promiješana. Pad apsorbancije prati se pri 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Od promjene apsorbancije uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe koja se sastoji od 1400 µl 100 mM kalij fosfatnoga pufera (pH=6,5) s 1 mM EDTA, 50 µl otopine reduciranoga glutationa i 50 µl otopine CDNB. Jedna jedinica enzima GST definirana je kao količina enzima potrebna da konjugira 1 µmol CDNB s reduciranim glutationom po minuti pri pH 6,5 i 25^0C. Ukupan broj jedinica GST izražen je kao količina jedinica po gramu svježe tvari dok je specifična količina jedinica izražena kao kvocijent ukupnih jedinica i koncentracije proteina, izražena kao U mg^{-1} prot.

2.6.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Aktivnost superoksid-dismutaze određena je spektrofotometrijskom metodom prema Giannopolitisu i Riesu (1977). Metoda uključuje uporabu nitro plavoga tetrazolijskoga klorida (NBT) kao supstrata koji se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala do plavo obojenoga formazina. Redukcija se ihnibira u prisutnosti SOD. Reakcijska smjesa pH=7,5, sastojala se od 0,05 mM KH_2PO_4, 0,05 mM K_2HPO_4, 13 mM metionina, 75 µM NBT, 0,1 mM EDTA i 2 µM riboflavina koji je dodan neposredno prije mjerenja. Za izradu krivulje aktivnosti pripremljena su razrjeđenja proteinskoga ekstrakta miješanjem ekstrakta (10-70 µl) i pufera za ekstrakciju proteina do ukupnoga volumena od 80 µl. Za svaki je proteinski ekstrakt napravljena zasebna krivulja aktivnosti. U plastičnu kivetu dodano je 910 µl reakcijskoga pufera, 80 µl razrijeđenoga proteinskoga ekstrakta i 10 µM riboflavina te je reakcija počela izlaganjem reakcijske smjese pod izvor svjetlosti (neonska svjetiljka, 36W). Nakon 10 minuta izlaganja svjetlosti, reakcija je prekinuta i smjesa je korištena za mjerenje maksimalne apsorbancije nastaloga formazina pri valnoj duljini od 560 nm. Jedna jedinica enzima SOD definirana je kao količina enzima potrebna da izazove 50% inhibiciju redukcije NBT. Ukupan broj jedinica SOD izražen je kao količina jedinica po gramu svježe tvari dok je specifična količina jedinica izražena kao kvocijent ukupnih jedinica i koncentracije proteina, izražena kao U mg^{-1} prot.

2.7. Pokazatelji oksidacijskoga stresa

2.7.1. Određivanje koncentracije vodikovoga peroksida

Koncentracija vodikovoga peroksida (H_2O_2) određena je metodom prema Murkherejeeu i Choudhouriu (1983). Nakon tretmana biljke su isprane destiliranom vodom i osušene papirnatim ubrusom te usitnjene u tekućem dušiku. Vodikov peroksid ekstrahiran je iz 0,2 g usitnjenoga tkiva u 1 ml ledeno-hladnoga acetona tijekom 15 minuta. Slijepa proba sastojala se od 1 ml acetona bez biljnoga tkiva. Uzorci i slijepa proba centrifugirani su 5 minuta pri 6 000 g i 4°C nakon čega je odvojenom supernatantu dodano 400 µl titanovoga reagensa i 500 µl NH_4OH (konc.). U egzotermnoj reakciji titanovoga reagensa, NH_4OH i H_2O_2 u supernatantu nastaje kompleks titan-peroksida. Centrifugiranjem pri 15 000 g i 4°C u trajanju od 10 minuta istaložen je titan-peroksid te otopljen u 1 ml 2M H_2SO_4. Nakon ponovnoga centrifugiranja, bistri dio supernatanta odvojen je u kivetu te mu je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Koncentracija H_2O_2 izračunata je iz standardne krivulje apsorbancije otopina poznate koncentracije H_2O_2. Konačni rezultati izraženi su u µmol po gramu svježe tvari (µmol g^{-1} sv.tv.).

2.7.2. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije određena je metodom po Vermu i Dubeyju (2003), kao koncentracija supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* – TBARS). Nakon ispiranja destiliranom vodom i sušenja papirnatim ubrusom biljno je tkivo usitnjeno do finoga praha u tekućem dušiku. Oko 0,2 g usitnjenoga tkiva ekstrahirano je s 1 ml 0,1%-tne TCA. Nakon centrifugiranja pri 6000 g i 4°C u trajanju od 5 min odvojeno je 0,5 ml supernatanta te pomiješano s 1 ml 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline (engl. *Thiobarbituric acid* – TBA) u 20%-tnoj TCA. Smjesa je zatim zagrijana 30 min. u vodenoj kupelji na 95°C pri čemu dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti koji reagiraju s TBA. Nakon hlađenja na ledu uzorci su centrifugirani pri 18 000 g i 4°C tijekom 15 min. Supernatant je korišten za mjerenje apsorbancije spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 532 i 600 nm. Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5%-tne TBA u 20%-tne TCA. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izračunata je korištenjem molarnoga ekstinkcijskoga faktora 155 mM^{-1} cm^{-1} prema jednadžbi (4) i izražena u nM g^{-1} sv.tv.

$$\mathbf{TBARS = [(A_{532} - A_{600} / 155) / m] \times 10^3} \quad (4)$$

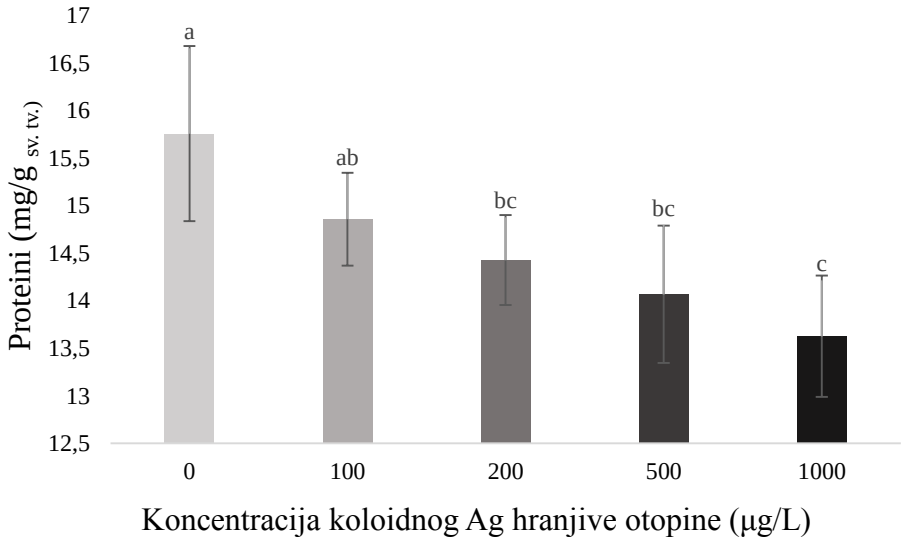
2.8. Statistička obrada

Svi eksperimenti i mjerenja izvršeni su u trima ponavljanjima i svi su uzorci uzimani u triplikatu (iz triju Erlenmayerovih tikvica). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti i standardna devijacija (SD). Za statističku obradu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA). Zbog nehomogenosti varijanci podataka, izvorni su podatci logaritamski transformirani kako bi se zadovoljili uvjeti potrebni za analizu varijance. Značajnost razlike primijenjenih tretmana u odnosu na kontrolu ispitana je Tukey HSD *post hock* testom (engl. *Tukey's HSD test; honestly significant difference test*). Kao kontrola za svaki mjereni parametar uzeti su podatci izmjereni za biljke koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini bez dodatka ionskoga koloidnoga AG. Za sve testove uzeta je razina značajnosti $P<0,05$. Za statstičku obradu podataka korišten je računalni program STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc, SAD).

