

Lipidna peroksidacija u vodenoj leći (Lemna minor L.) kao pokazatelj toksičnog učinka onečišćenja kopnenih voda

Mihaljević, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2009

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:153420>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Maja Mihaljević

**LIPIDNA PEROKSIDACIJA U VODENOJ LEĆI (*Lemna minor* L.)
KAO POKAZATELJ TOKSIČNOG UČINKA ONEČIŠĆENJA
KOPNENIH VODA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2009.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

LIPIDNA PEROKSIDACIJA U VODENOJ LEĆI (*Lemna minor* L.) KAO POKAZATELJ TOKSIČNOG UČINKA ONEČIŠĆENJA KOPNENIH VODA

Maja Mihaljević

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

SAŽETAK

Industrijske otpadne vode, kanalizacijske vode kao i ispirne vode s poljoprivrednih površina glavni su izvori onečišćenja vode i tla. Izuzetno važnim u ispitivanju, detekciji i kvantifikaciji toksičnih djelovanja u okolišu pokazala se primjena biljnih testnih organizama kao biomarkera. Vodena leća se često koristi zbog svoje osjetljivosti na različite toksične tvari te zbog jednostavnog i brzog uzgoja. U ovom sam radu istraživala učinke toksičnih tvari prisutnih u uzorcima površinskih (Sava Jesenice, Sava Županja, Sutla Prišlin, Krapinica, Toplica, Glogovnica Mostari i jezero Kozjak uzimanih tijekom 3 mjeseca) i otpadnih (Zagrebački otpadni gradski sustav - uzorkovana svaka 4 sata tijekom jednog dana, Jakuševac i potok Gorjak - uzorkovani jedanput) voda na lipidnu komponentu stanične membrane modelne biljke *Lemna minor* L. Kao pokazatelj fitotoksičnosti odnosno stupnja oštećenja lipidne komponente stanične membrane praćen je sadržaj malondialdehida. Biljni materijal je uziman nakon tjedan dana pokusa. Pokazatelj opsega peroksidacije lipida bio je značajno povećan kod svih uzoraka otpadnih voda te kod površinskih voda Sutla Prišlin, Krapinica Krapina i jezera Kozjak. Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na prisutnost toksičnih tvari u uzorkovanim vodama i indiciraju potencijalan rizik ne samo za biljne vrste nego i za sve žive organizme. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je sadržaj malondialdehida pouzdan pokazatelj toksičnosti odnosno praćenja kvalitete površinskih i otpadnih voda.

(31 stranica, 8 slika, 1 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski),

Ključne riječi: fitotoksičnost / *Lemna minor* / lipidna peroksidacija

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

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

LIPID PEROXIDATION AS INDICATOR OF WATER POLLUTION USING DUCKWEED (*Lemna minor* L.) AS A TEST SYSTEM

Maja Mihaljević

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology
Rooseveltova trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Industrial wastewater, secondary effluents of sewage treatment plants and run-off from agricultural fields are the major sources of aquatic and terrestrial environment pollution by a variety of toxic compounds. Usage of plant test species has proven essential in investigation, detection and quantification of toxicity in the natural environment. Duckweed (*Lemna minor* L.) is often used as a plant model because it is a widely spread monocot, multiplies rapidly and shows tremendous metal accumulating capacity. Effects of toxic compounds present in chosen surface waters (Sava Županja, Sava Jesenice, Sutla Prišlin, Krapinica Krapina, Toplica downstream from Daruvar, Kutinica before confluence in Ilova, Glogovnica Mostari, lake Kozjak (taken every month during 3 months) and waste waters (ZGOS taken every 4 hours during 24 hours, Jakuševac and Gorjak taken once) on membrane lipids were investigated using duckweed as a plant test system. Plant material was harvested after 7-day exposure. Indicator of lipid peroxidation, malondialdehyde content, considerably increased in all wastewaters and in surface waters Sutla Prišlin, Kutinica and lake Kozjak. Use of primary producers for testing surface and waste waters in combination with physical and chemical analysis, can be good indicator of the environment pollution. Results obtained in this work indicate the presence of toxic compounds in surface and waste waters that may impact aquatic ecosystem but also present potential risk to all living organisms. Results also show that malondialdehyde content is a reliable indicator of toxicity and could be used in the biomonitoring of surface and wastewaters.

(31 pages, 8 figures, 1 table, 29 references, original in Croatian)

Key words: phytotoxicity / *Lemna minor* / lipid peroxidation

Supervisor: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, full professor

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI	3
1.2 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1 BILJNI MATERIJAL	12
3.2 METODE	13
3.2.1 Kultura vodene leće (<i>Lemna minor</i> L.) u uvjetima <i>in vitro</i>	13
3.2.2 Određivanje sadržaja malondialdehida	15
3.2.3 Statistička obrada podataka	16
4. REZULTATI	18
4.1 UČINAK TOKSIČNIH TVARI IZ POVRŠINSKIH VODA NA LIPIDNU KOMPONENTU STANIČNE MEMBRANE VODENE LEĆE	18
4.2 UČINAK TOKSIČNIH TVARI IZ OTPADNIH VODA NA LIPIDNU KOMPONENTU STANIČNE MEMBRANE VODENE LEĆE	21
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA	30

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

Najljepše zahvaljujem asistentici dr. sc. Sandri Radić koja je imala dovoljno strpljenja i vremena da mi pomogne u svakom trenutku. Najviše joj zahvaljujem na iznimno stručnim i kvalitetnim savjetima koji su mi pomogli dovesti ovaj rad do savršenstva.

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

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

Veliko hvala mom Marku na strpljenju, podršci i ljubavi!

Za rast, razvoj i razmnožavanje biljke zahtijevaju optimalne okolišne uvjete. Ukoliko se javljaju znatna odstupanja od tih uvjeta nastupa stres. Stres kod biljaka kao i kod drugih organizama mogu uzrokovati različiti biotički i abiotički čimbenici (virusi, bakterije, paraziti, promjena temperature, nedostatak ili suvišak vode u tlu, manjak mineralnih tvari i sl.).

Biljke su često kako u prirodnim uvjetima tako i kod uzgoja na obradivim površinama izložene ekstremnim vrijednostima okolišnih čimbenika. Svaki takav okolišni čimbenik označava se kao stresni i utječe na biljku u smislu smanjenja produktivnosti i sporijeg rasta. Djelovanje stresnih čimbenika oštećuje vitalne molekule u stanici posredno ili neposredno. Kod posrednog oštećivanja stvaraju se toksične molekule koje sekundarno razaraju osjetljive stanične molekule i utječu na procese vezane uz membrane kao što su provođenje signala i stvaranje energije.