3. REZULTATI

3.1. Koncentracija proteina

Koncentracija proteina u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 15,758 ± 0,921 mg/g sv. tv. Povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini zabilježeno je smanjenje koncentracije proteina u biljkama (*Slika 3*). Koncentracije ionskoga koloidnoga Ag 200, 500 i 1000 µg/L u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju proteina u biljkama nakon 48 sati izlaganja, dok koncentracija 100 µg/L nije imala statistički značajan utjecaj. Koncentracija proteina bila je manja za 8% pri 200 µg/L Ag, 11% pri 500 µg/L Ag i 13 % pri 1000 µg/L Ag u usporedbi s kontrolnim biljkama.

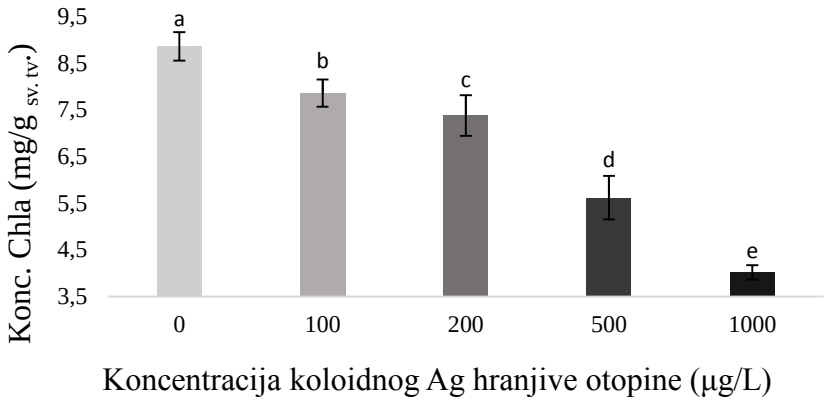


Slika 3. Koncentracije proteina u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,05$).

3.2. Koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*

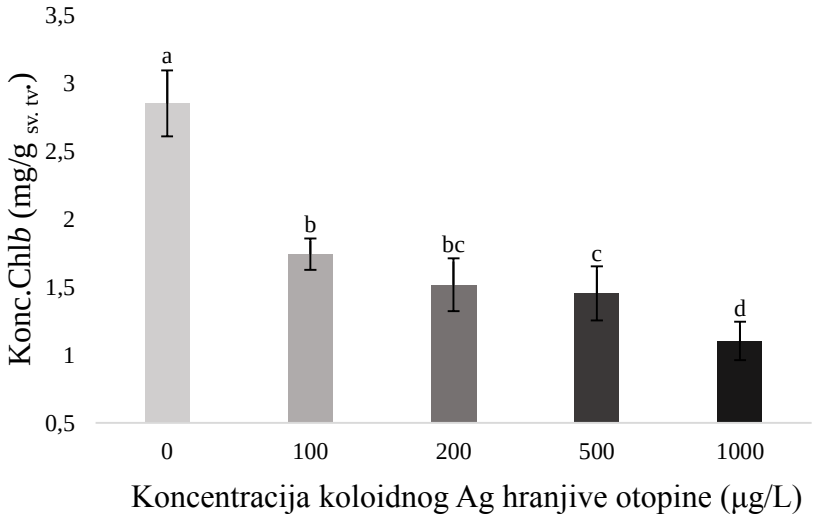
Koncentracija Chl*a* u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 8,850 ± 0,304 mg/g sv. tv. Koncetracija Chl*a* smanjivala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 4*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju Chl*a* u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Koncentracija Chl*a* nakon izlaganja koncentraciji ionskoga koloidnoga Ag 100 µg/L u hranjivoj otopini bila je 11% manja u odnosu na kontrolne biljke. Više nego trostruko manja koncentracija Chl*a* utvrđena je pri tretmanu s 500 µg/L Ag, dok je najveće

smanjenje koncentracije Chl*a* uočeno pri tretmanu s 1000 µg/L ionskoga koloidnoga Ag. Izmjerena koncentracija Chl*a* bila je 54% manja u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 4. Koncentracije Chl*a* u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, *P*<0,05).

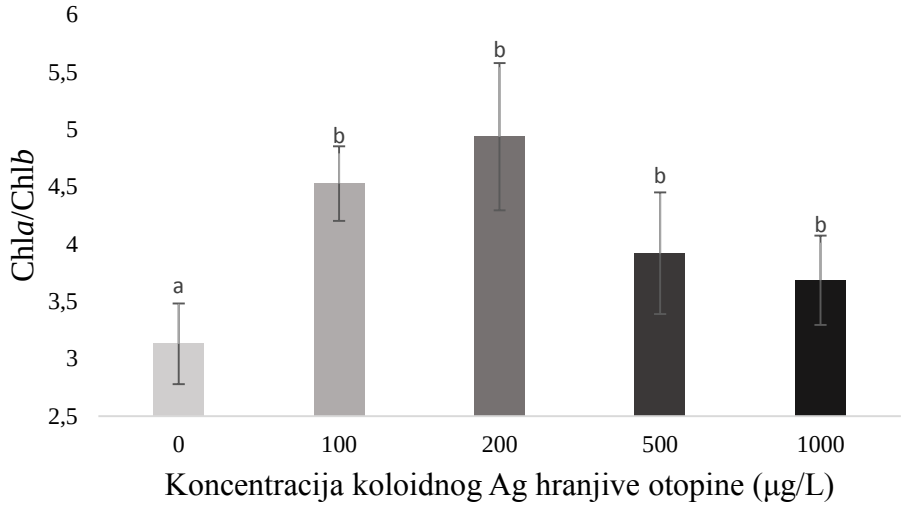
Koncentracija Chl*b* u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 2,849 ± 0,241 mg/g sv. tv. Koncetracija Chl*b* smanjivala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 5*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju Chl*b* u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Najveće smanjenje koncentracije Chl*b* uočeno je pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag te je koncentracija Chl*b* bila 61% manja u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 5. Koncentracije Chl*b* u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, *P*<0,05).

3.2.1. Omjer klorofila *a* i klorofila *b*

Omjer Chl*a*/Chl*b* u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosio 3,131 ± 0,351. Omjer Chl*a*/Chl*b* povećavao se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 6*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na omjer Chl*a*/Chl*b* u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Najmanji omjer Chl*a*/Chl*b* uočen je pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag te je bio 18% veći u odnosu na kontrolne biljke. Omjer Chl*a*/Chl*b* pri ostalim koncentracijama u biljkama u potpunoj hranjivoj otopini bio je 45% (100 μg/L), 57% (200 μg/L) i 25% (500 μg/L) veći od kontrole (*Slika 6*).