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

Suvremeno čovječanstvo izloženo je neprekidnim i trajnim opasnostima od onečišćenja okoliša. U tehnološkoj proizvodnji, poljoprivredi, prometu i drugim izvorima onečišćenja trenutno ne postoje postupci koji za sobom ne ostavljaju sporedne, često otrovne produkte koji su trajan i opasan izvor trovanja biljaka, životinja i ljudi.

Toksični spojevi mogu izazvati oštećenje stanica te tako dovesti do niza složenih događaja. Lipidna peroksidacija je oblik primarnog toksičnog učinka nekog spoja koji se u stanicama ispoljava nastankom konačnih, sekundarnih produkata lančane reakcije započete djelovanjem slobodnih radikala na masne kiseline prisutne u stanicama. Kao konačni produkt razgradnje lipidnih peroksida polinezasićenih masnih kiselina javlja se malondialdehid (MDA) pa je mjerenjem koncentracije malondialdehida moguće utvrditi stupanj oksidacijskog oštećenja u stanici.

U ovom se istraživanju kvalitete voda po prvi puta u Republici Hrvatskoj koristi lipidna peroksidacija (prikazana preko sadržaja MDA) kao pokazatelj toksičnosti niza onečišćivača prisutnih u kopnenim vodama.

1.1. OTROVNI KISIKOVI SPOJEVI I RADIKALI

Kisik se u osnovnom stanju može smatrati radikalom zbog svoje elektronske konfiguracije - dva nesparena elektrona s paralelnim spinovima - no to je najstabilniji oblik kisika. Naime, kisik zbog paralelnog spina može primiti samo jedan po jedan elektron (monovalentna redukcija) te je i reakcija s neradikalima npr. organskim molekulama vrlo spora jer su elektroni takvih molekula spareni i antiparalelnog spina. Zato je molekularni kisik relativno nereaktivan (Elstner, 1982). Kisik se može aktivirati bilo apsorpcijom energije dovoljne da "obrne" spin jednom od nesparenih elektrona ili monovalentnom redukcijom (prijenos jednog elektrona). Prvim načinom aktivacije nastaje singletni kisik koji može sudjelovati u reakcijama divalentne redukcije (istovremeni prijenos dva elektrona). Stoga taj oblik pokazuje puno veću reaktivnost prema organskim molekulama od kisika.

Monovalentnom redukcijom kisika u postepenim koracima nastaju superoksidni radikal ($O_2^{\bullet}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$) i voda. Kod niske pH vrijednosti protoniranjem $O_2^{\bullet}$ stvara se perhidroperoksidni radikal ($^{\bullet}HO_2$), koji zajedno s $O_2^{\bullet}$ opet može dati H_2O_2 . H_2O_2 je neradikalni štetni produkt kisika, a može ponovno krenuti u reakciju dajući najjači poznati oksidans - hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$) u tzv. Fentonovoj reakciji gdje se Fe^{2+} -kompleks oksidira u Fe^{3+} -kompleks. Fentonova reakcija je ciklička jer se Fe^{3+} -kompleks reducira s $O_2^{\bullet}$, što rezultira obnovljenim nastankom Fe^{2+} -kompleksa što omogućava još jedno reagiranje s H_2O_2 . Prvi korak u redukciji kisika je endoterman tj. zahtijeva energiju, a daljnje redukcije su spontane i zahtijevaju samo donore elektrona ili protona, čime se ostvaruje nastanak štetnih radikala i spojeva kisika (Blokhina i sur., 2003). Oksidacija organskih supstrata može se odvijati na dva načina - $^{\bullet}OH$ se može vezati na organsku molekulu ili može oduzeti vodikov atom organskoj molekuli pri čemu nastaju voda i organski radikal. Reagirajući s kisikom, takav radikal stvara peroksi radikal koji onda dovodi do lančane reakcije oksidirajući druge organske molekule (Arora i sur., 2002).

Dakle, slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule koji sadržavaju jedan ili više nesparenih elektrona te su stoga vrlo nestabilni i jako reaktivni. To su kratko živući oblici kisika koji se zbog svoje visoke reaktivnosti vrlo lako vežu za sve strukture u svojoj neposrednoj okolini, kao što su masti i proteini stanične membrane te DNA.

Rezultat toga su na oko nevidljive promjene poput oštećenja stanične

membrane ili mutacije DNA, a posljedica je razvitak velikog broja različitih bolesti (Valko, 2004).

Slobodni radikali koji se nalaze u organizmu mogu biti egzogenog i endogenog porijekla. Postoji veliki broj egzogenih tj. vanjskih izvora slobodnih radikala, kao što su onečišćeni zrak, UV-zračenje, primjena umjetnih gnojiva, insekticida, pesticida, konzervansa, djelovanje ionizirajućeg zračenja, pušenje, neki lijekovi itd. Stvaranje slobodnih radikala može biti povećano i u stanjima stresa te povećanog psihičkog i fizičkog napora. Endogeni slobodni radikali nastaju u organizmu tijekom normalnih staničnih funkcija, dakle metabolizmom hrane i procesom staničnog disanja. Za stvaranje ATP-a aerobni organizmi koriste kisik kao posljednju molekulu za prihvaćanje elektrona u procesu oksidacije tj. u prijenosu elektrona s jednog atoma na drugi (Blokhina i sur., 2003). Međutim, u tom procesu mogu nastati i nespareni elektroni koji onda stvaraju slobodne radikale. Lipidna peroksidacija se javlja kao posljedica djelovanja otrovnih kisikovih atoma i slobodnih radikala u stanici.

Zbog velike koncentracije kisika kloroplasti se smatraju glavnim izvorom reaktivnih oblika kisika u biljnim stanicama (Pevalek-Kozlina, 2003; Foyer i Noctor, 2000). Otrovnici kisikovi spojevi i radikali (engl. "reactive oxygen species" – ROS) nastaju u gotovo svim dijelovima biljne stanice i u malim količinama su stalni produkti normalnog staničnog metabolizma jer su uključeni u sva područja aerobnih procesa poput disanja i fotosintetskog prijenosa elektrona na komponentama fotosistema I i II (Foyer i Noctor, 2000), oksidacije različitih supstrata i dr.

Toksičnost otrovnih kisikovih spojeva i radikala proizlazi iz njihove sposobnosti da potaknu kaskadne reakcije radikala koje vode oštećivanju proteina, DNA, membranskih lipida i konačno smrti stanice.

Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika uključujući i teške metale povećava se stvaranje kisikovih radikala i molekula oštećenih radikalima, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Njihovo se stvaranje tijekom starenja zbog učinka teških metala povećava jer se narušava ravnoteža između njihove proizvodnje i eliminacije (Fodor, 2002). Reaktivni oblici kisika mogu oštetiti proteine, lipide, polisaharide i nukleinske kiseline uzrokujući propadanje membrana, inaktivaciju enzima i oštećenja DNA (Thompson i sur., 1987).

Proizvodnja kisikovih radikala i to alkoksi radikala, peroksi radikala i singletnog kisika raste zbog lipidne peroksidacije koja je povećana u uznapredovaloj

senescenciji (Thompson i sur., 1987). Veće količine singletnog kisika uzrokuju pojavu drugih oblika kisikovih radikala. Izolirani peroksisomi iz listova prirodno senescentnog graška pokazuju povišenu razinu lipidne peroksidacije, no također i povećanu razinu superoksida i vodikovog peroksida (Pastori i del Río, 1997).

No, ROS imaju dvostruku ulogu tj. ne djeluju samo destruktivno nego imaju i ulogu signalnih molekula. Vodikov peroksid je stabilan intermedijer metabolizma ROS-a koji može difundirati kroz biološke membrane, otići s mjesta njegova nastanka i djelovati u mnogim signalnim putovima uključenim u kontrolu i regulaciju bioloških procesa kao što su programirana stanična smrt, djelovanje biljnih regulatora rasta (fitohormona), odgovor na stres, te rast i razvoj biljaka (Dat i sur., 2000). Do tih spoznaja došlo se proučavanjem uloge ROS-a u obrani biljke protiv patogena. Tijekom infekcije, ROS produciraju NADPH-oksidaze i peroksidaze stanične stijenke. Nastali H_2O_2 difundira u stanicu i inducira obrambene mehanizme, uključujući i programiranu staničnu smrt (Vranová i sur., 2002). Pored H_2O_2 , posljednjih godina otkrivena je signalna uloga brojnih reaktivnih kisikovih jedinki. Male koncentracije superoksidnih radikala uzrokuju ekspresiju nekih gena čime se sprječava pojava peroksidacije lipida.

Ova nova saznanja pokazuju da ROS nisu samo toksični nusprodukti metabolizma, već su i ključni regulatori metabolizma i obrane biljaka.

1.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Promjene svojstava stanične membrane posljedica su nespecifičnih reakcija na stres koje se javljaju u različitim tipovima stresa. Lipidna peroksidacija je pokazatelj oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi ukoliko je stvaranje toksičnih oblika kisika premašilo mogućnosti mehanizama za uklanjanje tih otrova (Alscher i sur., 2002).

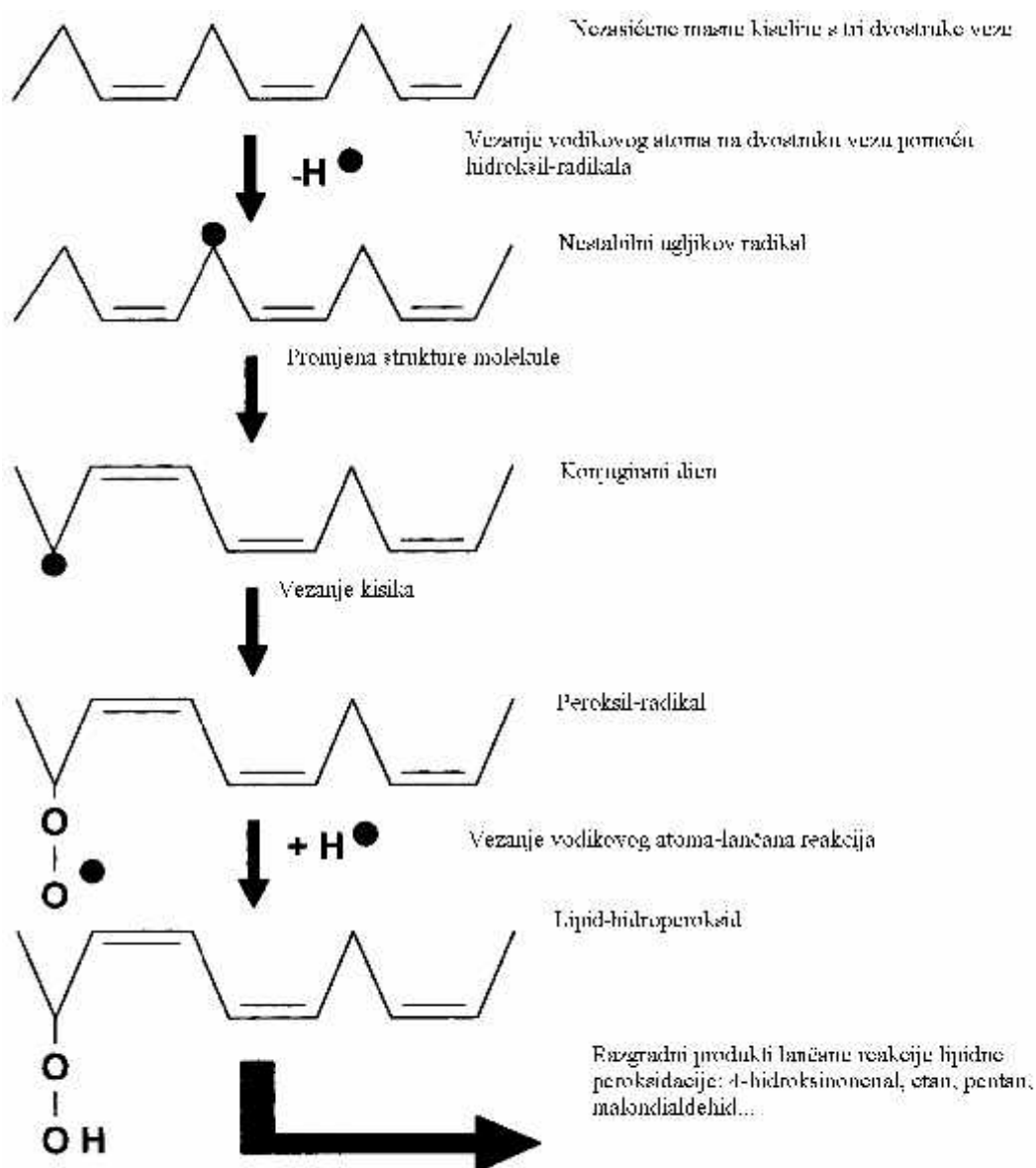
Stresni uvjeti uzrokuju promjene u staničnoj membrani a time utječu i na procese vezane uz provođenje signala i stvaranje energije (Uma i sur., 1995). Lipidna peroksidacija ukazuje na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi ukoliko je produkcija otrovnih spojeva kisika premašila mogućnosti mehanizama za uklanjanje tih otrova (Jinmin i Huang, 2002). To je sekundarna reakcija na stres a izazivaju je primarni proizvodi stresa, radikali kisika i otrovni spojevi kisika.