Slika 6. Omjer Chl*a*/Chl*b* u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 μg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

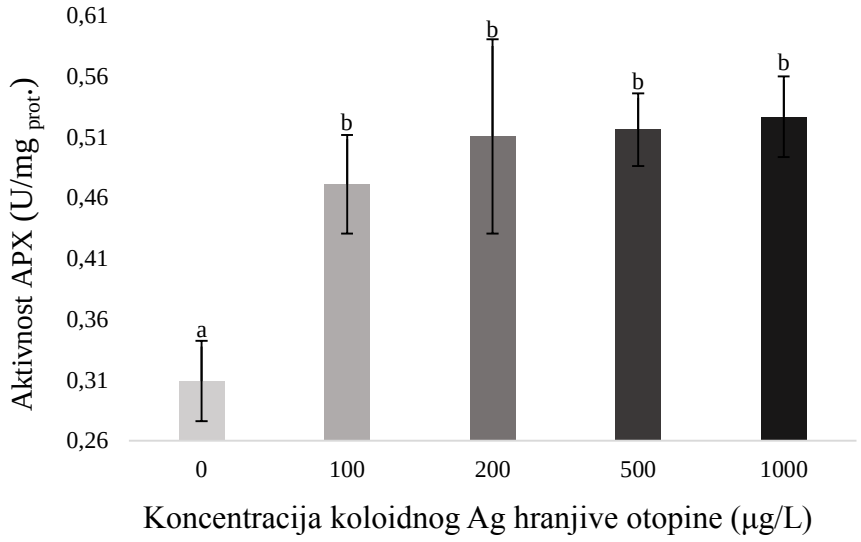
3.3. Komponente antioksidacijskoga odgovora

3.3.1. Enzimske komponente

3.3.1.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze

Aktivnost APX u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 0,309 ± 0,033 min^{-1} mg^{-1} proteina. Aktivnost APX povećavala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 7*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost APX u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Aktivnost APX u biljkama izlaganim 100 μg/L ionskoga koloidnoga Ag bila je u 52% veća u odnosu na kontrolne biljke, dok je pri koncentraciji 500 μg/L Ag aktivnost APX bila 67% veća u odnosu na kontrolne biljke. Najveće povećanje

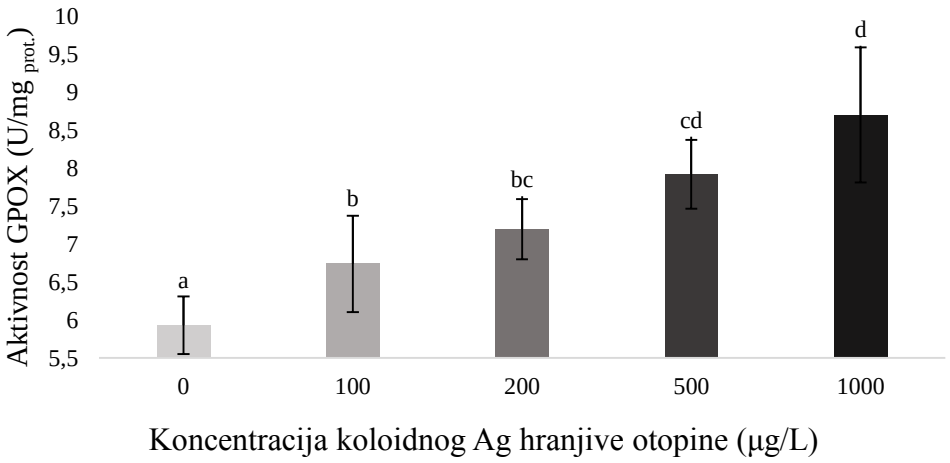
aktivnost APX utvrđeno je pri tretmanu s 1000 µg/L ionskoga koloidnoga Ag, pri čemu je aktivnost APX bila 70% veća u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 7. Aktivnost APX u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,05$).

3.3.1.2. Aktivnost gvajakol-peroksidaze

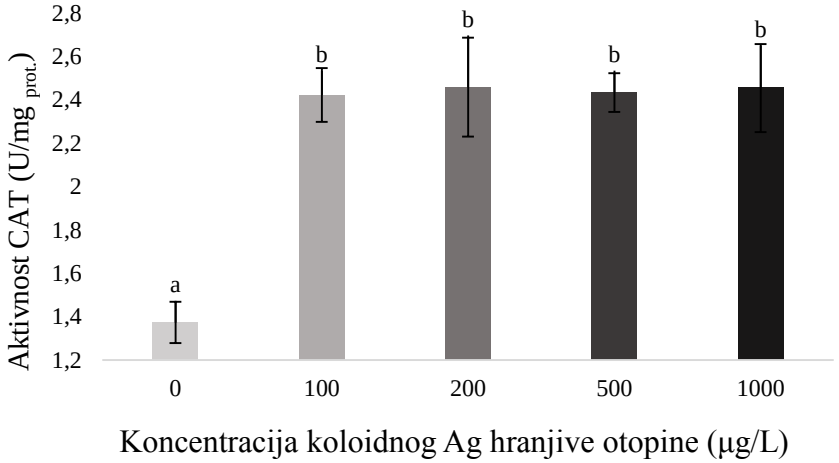
Aktivnost GPOX u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 5,931 ± 0,380 min^{-1} mg^{-1} proteina. Aktivnost GPOX povećavala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 8*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost GPOX u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Aktivnost je GPOX nakon izlaganja ionskom koloidnom Ag koncentracije 100 µg/L bila 14% veća u odnosu na kontrolne biljke. Najveće povećanje aktivnosti GPOX uočeno je pri tretmanu s 1000 µg/L ionskoga koloidnoga Ag te je aktivnost GPOX bila 47% veća u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 8. Aktivnost GPOX u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.3.1.3. Aktivnost katalaze

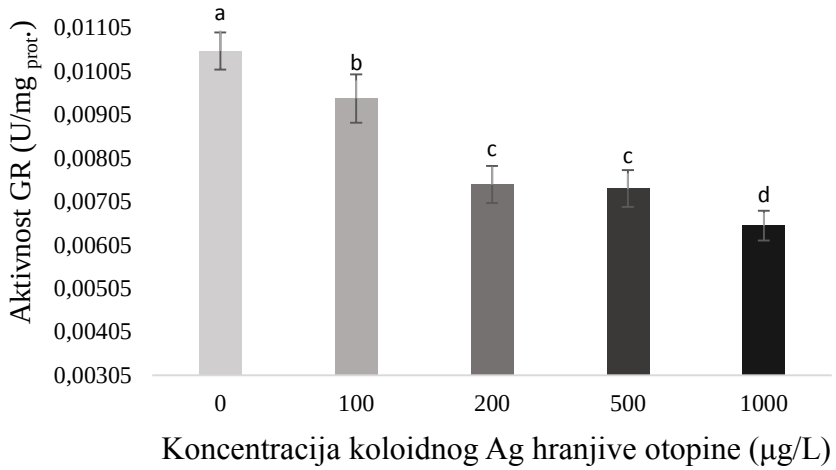
Aktivnost CAT u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 1,372 ± 0,095 min^{-1} mg^{-1} proteina. Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost CAT u biljkama nakon 48 sati izlaganja u odnosu na kontrolne biljke. Najveća aktivnost CAT izmjerena je u biljkama nakon izlaganja ionskom koloidnom Ag koncentracije 200 µg/L pri čemu je aktivnost CAT bila 79% veća u odnosu na kontrolne biljke (*Slika 9*) i ta se vrijednost nije značajno razlikovala od izmjerenih vrijednosti aktivnosti CAT pri svim koncentracijama ionskoga koloidnoga Ag.



Slika 9. Aktivnost CAT u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.3.1.4. Aktivnost glutation-reduktaze

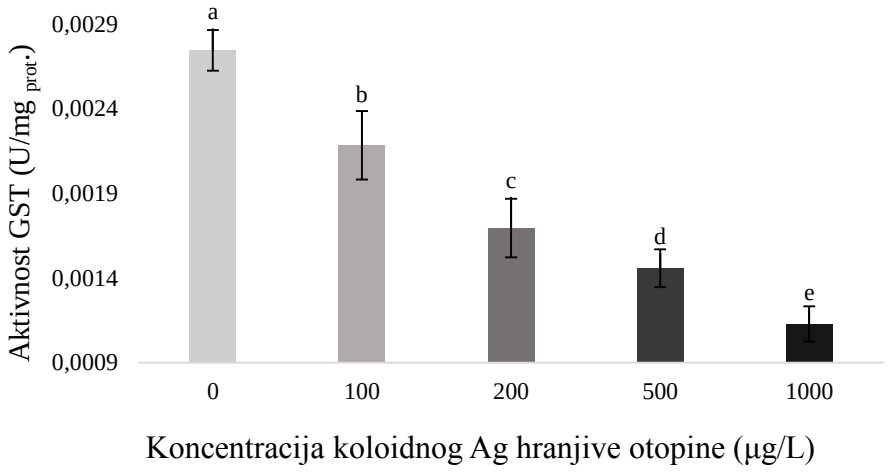
Aktivnost GR u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 0,0105 ± 0,0004 min^{-1} mg^{-1} proteina. Aktivnost GR smanjivala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 10*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost GR u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Najniža aktivnost GR bila je utvrđena pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag (1000 μg/L). Izmjerena aktivnost GR bila je 38% manja u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 10. Aktivnost GR u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 μg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,05$).