Glavne sastavnice stanične membrane su polinezasićene masne kiseline koje su posebno osjetljive na peroksidaciju. Nihova sinteza *de novo* zahtijevala bi mnogo energije pa je očuvanje membranskih lipida pomoću antioksidacijskog sustava najbolji način očuvanja funkcionalnih membrana (Blokina i sur., 2003).

Lipidna peroksidacija uključuje tri različita koraka: inicijacija, propagacija i terminacija (Shewfelt i Purvis, 1995). Taj proces se ubraja u najbolje istražene posljedice otrovnih kisikovih spojeva i radikala na strukturu i funkciju membranske komponente biljne stanice (Blokina i sur., 2000).

Hidroksilni radikal i singletni kisik nastali u stresnim uvjetima reagiraju s metilenskom skupinom polinezasićene masne kiseline uz izdvajanje vodika s metilne skupine te nastaje peroksilni radikal. Taj je radikal vrlo reaktivan i reagira s drugom polinezasićenom masnom kiselinom. Tada nastaju lipidni hidroksiperoksid i lipidni radikal koji nastavlja lančanu reakciju. Lanac reakcija završava kada reagiraju dva radikala stvarajući produkte koji nisu radikali. Slobodni radikali kisika mogu formirati i konjugirane diene masnih kiselina kidajući dvostruke veze u njima.

Enzim lipoksigenaza koji katalizira hidroperoksidaciju polinezasićenih masnih kiselina u kaskadnom prijenosu signala može biti izvor radikala lipida te tako započeti lanac peroksidacije (Brash, 1999).



Slika 1. Peroksidacijska razgradnja polinezasićenih masnih kiselina započeta jednim slobodnim radikalom (Timbrell, 2000).

Direktna posljedica ovih događaja biti će povećana propusnost stanične membrane, gubitak hidrolitičkih enzima koji se nalaze u lizosomima i koji će izazvati razgradnju staničnog sadržaja. Enzimi koji u aktivnom mjestu sadrže aminokiselinu koja sadrži sumpor, procesom lipidne peroksidacije mogu biti inhibirani, a toksični učinak će biti pojačan djelovanjem razgradnih produkata nastalih lipidnom peroksidacijom koji i sami imaju biološki učinak (sl. 1; Timbrell, 2000).

Lipidna peroksidacija može se zaustaviti neenzimskim i enzimskim sustavima. Tokoferol (vitamin E) važan je antioksidans koji zaustavlja lipidnu peroksidaciju popravljajući radikale masnih kiselina tako da donira vodikov kation radikal lipida, a kako time postaje i sam radikal za oporavak mu treba askorbinska kiselina (vitamin C) ili glutathion. Tokoferol funkcionira u lipidnoj fazi membrane, a askorbat u hidrofilnoj fazi i njihovo je djelovanje sinergetsko (Blokhina i sur., 2003).

U ovom sam radu istraživala učinke toksičnih tvari prisutnih u uzorcima površinskih (Sava Jesenice, Sava Županja, Sutla Prišlin, Krapinica, Toplica, Glogovnica Mostari i jezero Kozjak uzimanih tijekom 3 mjeseca) i otpadnih (Zagrebački otpadni gradski sustav - uzorkovana svaka 4 sata tijekom jednog dana, Jakuševac i potok Gorjak - uzorkovani jedanput) voda na lipidnu komponentu stanične membrane modelne biljke *Lemna minor* L.

Cilj istraživanja provedenih u ovom diplomskom radu je:

- utvrditi pouzdanost sadržaja malondialdehida kao pokazatelja toksičnosti otpadnih i površinskih voda
- na temelju dobivenih rezultata procijeniti u kolikoj mjeri dobiveni rezultati istraživanja upotpunjuju konačnu sliku o stvarnom stanju kakvoće odabranih voda

3.1. BILJNI MATERIJAL

Vodena leća (*Lemna minor* L.) široko je rasprostranjena jednosupnica vrlo jednostavne građe koja se sastoji od članaka koji sličje listu i slobodno plivaju, te se pupanjem intenzivno razmnožavaju (sl. 2). Veći, prednji dio svakog članka odgovara listu, a stražnji reduciranoj osi izdanka i iz njega se razvija jedan korijen. Kozmopolitskog je rasprostranjenja te pokriva površine mirnih voda (jezera i rijeke). Mnoge prednosti kao brzi rast, genetski homogene populacije, lakoća uzgoja i osjetljivost na mnoge toksične tvari čine je idealnim testnim organizmom (Lewis, 1995).



Slika 2. *Lemna minor* L.

3. 2. METODE

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

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

Prije nasađivanja biljaka, uzorcima površinskih – Sava Jesenice (SJ), Sava Županja (SŽ), Sutla Prišlin (SP), Krapinica Krapina (KR), Toplica nizvodno od Daruvara (T), Kutinica prije utoka u Ilovu (KU), Glogovnica Mostari (GM), jezero Kozjak (JK) i otpadnih – Zagrebački otpadni gradski sustav (ZGOS), Jakuševac (JAK) i potok Gorjak testnih voda dodani su makro- i mikroelementi po Steinbergu (1946) nakon čega su sterilizirani hladnom filtracijom korištenjem celuloza-nitratnih membrana "Whatman" (veličine pora 0,45 µm, promjera 47 mm). Uzorci površinskih voda su sakupljeni jednom mjesečno tijekom tri mjeseca. Uzorci otpadnih voda uzeti iz potoka Gorjak i Jakuševac su sakupljeni jednokratno dok je kompozitni uzorak ZGOS-a uzorkovan svaka četiri sata tijekom jednog dana. Nakon 2 tjedna rasta na sterilnoj podlozi po Steinbergu desetak zdravih kolonija s 2-3 listića je nasađeno u Erlenmeyerove tikvice od 300 mL koje su sadržavale po 130 mL uzoraka testnih voda.