3.3.1.5. Aktivnost glutation-*S*-transferaze

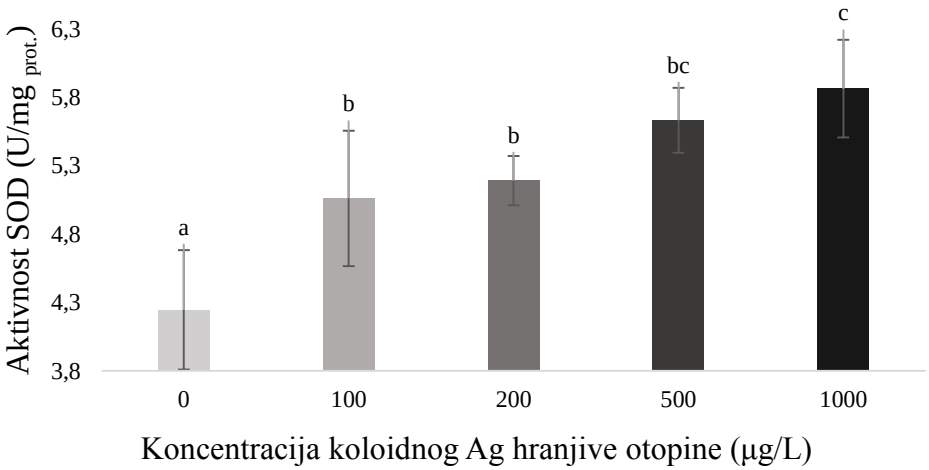
Aktivnost GST u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 0,0027 ± 0,0001 U mg^{-1} proteina. Aktivnost GST se smanjivala povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 11*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost GST u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Najveća koncentracija ionskoga koloidnoga Ag uzrokovala je najveće smanjenje aktivnosti GST i to za 59% u odnosu na kontrolne biljke.



Slika 11. Aktivnost GST u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.3.1.6. Aktivnost superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 4,245 ± 0,436 U mg^{-1} proteina. Aktivnost SOD povećavala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 12*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na aktivnost SOD u biljkama nakon 48 sati izlaganja. Nakon 48 sati tretmana, aktivnost SOD u stanicama *L. gibba* bila je značajno povećana u usporedbi s kontrolom pri svim primijenjenim koncentracijama ionskoga koloidnoga Ag s najvećom vrijednosti pri tretmanu s 1000 µg/L (5,863 ± 0,356 U mg-1 prot.) gdje je aktivnost bila veća za 38% u odnosu na kontrolne biljke.

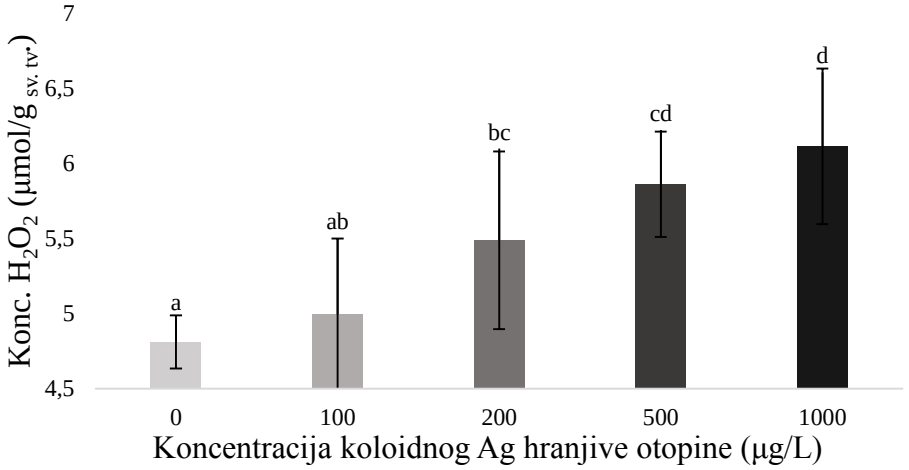


Slika 12. Aktivnost SOD u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.3.2. Pokazatelji oksidacijskoga stresa

3.3.2.1. Koncentracija vodikovoga peroksida

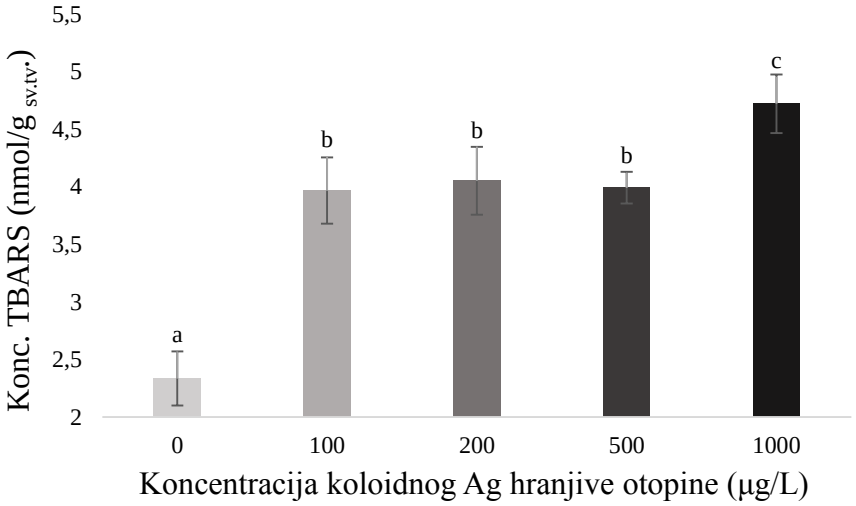
Koncentracija H_2O_2 u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 4,81 ± 0,17 μmol/g sv. tv. Koncentracija H_2O_2 povećavala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 13*). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju H_2O_2 u biljkama. Najveća koncentracija zabilježena je pri tretmanu s 1000 μg/L ionskoga koloidnoga Ag kada je koncentracija H_2O_2 bila u prosjeku 28% veća od vrijednosti izmjerenih u kontrolnim biljkama.



Slika 13. Koncentracija H_2O_2 u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 μg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.3.2.2. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije

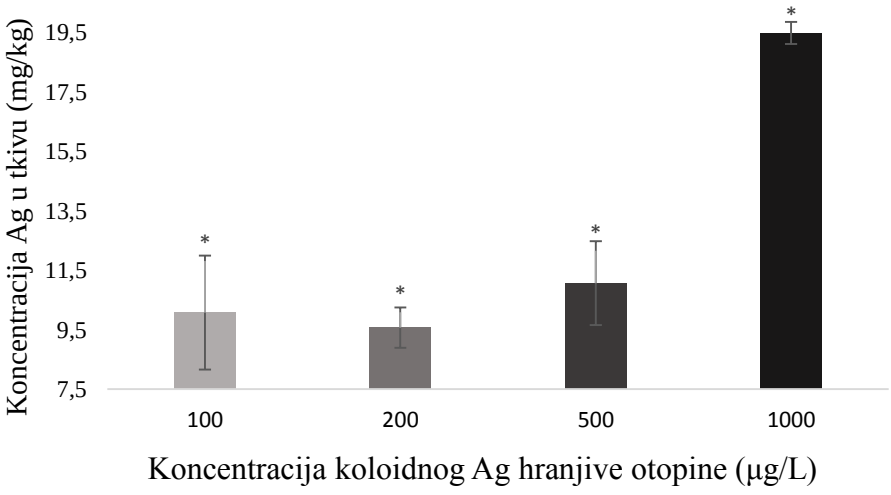
Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom eksperimenta u prosjeku je iznosila 2,33 ± 0,23 nmol/g sv.tv. Koncentracija TBARS povećavala se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 14*). Koncentracije ionskoga koloidnoga Ag 200, 500 i 1000 μg/L u hranjivim otopinama imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju TBARS u biljkama, dok koncentracija od 100 μg/L nije imala statistički značajan utjecaj. Najveća koncentracija zabilježena je pri tretmanu s 1000 μg/L ionskoga koloidnoga Ag kada je koncentracija TBARS bila u prosjeku 102% veća od vrijednosti izmjerenih u kontrolnim biljkama.