Biljke su uzgajane u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame), na temperaturi 24±1 °C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki (90 µEm⁻²s⁻¹) u klimakomori. Uzorci biljnog tkiva za pokus uzimani su nakon 7 dana rasta.

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

Pirson i Seidel			Steinberg		
MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L	MAKROELEMENTI	mg/L	mmol/L
KNO ₃	400	3,95	KNO ₃	350	3,46
KH ₂ PO ₄	200	1,47	KH ₂ PO ₄	90	0,66
			K ₂ HPO ₄	12,6	0,072
MgSO ₄ x 7H ₂ O	300	1,21	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100	0,41
CaCl ₂ x 2H ₂ O	804	5,46	Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	295	1,25
MIKROELEMENTI	μg/L	μmol/L	MIKROELEMENTI	μg/L	μmol/L
MnCl ₂ x 4H ₂ O	300	1,5	MnCl ₂ x 4H ₂ O	180	0,91
H ₃ BO ₃	500	8,1	H ₃ BO ₃	120	1,94
Na ₂ – EDTA x 2H ₂ O	1860	4,99	Na ₂ – EDTA x 2H ₂ O	1500	4,03
željezni citrat	5000	20	FeCl ₃ x 6H ₂ O	760	2,81
			Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	44	0,18
			ZnSO ₄ x 7H ₂ O	180	0,63
ORGANSKI DODACI	g/L	mmol/L			
saharoza	10	29,2			
asparagin	0,1	0,66			

3.2.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA

Kako bih odredila sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 400 μL uzorka s 1500 μL reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina otopljena u 10%-tnoj trikloroetanoj kiselini). Kao slijepu probu koristila sam 1,5 mL reakcijske smjese. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroeprovete te ih zagrijavała u sušioniku 30 min na 95 °C. Nakon toga sam ih naglo ohladila na ledu te centrifugirala 10 min na 10 000 g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer, 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama $\text{nmol/g}_{\text{sv. t}}$ uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika $\pm$ standardna devijacija.

$$[\text{MDA}] = \frac{A \times V_{\text{r.s.}} \times \text{F.R.}}{V_{\text{uzor.}} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{M/ml}]$$

$$\text{MDA/g} = \frac{[\text{MDA}] \times 1000}{m(\text{g}) / 1\text{ml}} \quad [\text{nmol/g}_{\text{sv. t}}]$$

$V_{\text{r.s.}}$ = volumen reakcijske smjese = 1,9 mL

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$V_{\text{uzor.}}$ = volumen uzorka = 0,4 mL

ϵ = ekstinkcijski koeficijent = $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

l = duljina optičkog puta = 1 cm

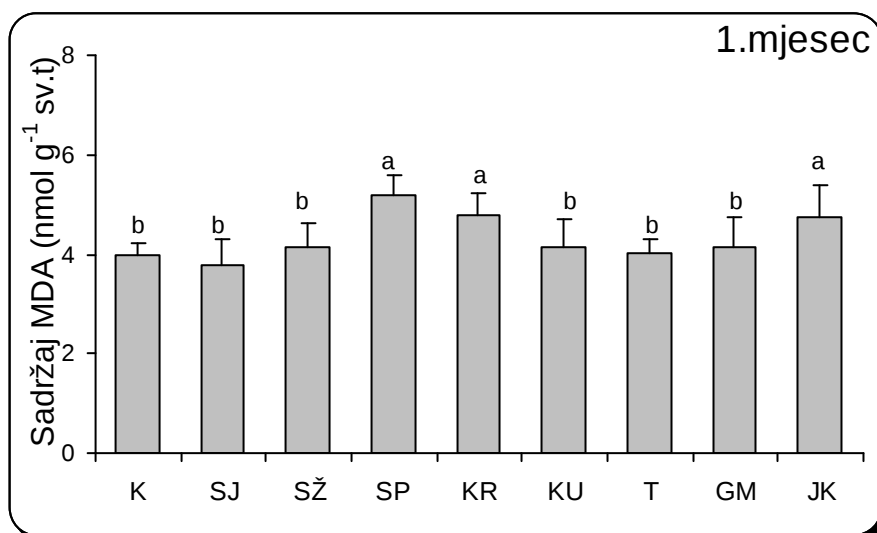
3.2.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

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

4.1. UČINAK TOKSIČNIH TVARI IZ POVRŠINSKIH VODA NA LIPIDNU KOMPONENTU STANIČNE MEMBRANE VODENE LEĆE

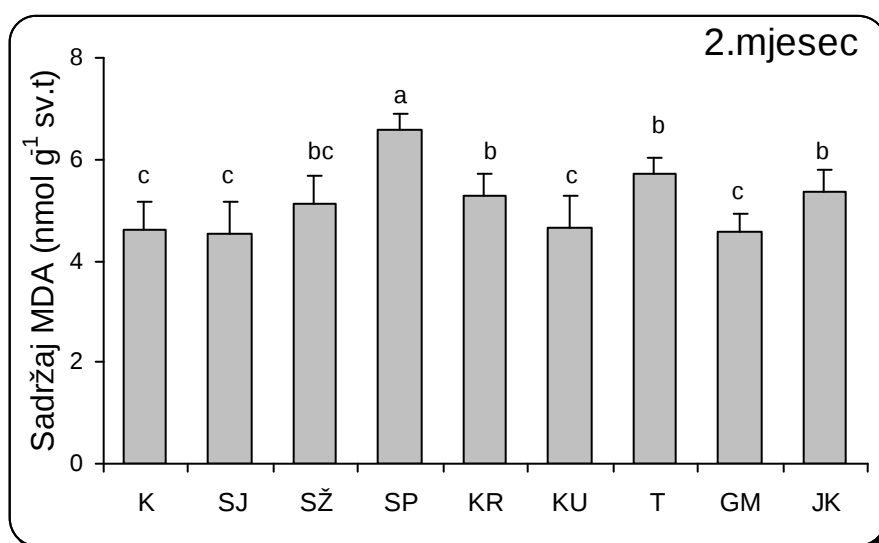
Opseg lipidne peroksidacije tj. stupanj oštećenja lipidne komponente stanične membrane procijenjen je pomoću sadržaja malondialdehida (MDA).

Sadržaj MDA u biljkama koje su rasle na gotovo svim uzorcima površinskih voda sakupljenih nakon mjesec dana (Sava Jesenice, Sava Županja, Kutinica, Toplica i Glogovnica Mostari) nije se bitno razlikovao od sadržaja MDA u kontrolnim biljkama. Sadržaj MDA u biljkama izloženim uzorcima voda Sutla Prišlin, Krapinica i jezero Kozjak bio je statistički značajno povećan u usporedbi s kontrolom (slika 3).



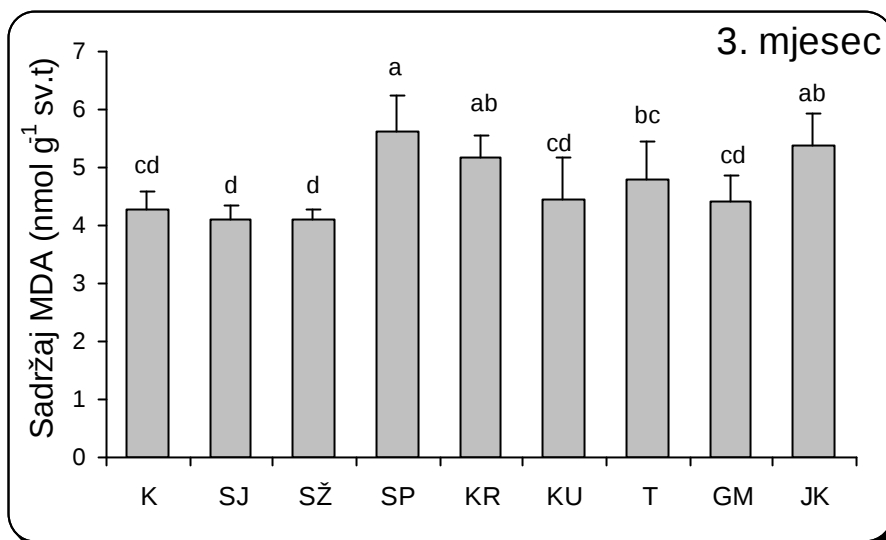
Slika 3. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u površinskim vodama (Sava Jesenice - SJ, Sava Županja - SŽ, Sutla Prišlin - SP, Krapinica - KR, Kutinica - KU, Toplica - T, Glogovnica Mostari - GM, Jezero Kozjak - JK) sakupljenim jednom mjesečno u razdoblju od 3 mjeseca. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj MDA u biljkama koje su rasle na uzorcima površinskih voda Sava Jesenice, Kutinica i Glogovnica Mostari sakupljeni nakon drugog mjeseca pokusa bio je sličan sadržaju MDA u kontrolnim biljkama (slika 4). Sadržaj MDA u biljkama izloženim uzorcima voda Krapinica, Toplica i jezero Kozjak bio je statistički značajno povećan u usporedbi s kontrolom. Najveći porast sadržaja MDA (43% u usporedbi s kontrolom) zabilježen je u biljkama raslim na uzorku vode Sutla Prišlin dok je u biljkama koje su rasle na uzorku vode Sava Županja zapažen lagani porast tog pokazatelja.



Slika 4. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u površinskim vodama (Sava Jesenice - SJ, Sava Županja - SŽ, Sutla Prišlin - SP, Krapinica - KR, Kutinica - KU, Toplica - T, Glogovnica Mostari - GM, Jezero Kozjak - JK) sakupljenim jednom mjesečno u razdoblju od 3 mjeseca. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

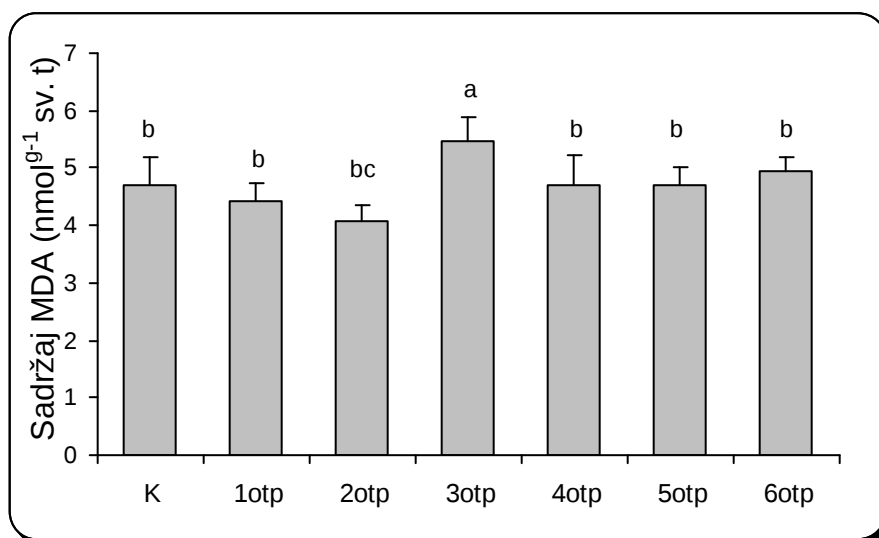
Sadržaj MDA u biljkama koje su rasle na uzorcima površinskih voda Sava Jesenice, Sava Županja, Kutinica i Glogovnica Mostari sakupljeni nakon trećeg mjeseca pokusa bio je sličan kao u kontroli dok su uzorci površinskih voda Sutla Prišlin, Krapinica i jezero Kozjak uzrokovali znatno povećanje tog parametra u odnosu na kontrolu (slika 5). U biljkama uzgojenim na uzorku vode Toplica zapažen je lagani porast sadržaja MDA.