Slika 14. Koncentracija TBARS u *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, P<0,05).

3.4. Koncentracija srebra u tkivu *L.gibba*

Nakon 48 sati tretmana s ionskim koloidnim Ag u tkivu vodne leće došlo je do akumulacije srebra (Ag). Pri tretmanu s koncentracijama 100, 200 i 500 µg/L koncentracija akumuliranog Ag bila je u intervalu od 9,57 do 11,07 mg/kg dok pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag dolazi do nakupljanja veće koncentracije Ag u tkivu *L. gibba* (19,5 mg/kg sh. tv.). S povećanjem koncentracije Ag u hranjivoj otopini rasla je i koncentracija Ag u tkivu (*Slika 15*).



Slika 15. Koncentracija Ag u tkivu *L. gibba* nakon 48 sati od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini. Podatci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, P<0,05).

4. RASPRAVA

Srebro je, uz As, Cd i Ni jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima, posebice za vodene makrofite (Xu i sur.,2010), neovisno o tome radi li se o otopljenom ili ionskom obliku (Fisher i sur., 1984). Akumulacija teških metala uzrokuje brojne metaboličke promjene u biljkama (Prasad i sur., 2001; Ding i sur., 2007). Mnoga istraživanja utjecaja teških metala napravljena su upravo na vrstama iz porodice *Lemnaceae*, a prema istraživanjima koje su proveli Naumann i sur. (2007) Ag je u usporedbi s drugim metalima najviše inhibiralo rast vodene leće vrste *Lemna minor*. Vodene leće su u mnogim istraživanjima bile bioindikatori ekološkoga značaja za otkrivanje i praćenje onečišćenja štetnih metala (Miranda i Ilangovan 1996; Zayed i sur., 1998; Rahmani i Sternberg, 1999; Zhu i sur., 1999). Ionsko koloidno Ag, upotrebljeno u ovom istraživanju, nepovoljno je utjecalo na fiziološko stanje vodene leće *L. gibba* te je uzrokovalo oksidacijski stres. To su potvrdili rezultati za glavne pokazatelje oksidacijskoga stresa te aktivnosti enzima uključenih u antioksidacijski odgovor.

U ovom istraživanju koncentracija Ag u tkivu *L. gibba* povećavala se s povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini, pri čemu je najizraženiji porast utvrđen pri tretmanu s najvećom koncentracijom Ag (*Slika 15*). Akumulacija Ag zabilježena je i u tkivu *L. gibba* (Oukarroum i sur., 2013) i drugih vodenih makrofita kao što je *Potamogeton crispus* (Xu i sur., 2010) nakon tretmana s $AgNO_3$.

Koncentracija ukupnih proteina u organizmu važan je pokazatelj promjena metabolizma biljaka i mijenja se u doticaju sa stresnim čimbenicima u okolišu (Piotrowska i sur., 2010; Doganlar i Atmaca, 2011). U ovom istraživanju koncentracija proteina u tkivu *L. gibba* se smanjivala kako se povećavala koncentracija Ag u hranjivoj otopini (*Slika 3*). Jedino najniža koncentracija ionskoga koloidnoga Ag (100 μg/L) u hranjivoj otopini nije imala statistički značajan utjecaj na koncentraciju proteina, dok su ostale koncentracije (200, 500 i 1000 μg/L Ag) značajno utjecale na koncentraciju proteina u biljkama. Nizak sadržaj proteina predstavlja jasan pokazatelj stresa biljaka odnosno smanjenja normalne metaboličke aktivnosti (Bonjoch i Tamayo, 2001). Suprotno tomu, sadržaj proteina u biljkama izloženim stresnim čimbenicima može biti i povišen kao npr. uslijed aktivacije različitih procesa u biljkama poput osmotske regulacije, sinteze proteina *de novo*, antioksidacijske obrane i drugih procesa (Bonjoch i Tamayo, 2001). Osim Ag, visoke koncentracije i ostalih metala, poput Cu, Cd i Fe uzrokuju smanjenje koncentracije proteina u tkivu biljaka vrste *L. minor* (Kanoun-Boulé i sur., 2009; Razinger i sur., 2007) i *Elodea nuttallii* (Xing i sur., 2010). Smanjenje koncentracije proteina

može biti posljedica povišene aktivnosti proteaza i drugih kataboličkih enzima aktiviranih različitim metalima (Sinha i sur., 1996). Također, Ag kao i brojni drugi metali, stvara komplekse s aminokiselinama čime mijenja njihovu strukturu te ometa proces sinteze proteina (Emamverdian i sur., 2015).

Koncentracije fotosintetskih pigmenata, Chl*a* i Chl*b*, smanjivale su se povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slika 4 i 5)* i to statistički značajno već pri najnižoj koncentraciji ionskoga koloidnoga Ag. Smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata utvrđeno je i kod drugih vrsta vodenih makrofita izloženih različitim koncentracijama Ag (Xu i sur., 2010; Jiang i sur., 2012). Wang (1990) je utvrdio da smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata može biti puno bolji indikator toksičnosti od stope rasta biljaka. Niže koncentracije Chl*a* i Chl*b* mogu biti ishod ultrastrukturnih promjena u kloroplastima te peroksidacije lipida u membranama (Xu i sur., 2010), povećane degradacije ali i smanjene sinteze klorofila (Gupta i Chandra, 1998; Ding i sur., 2007). Smanjene koncentracije klorofila dovode do smanjenja fotosintetske aktivnosti uslijed čega dolazi do inhibicije rasta biljke (Tewari i sur., 2004). Redukcija fotosintetske aktivnosti dovodi do smanjenja fiksacije ugljika što znatno utječe na cjelokupnu razinu biljke (Xu i sur., 2010). Osim na fotosintezu, Ag ima štetan učinak i na enzime Kalvinova ciklusa te na transportni lanac elektrona tako što ga inhibira (Ouzounidou i Constantinidou, 1999). Nakon 48 sati izlaganja biljaka ionskom koloidnom Ag, koncentracija se Chl*b* više smanjivala nego koncentracija Chl*a*, što je ishodilo povećanjem omjera Chl*a*/Chl*b* (*Slika 6*). Povećanje omjera Chl*a*/Chl*b* može se objasniti konverzijom Chl*b* u Chl*a* do koje dolazi tijekom degradacije fotosintetskih pigmenata (Fang i sur., 1998). Ova se konverzija odvija 7-hidroksimetilnim Chl*a* (Ito i sur., 1996), uz pomoć klorofila s apoproteinima (Ohtsuka i sur., 1997). Smanjenje omjera Chl*a*/Chl*b* utvrđeno je i pri tretmanu vodene leće *L. minor* s različitim koncentracijama olova (Pb) (Garnczarska i Ratajczak, 2000). Povećanje koncentracije Pb u tretmanima uzrokovalo je smanjenje koncentracije Chl*a* i Chl*b* u korijenju i frondovima biljke i povećanje omjera Chl*a*/Chl*b* (Garnczarska i Ratajczak, 2000).