Slika 5. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u površinskim vodama (Sava Jesenice - SJ, Sava Županja - SŽ, Sutla Prišlin - SP, Krapinica - KR, Kutinica - KU, Toplica - T, Glogovnica Mostari - GM, Jezero Kozjak - JK) sakupljenim jednom mjesečno u razdoblju od 3 mjeseca. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

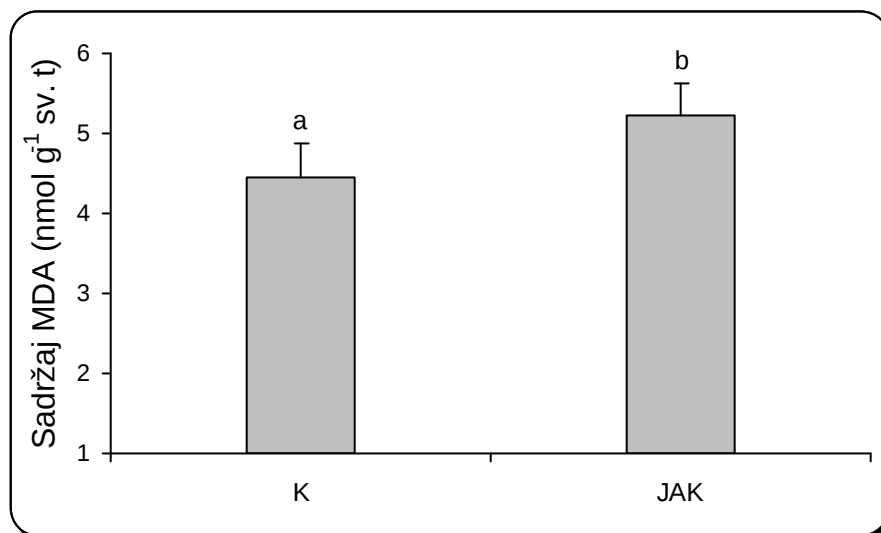
4.2. UČINAK TOKSIČNIH TVARI IZ OTPADNIH VODA NA LIPIDNU KOMPONENTU STANIČNE MEMBRANE VODENE LEĆE

Uzorak otpadne vode ZGOS (Zagrebački otpadni gradski sustav) 3 (uzete nakon 12h) je značajno povećao sadržaj MDA tj. uzrokovao znatno oštećenje stanične membrane u vodenoj leći nakon tjedan dana pokusa (slika 6). Ostali uzorci ZGOS nisu se po sadržaju MDA bitno razlikovali od kontrole.



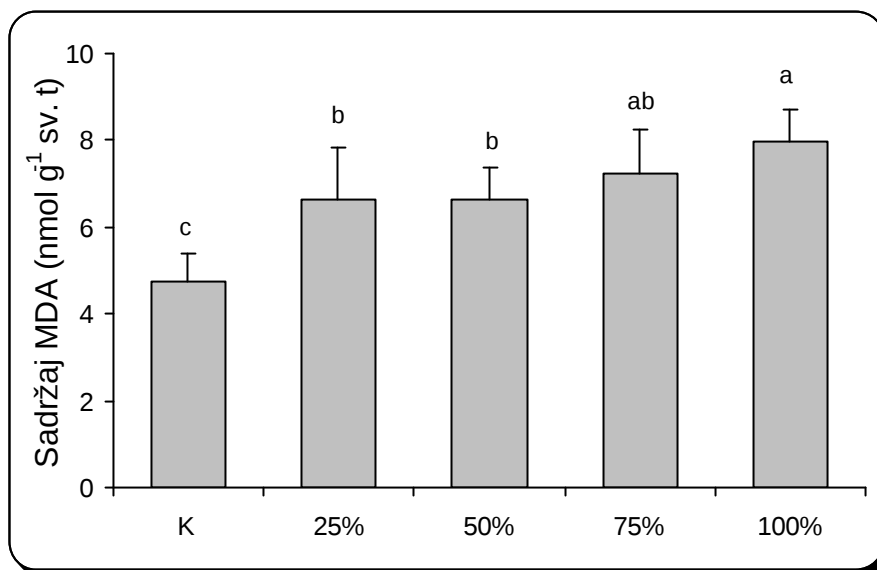
Slika 6. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u otpadnim vodama ZGOS (kompozitni uzorak sakupljan svaka 4 h tijekom 24h). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Uzorak otpadne vode Jakuševac je značajno povećao sadržaj MDA tj. uzrokovao znatno oštećenje lipidne komponente stanične membrane u vodenoj leći nakon tjedan dana pokusa (slika 7).



Slika 7. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u otpadnoj vodi Jakuševac. Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Serijska razrjeđenja uzorka potoka Gorjak su uzrokovala značajno povećanje sadržaja MDA, jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije (slika 8). Dva manja razrjeđenja (25 i 50%) otpadne vode Gorjak povećala su sadržaj MDA 39% u odnosu na kontrolu. Razrjeđenje otpadne vode Gorjak od 75% je povećalo sadržaj MDA 52% u odnosu na kontrolu dok je najveći sadržaj MDA (68%) zabilježen u nerazrijeđenom uzorku te vode.



Slika 8. Sadržaj malondialdehida u vodenoj leći uzgajanoj sedam dana u otpadnoj vodi uzetoj iz potoka Gorjak (Savski Marof). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

U ovom je radu po prvi put lipidna peroksidacija primijenjena kao pokazatelj toksičnog učinka niza onečišćivača prisutnih u kopnenim vodama na lipidnu komponentu stanične membrane vodene leće.

U ovom su istraživanju procijenjeni toksični učinci osam površinskih (Sava Jesenice, Sava Županja, Sutla Prišlin, Krapinica Krapina, Kutinica prije ušća u Ilovu, Toplica nizvodno od Daruvara, Glogovnica Mostari, jezero Kozjak uzorkovanih jednom mjesečno u tri mjeseca) i tri otpadne (Zagrebački gradski otpadni sustav – kompozitni uzorak sakupljan svaka 4h unutar jednog dana, Jakuševac i potok Gorjak – uzorkovani jednom) vode potencijalno onečišćene otpadom industrijskog, poljoprivrednog i komunalnog porijekla.

Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika uključujući i teške metale povećava se stvaranje kisikovih radikala i molekula koje su oštećene radikalima a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Njihovo se stvaranje tijekom starenja zbog učinka teških metala povećava jer se narušava ravnoteža između njihove proizvodnje i eliminacije (Fodor, 2002).

Lipidna peroksidacija ukazuje na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi ukoliko stvaranje otrovnih spojeva kisika premaši mogućnosti mehanizama za uklanjanje tih otrova (Jinmin i Huang, 2002). Uzorci površinskih voda Sutla Prišlin (SP), Krapinica Krapina (KR) i jezero Kozjak (JK) sakupljeni u razdoblju od 3 mjeseca izazvali su značajno povećanje sadržaja malondialdehida. Stipaničev (2009) je utvrdila da uzorci vode SP i KR sadrže povećane količine amonija, ali i teških metala poput olova i žive. Povećana lipidna peroksidacija mogla bi biti posljedica pojačane aktivnosti Mehlerove reakcije s amonijem, no i s navedenim teškim metalima (Britto i Kronzucker, 2002).