Nakupljanje ROS-a jedna je od glavnih posljedica oksidacijskoga stresa u biljkama uslijed toksičnoga djelovanja teških metala (Sharma i Dietz, 2009). Zajednička je značajka i biotičkoga i abiotičkoga stresa kod biljaka (Xu i sur., 2010). Jedan od najstabilnijih oblika ROS-a koji ima prilično dug životni vijek (1ms), za razliku od ostalih ROS-ova, vodikov je peroksid (H_2O_2) (Gill i Tuteja, 2010). Vodikov peroksid lako može prolaziti kroz staničnu membranu, a u prisutnosti iona prijelaznih metala stvara vrlo reaktivne slobodne radikale (Štefan i sur., 2007). U ovom istraživanju koncentracija H_2O_2 povećavala se povećanjem koncentracije

ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini nakon 48 sati tretmana pri čemu je najveće povećanje od 28% utvrđeno u biljkama tretiranim najvećom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag (*Slika 13*). U istraživanjima Oukarroum i sur. (2013) dokazano je da čak i pri dvostruko kraćem vremenu trajanja tretmana s $AgNO_3$ (nakon 24 sata), dolazi do povećanja koncentracije ROS-a.

Peroksidacija lipidnih membrana predstavlja jedan od najštetnijih učinaka oksidacijskoga stresa uzrokovanog teškim metalima (Bueno i Piqueres, 2002) koji znatno narušava normalno funkcioniranje stanica (Farmer i Mueller, 2013). Sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag su imale statistički značajan utjecaj na koncentraciju TBARS u biljkama. Pri najvećoj koncentraciji Ag od 1000 μg/L, došlo je do povećanja koncentracije TBARS za 102% u odnosu na kontrolne biljke (*Slika 14*) što pokazuje da je u biljkama izloženim ionskom koloidnom Ag došlo do pojave oksidacijskoga stresa. Isti rezultat utvrđen je i u istraživanju Glavaš i sur. (2012) u tkivu *L. minor* pri tretmanima nanočesticama srebra u rasponu koncentracija 1 do 25 mg/L. Povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije u stanicama vodenih leća utvrđeno je i kao posljedica djelovanja i ostalih metala kao što su Zn i Al (Radić i sur., 2010), Cu (Hou i sur., 2007), Cd (Hou i sur., 2007; Razinger i sur., 2008; Tkalec i sur., 2008).

Kada se koncentracija ROS-a neznatno poveća, aktivira se antioksidacijski sustav koji ih učinkovito razgrađuje, ali kada stanica izgubi kontrolu nad njihovim stvaranjem i razgradnjom, ROS može uzrokovati stanična oštećenja. Biljke posjeduju vrlo učinkovit antioksidacijski obrambeni sustav (Sarvajeet i Narendra, 2010). Najdjelotvorniji enzimski antioksidansi u biljakama obuhvaćaju SOD, CAT i enzime askorbat-glutationskoga ciklusa. Superoksid-dismutaza najučinkovitiji je unutarstanični antioksidans prisutan u svim aerobnim organizmima, u svim subcelularnim odjeljicima koji su skloni stvaranju ROS-a (Gill i Tuteja, 2010). U ovom istraživanju, u stanicama *L. gibba*, nakon 48 sati izlaganja ionskom koloidnom Ag došlo je do povećanja aktivnosti SOD već i pri najmanjoj koncentraciji Ag (*Slika 12*). Superoksid dismutaza katalizira razgradnju superoksidnih radikala u H_2O_2 i H_2O (Bowler i sur., 1992), što se može povezati s povećanom akumulacijom H_2O_2 utvrđenom u ovom istraživanju (*Slika 13*). Povećanje aktivnosti SOD utvrđeno je i u ostalim istraživanjima vodenih biljaka, primjerice kod vrste *Potamogeton crispus,* gdje je tretman Ag uzrokovao značajno povećanje aktivnosti SOD u biljnom tkivu (Xu i sur., 2010).

Bitnu ulogu u biljkama ima i enzim CAT koja neutralizira H_2O_2 (Bowler i sur. 1992). Jedna molekula CAT može reducirati oko 6 milijuna molekula H_2O_2 u jednoj minuti stoga ovaj enzim predstavlja neizostavnu komponentu antioksidacijskoga obrambenoga sustava (Gill i

Tuteja, 2010). U ovom istraživanju sve koncentracije ionskoga koloidnoga Ag uzrokovale su značajno povećanje aktivnosti enzima CAT u odnosu na kontrolu (*Slika 9*). Song i sur. (2012) utvrdili su povećanu aktivnost CAT u stanicama vodene leće izloženim različitim koncentracijama nanočestica Ag. Također, Jesus i sur. (2013) primijetili su da važnu ulogu u utjecaju nanočestica Ag na aktivnost CAT kod vrste *L. minor* ima veličina nanočestica Ag pa su tako manje čestice Ag (10nm) dovele do povećane aktivnosti CAT, a veće čestice (80nm) do smanjenja aktivnosti CAT. Povećanje aktivnosti CAT utvrđeno je i u istraživanju vrste *P.crispus,* gdje je tretman s $AgNO_3$ uzrokovao povećanje aktivnosti CAT u biljnom tkivu (Xu i sur., 2010).

Uz CAT, važnu ulogu u uklanjanju H_2O_2 i zaštiti stanica od oksidacijskoga stresa imaju i peroksidaze. Askorbat peroksidaza ima veći afinitet za H_2O_2 nego CAT (μM raspon koncentracije) i GPOX (mM raspon koncentracije) i zbog toga ima ključnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru i pri nižim koncentracijama H_2O_2 (del Rio i sur., 1998**;** Gill i Tuteja, 2010). Aktivnost su se APX i GPOX tijekom eksperimenta povećavale s povećanjem koncentracije ionskoga koloidnoga Ag u hranjivoj otopini (*Slike 7 i 8*). Osim Ag, Cr i Fe također uzrokuju povećanje aktivnosti GPOX. To su potvrdila istraživanja na vrsti *Pistia stratiotes* tretiranoj s Cr (Sinha i sur., 2005) te *Elodea nuttallii* nakon tretmana s Fe (Xing i sur., 2010).

Enzimi APX i GR predstavljaju važne komponente askorbat-glutationskoga ciklusa (Gill i Tuteja, 2010). GR je važna komponenta askorbat-glutationskog ciklusa u kojemu održava reducirano stanje glutationa (GSH) tako što koristi reduciranu energiju (NADPH) (Gill i Tuteja, 2010). Tako doprinosi zaštiti stanice jer izravno veže metale ili sintetizira fitohelatine fitohelatin-sintazom koja koristi GSH kao prekursor (Anjum i sur., 2012). Aktivnost se GR tijekom ovoga istraživanja smanjivala s porastom koncentracije ionskoga koloidnoga srebra (*Slika 10*) pri čemu je najniža aktivnost GR bila pri tretmanu s najvišom koncentracijom ionskoga koloidnoga Ag. Osim Ag, i ostali teški metali uzrokuju smanjenje aktivnosti GR: kod *L. minor* nakon tretmana s Cu (Teisseire i Guy, 2000), *Hydrilla verticillata* nakon tretmana sa Zn (Wang i sur., 2009) i Cu (Srivastava i sur., 2006). Mogući mehanizam inhibicije aktivnosti GR može se objasniti vezanjem teškim metala za tiolne skupine enzima što izravno utječe na smanjenje njihove aktivnosti (Creissen i Mullineaux, 1995; Ravindran i sur., 2012).

Uz GR, važan enzim koji sudjeluje u metabolizmu glutationa je GST. Glutation-*S*-transferaza katalizira konjugaciju elektrofilnih ksenobiotičkih supstrata s GSH (Gill i Tuteja, 2010) i kao takva ima ključnu ulogu u obrani organizma od brojnih hidrofobnih i elektrofilnih molekula. Zbog svoje peroksidazne aktivnosti GST može sudjelovati u zaštiti stanica od ROS-a u uvjetima oksidacijskoga stresa (Scalla i Roulet, 2002). Aktivnost GST u stanicama *L. gibba*

se značajno smanjivala povećanjem koncentracije Ag u hranjivoj otopini (*Slika 11*). Inhibicija aktivnosti GST može biti potaknuta povišenom akumulacijom različitih ROS-a uslijed akumulacije štetnih metala (Nagalakshmi i Prasad, 2001).

Zbog sve veće upotrebe nanočestica Ag u potrošačkim proizvodima, od perilice rublja, tkanina za čišćenje u kućanstvu, postoji opravdan rizik da će ovaj materijal biti pušten u kanalizaciju, u postrojenja za pročišćavanje vode i na kraju u rijeke, potoke i jezera. Uz navedeno otkriveno je da su nanočestice Ag izuzetno toksične te da uništavaju dobroćudne vrste bakterija koje se koriste za obradu otpadnih voda (Bharadwaj Punita, 2012). Zbog svega navedenog nužno je istraživati učinke Ag na okoliš i biljke. Vodene leće, male, zelene vaskularne biljke, brzoga rasta pod povoljnim uvjetima, pokazale su se prikladnim organizmima za studije fitotoksičnih učinaka metala, zbog lakoće rasta kulture i mogućnost manipulacije u sterilnim laboratorijskim uvjetima (Mohan i Hosetfi, 1997; Barber i sur., 1999; Bengtsson i sur., 1999). Rezultati ovoga istraživanja upućuju na veliki toksikološki učinak koje bi veće koncentracije Ag mogle uzrokovati.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČAK

- Ionsko koloidno srebro uzrokovalo je značajnu akumulaciju vodikovoga peroksida i produkata peroksidacije lipida ovisno o koncentraciji ionskoga koloidnoga srebra.
- Aktivnosti antioksidacijskih enzima superoksid-dismutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze i gvajakol-peroksidaze su bile povećane pri tretmanu ionskim koloidnim srebrom.
- Aktivnosti antioksidacijskih enzima glutation-reduktaze i glutation-*S*-transferaze su se smanjile pri tretmanu ionskim koloidnim srebrom kao i koncentracije fotosintetskih pigmenata i ukupnih proteina.
- Iz navedenih rezultata može se zaključiti da ionsko koloidno srebro uzrokuje oksidacijski stres u stanicama *L. gibba* čiji se intenzitet povećava s porastom koncentracije ionskoga koloidnoga srebra u hranjvoj otopini i u samoj biljci.

6. LITERATURA

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzym* 105: 121-126.

Ali MB, Tripathi RD, Rai UN, Pal A, Singh SP. 1999. Physico-chemical characteristics and pollution level lake Nainital (U.P. India): role of macrophytes and phytoplankton in biomonitoring and phytoremediation of toxic metal ions. *Chemosphere* 39: 2171-2182.

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M, Prasad MNV. 2012. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids-A review. *Environ Exp Bot* 75: 307-324.

Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82: 1227-1238.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.

Bafana A, Dutt S, Kumar A, Kumar S, Ahuja PS. 2011. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J Mol Catal B-Enzym* 68:129-138.

Barber JT, Thomas DA, Yatsu LY, Ensley HE. 1999. The physiological consequences of ethylene glycol-induced changes in the frond structure of *Lemna gibba*. *Aq Toxicol* 45: 253-264.

Bengtsson BE, Bongo JP, Eklund B. 1999. Assessment of duckweed *Lemna aequinoctialis* as a toxicological bioassay for tropical environments in developing countries. *Ambio* 28: 152-155.

Benoit G, Oktay-Marshall SD, Cantu SD II, Hood EM, Coleman CH, Corapcioglu MO, Santschi PH. 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al, and Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar Chem* 45:307-336.

Bharadwaj Punita S. 2012. Silver or silver nanoparticle: a safety or a risk. *J Environ Res Develop* 7(1A) 5: 452-456.

Bionardi N, Vatta G, Nano G, Rota R, Carra S. 1994. Removal of the water pollutants by *Lemna gibba*. *Chem ENG J* 54: B41-B45.

Bonjoch NP, Tamayo PR. 2001. Protein content quantification by Bradford method U: Reigosa Roger, M. J. (ur) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publisher, Nizozemska, 283-295.

Bowler C, Van Montagu M, Inze D. 1992. Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 43: 83-116.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method forquantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H_2O_2 synthesis. *The Plant J* 45: 113-122.

Bueno P, Piqueres A. 2002. Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. *Plant Growth Regul* 36: 161-167.

Chudobova D, Dobes J, Nejdl L, Maskova D, Rodrigo MAM, Nedecky B-R, Krystofova O, Kynicky J, Konecna M, Pohanka M, Hubalek J, Zehnalek J, Klejdus B, Kizek R, Adam V. 2013. Oxidative stress in *Staphylococcus aureus* treated with silver(I) ions revealed by spectrometric and voltammetric assays. *Int J Electrochem Sci* 8: 4422-4440.

Creissen GP, Broadbent P, Kular B, Reynolds H, Wellburn AR, Mullineaux PM. 1994. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress. *Proc R Soc Edinb* 102B 167-175.

Creissen GP, Mullineaux PM. 1995. Cloning and characterization of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta* 197: 422-425.

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795.

del Rio LA, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Pastori GM, Bueno P, Lopez-Huertas E. 1996. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem Soc Trans* 24: 434-438.

del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, Lopez-Huertas E, Hernández JA. 1998. *Plant Physiol* 116: 1195-1200.

Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109: 212-228.

Ding B, Shi G, Xu Y, Hu J, Xu Q. 2007. Physiological responses of Alternanthera philoxeroides (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environ Pollut* 147: 800-803.

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71(4): 338-50.

Doganlar ZB, Atmaca M. 2011. Influence of Airborne Pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water Air Soil Pollut* 214: 509-523.

Dolphin D, Avramovic O, Poulson R. 1989. Glutathion: Chemical, biochemical and metabolic aspect. New York, USA: John Wailey & Sons Inc.

Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y. 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J* 2015: 1-18.

Fang Z, Bouwkamp J, Solomos T. 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 49: 503-510.

Farmer EF, Mueller MJ. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64: 429-450.

Fisher NS, Bohe M, Teyssie JL. 1984. Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in 4 marine phytoplankters. *Mar Ecol Prog Ser* 18:201-213.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S,Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidasse regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446.

Fortin C, Campbell PGC. 2001. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ Sci Technol* 35: 2214-2218.

Foyer CH, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11:861-905.

Garnczarska M, Ratajczak L. 2000. Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions: Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes. *Acta Physiol Plantarum* 22(4): 423-427.

Gaspar TH, Penel C, Hagege D, Greppin H. 1991. Peroxidases in Plant Growth, Differentiation and Development Processes, in: J. Lebaryewski, H. Greppin, C. Penel, and Th. Gaspar (Eds.), Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, and University of Geneva, Geneva, pp. 250-279.

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J. 2002. Concepts plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 37: 263-28.

Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher-plants. *Plant Physiol* 59: 309-314.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930.

Glavaš LJK, Radić Brkanac S, Cvjetko P, Vujčić V, Ljubimir S, Pevalek-Kozlina B. 2012. Toxicity of silver nanoparticles in Duckweed (*Lemna minor* L.). International Conference-Plant Growth, Nutrition & Environment Interactions, Austrija, Beč.

Gupta M, Chandra P. 1998. Bioaccumulation and toxicity of mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. *Environ Pollut* 103: 327-332.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathion-*S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. Free radicals in biology and medicine. (Third Edition) Oxford, Oxford University Press.

Hillman WS, Culley DD. 1978. The uses of duckweed. *Am Sci* 66: 442-451.

Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem* 45: 62-69.

Ito H, Ohtsuka T, Tanaka A. 1996. Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *J Biol Chem* 271: 1475-9.

Jansen MA, van den Noort RE, Tan MY, Prinsen E, Lagrimini LM, Thorneley RN. 2001. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol* 126:1012-1023.

Jesus F, Aguiar S, Ferreira M, Oliveira R, Pereira S, Nogueira Antonio JA. 2013. Long-term effects of silver nanoparticles in *Lemna minor*: the influence of nanoparticles size. 8th International Conference on the Envionmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials, Aix-en-Provence, France, Abstract book.

Jiang HS, Li M, Chang FY, Li W, Yin LY. 2012. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO3 toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 31: 1880-1886.

Kanoun-Boule´ M, Vicente JAF, Nabais C, Prasad MNV, Freitas H. 2009. Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. *Aq Toxicol* 91:1-9.

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manohran K, Kim W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5(6): 709-725.

Krajnčić B, Devide Z. 1980. Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia. Berichte des Geobot. Instit ETH, Stiftung Rùbel, Zùrich, 47: 75-86.

Landolt E. 1986. The family of Lemnaceae: A Monographic Study. Vol. 1. Zurich: Veröffentlichungen des Geobotanischen Insti tuts der Eidgenössischen Techischen Hochschule, Stiftung Rü- bel, 566.

Les HD, Crawford DJ, Landolt E, Gabel DJ, Kimball TR. 2002. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. *Syst Botany* 27(2): 221-240.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382.

Lisjak M, Špoljarević M, Agić D, Andrić L. 2009. Praktikum iz fiziologije bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, on-line priručnik: http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/praktikum_fiziologije_bilja.pdf

Liu J, Hurt RH. 2010. Iron release kinetics and particle persistence in aqueous nanosilver colloids. *Environ Sci Technol* 44: 2169-2175.

Lowry GV, Espinasse BP, Appala RB, Richardson CJ, Reinsch BC, Bryant LC. 2012. Long termtransformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergend wetland. *Environ Sci Technol* 46: 7027-7036.

Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C. 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500: 58-65.

Miller AF. 2012. Superoxide dosmutases:ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* 586(5): 585-95.

Milone MT, Sgherri C, Clijters H, Navari-Izzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot* 50: 265-273.

Miranda M, Ilangovan K. 1996. Uptake of lead by *Lemna gibba* L.: Influence on specific growth rate and basic biochemical changes. Bull. Environ. *Contam Toxicol* 56: 1000-1007.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498.

Mohan BS, Hosetti BB. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown on sewage stabilization ponds. *Environ Pollut* 98: 233-238.

Murkherjee SP, Choudhuri MA. 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plantarum* 58: 166-170.

Nagalakshmi N, Prasad MNV. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160:291-299.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880.

Naumann B, Eberius M, Appenroth K-J. 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *J Plant Physiol* 164: 1656-1664.

Neill S, Desikan R, Hanckok J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395.

Noctor G, Foyer CH. 1998. A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? J *Exp Bot* 49: 1895-1908.

Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304.

Ohtsuka O, Ito H, Tanaka A. 1997. Conversion of chlorophyl b to chlorophyll a and the assembly of chlorophyll with apoproteins by isolated chloroplasts. *Plant Physiol* 113: 137-47.

Oukarroum A, Gaudreault M-H, Pirastru L, Popovic R. 2013. Alleviation of silver toxicity by calcium chloride (CaCl2) in *Lemna gibba* L. *Plant Physiol Biochem* 71: 235-239.

Ouzounidou G, Constantinidou HA. 1999. Changes in growth and physiology of tobacco and cotton under Ag exposure and recovery: are they of direct or indirect nature? *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 480-419.

Peng CL, Ou ZY, Liu N, Lin GZ. 2005. Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci* 12: 179-186.

Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Zyłkiewicz B, Zambrzycka E. 2010. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposedto Cadmium and Lead. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 594-604.

Pirson A, Seidel F. 1950. Cell metabolism and physiology in *Lemna minor* root deprived of potassium and calcium *(*Zell- und stoffwechselphysiologiche Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium und Calciummangel). *Planta* 38: 431-437.

Prasad MNV, Malec P, Waloszek A, Bojko M, Strzalka K. 2001. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci* 161: 881-889.

Radić S, Stipančev D, Cvjetko P, Lovrenčić Mikelić I, Marijanović Rajčić M, Širac S, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M. 2010. Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology* 19(1): 216-222.

Rahmani GNH, Sternberg SPK. 1999. Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*. *Bioresour Technol* 70: 225-230.

Raven EL. 2000. Peroxidase-catalyzed oxidation of ascorbate. Structural, spectroscopic and mechanistic correlations in ascorbate peroxidase. *Subcell Biochem* 35: 317-49.

Ravindran A, Chandrasekaran N, Mukherjee A. 2012. Studies on differental behavior of silver nanoparticles towards thiol containing amino acids. *Curr Nanosci* 8: 141-149.

Razinger J, Dermastia M, Dolenc Koce J, Zrimec A. 2008. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-trm cadmium exposure. *Environ Pollut* 153: 687-694.

Razinger J, Dermastia M, Drinovec L, Drobne D, Zrimec A, Dolenec Koce J. 2007. Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. *Environ Sci Pollut Res Int* 14: 194-201.

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA. 2004. Cadmiuminduced subcellular accumulation of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122-1134.

Sarvajeet SG, Narendra T. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930.

Scalla R, Roulet A. 2002. Cloning and characterisation of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol* 116: 336-344.

Shafer MM, Overdier JT, Armstrong DE. 1998. Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environ Toxicol Chem* 17:630-641.

Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43-50.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications in classification on non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16.

Siegel BZ, Galston W. 1967. The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 42: 221-226.

Singh I. 1997. Biochemistry of peroxisomes in health and disease. *Mol Cell Biochem* 167(1-2): 1-29.

Singh S, Eapen S, D'Souza SF. 2006. Cadmiumaccumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62: 233-246.

Sinha S, Saxena R, Singh. 2005. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58: 595-604.

Sinha S, Gupta M, Chandra P. 1996. Bioaccumulation and biochemical effects of mercury in the plant *Bacopa monnieri* L. *Environ Toxicol Water Qual* 11: 105-112.

Smith IC, Carson BL. 1977. Trace Metals in the Environment, Vol 2 Silver. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, USA.

Song G, Gao Y, Wu H, Zhang C, Ma H. 2012. Physiological effect of anatase TiO_2 nanoparticles on *Lemna minor*. *Environ Toxicol Chem* 31(9): 2147-2152.

Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedo S, Gupta DK. 2006. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticullata* L.f Royle. *Aq Toxicol* 80: 405-415.

Subramani S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9: 445-478.

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203: 32-43.

Štefan L, Tepešić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. 2007. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 10: 84-93.

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

Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN. 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Sci* 166: 687-694.

Tkalec M, Prebeg T, Roje V. 2008. Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. *Acta Physiol Plant* 30: 881-890.

Verma S, Dubey RS. 2003. Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655.

Wang C, Zhang SH, Wang PF, Qian J, Hou J, Zhang WJ, Lu J. 2009. Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle. *Chemosphere* 76: 938-945.

Wang W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Res* 52: 7-22.

Xing W, Li D, Liu G. 2010. Antioxidative response of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John o short-term iron exposure. *Plant Physiol Biochem* 48: 873-878.

Xu QS, Hu JZ, Xie KB, Yang HY, Du KH, Shi GX. 2010. Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *J Hazard Mater* 173: 186-193.

Zayed A, Gowthaman S, Terry N. 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J Environ Qual* 27: 715-721.

Zhu YL, Zayed AM, Qian JH, deSouza M, Terry N. 1999. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *J. Environ Qual* 28: 339-344.

WEB1: http://www.wikiwand.com/es/Lemna_gibba