Gotovo svi uzorci otpadnih voda izazvali su značajno oštećenje lipidne komponente stanične membrane. Uzorak otpadne vode uzete nakon 12h iz Zagrebačkog gradskog otpadnog sustava (ZGOS 3) i Jakuševac (JAK) su značajno povećali sadržaj MDA tj. uzrokovali su znatno oštećenje stanične membrane u vodenoj leći nakon tjedan dana pokusa. U uzorku vode JAK utvrđena je povećana količina olova i žive, a u uzorku ZGOS 3 osim ta dva teška metala, bile su povećane količine bakra i kroma (Stipaničev, 2009). Sva razrjeđenja uzoraka potoka Gorjak su uzrokovala značajno povećanje sadržaja MDA, jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. Ovakav rezultat vjerojatno je posljedica veće aktivnosti raznih

industrijskih postrojenja ili ustanova čiji rad rezultira ispuštanjem različitih organskih tvari i teških metala (pesticidi, herbicidi, otapala iz otpadnih voda tvorničkih postrojenja itd.). Peroksidacija lipida u tim uzorcima mogla bi biti posljedica povećanih količina željeza (Stipaničev, 2009). Poznato je da se količina reaktivnih oblika kisika posebice povećava u prisutnosti metalnih kofaktora koji su sposobni za redoks ciklus, kao što je Fe ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$). Bakar, aluminij, kadmij, cink i željezo uzrokuju oštećenja vezana uz oksidacijski stres (Dat i sur., 2000). Suvišak željeza uzrokuje oksidacijsko oštećenje zbog njegovog potencijala reagiranja sa $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 što rezultira nastajanjem $\text{OH}^{\bullet}$ koji se smatra najtoksičnijim od svih reaktivnih oblika kisika (Dat i sur., 2000).

Stresni uvjeti uzrokuju promjene u staničnoj membrani a time utječu i na procese vezane uz provođenje signala i stvaranje energije (Uma i sur., 1995). Česta metabolička promjena u stresnim uvjetima, do koje dolazi prije vidljivih simptoma, je povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Povećan sadržaj antioksidacijskih enzima utvrđen je u odgovoru biljaka na različite stresne čimbenike kao što su teški metali, ranjavanje, povišena temperatura, smrzavanje i suša (Gosset i sur. 1994, Edreva i sur., 1998).

Onečišćenja mogu dovesti do naglih promjena životnih uvjeta i tako ugroziti opstanak nekih organizama izazivajući pri tome neposredno ili posredno nepovoljne i nepoželjne promjene. Najbolja se procjena učinka površinskih i otpadnih voda na organizme postiže uporabom bioloških testova kojima je cilj odrediti promjene koje nastupaju na staničnoj razini testnih organizama prateći pri tome njihov rast, razvoj, te različite enzimске procese koji nastupaju zbog opterećenja voda izazvanih antropogenim i prirodnim procesima. Ovim se radom po prvi puta u Republici Hrvatskoj provelo istraživanje s glavnim ciljem praćenja kvalitete i sigurnosti voda putem procesa lipidne peroksidacija kao pokazatelja toksičnog učinka onečišćenja kopnenih voda na modelu biljke vodene leće (*Lemna minor* L.).

Dobiveni rezultati ukazuju na važnost uvođenja ekotoksikoloških studija u programe praćenja kakvoće voda jer se testiranjem toksičnosti i kemijskim istraživanjem voda omogućava bolji uvid odnosno preciznija procjena utjecaja učinka voda na prehrambene lance u kojima istraživane vrste organizama čine jedan od sastavnih dijelova.

Sadržaj malondialdehida, pokazatelja opsega lipidne peroksidacije, bio je značajno povećan u vodenoj leći koja je rasla na površinskim vodama Sutla Prišlin, Krapinica Krapina i jezero Kozjak tijekom tri mjeseca dok su gotovo svi uzorci otpadnih voda izazvali značajno oštećenje lipidne komponente stanične membrane što ukazuje na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu.

Rezultati dobiveni u ovom radu dokazuju prisutnost fitotoksičnih tvari u uzorkovanim vodama i ukazuju na potencijalan rizik ne samo za biljne vrste nego i za sve žive organizme.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je sadržaj malondialdehida pouzdan pokazatelj toksičnosti odnosno praćenja kvalitete površinskih i otpadnih voda.

- Alscher RG, Ertuk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Biol* 53: 1331-1341
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82: 1227-1238
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review 91: 179-194
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV, Hoikalla A, Wähälä K, Chirkova TL (2000) Antioxidant status of anoxia-tolerant and -intolerant plant species under anoxia and reaeration. *Physiol Plant* 109: 396-403
- Brash AR (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274: 23679-23682
- Britto DT, Kronzucker HJ (2002) NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J Plant Physiol* 159: 567-584
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Moll Life Sci* 57: 779-795
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42
- Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R, Gesheva E (1998) Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical /active oxygen scavenging systems. *Biol Plant* 41: 185-191
- Eltner EF (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annu Rev Plant Physiol* 33: 73-96
- Fodor F (2002) Physiological responses of vascular plants to heavy metals. U: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str 149-177
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processes in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol* 146: 359-388
- Gosset DR, Millhollon EP, Lukas MC, Banks SW, Marney MM (1994) The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* 13: 498-503
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I - Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125: 189-198

- Jinmin F, Huang B (2002) Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localised drought stress. *Environ Exp Bot* 45: 105-114
- Krajnčič B, Devidé Z (1980) Report on photoperiodic responses in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich* 47: 75-86
- Lewis MA (1995) Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environ Pollut* 87: 319-336
- Pastori GM, del Río LA (1997) Natural senescence in pea leaves. An activated oxygen mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol* 113: 411-418
- Pevalek-Kozlina B (2003) *Fiziologija bilja*, Profil International, Zagreb
- Pirson A, Seidel F (1950) Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Kalziummangel. *Planta* 38: 431-473
- Shewfelt RL, Purvis AC (1995) Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Hort Sci* 30: 213-218
- Steinberg R (1946) Mineral requirement of *Lemna minor*. *Plant Physiol* 21: 42-48
- Stipaničev D (2009) Učinak toksičnih sastojaka prirodnih i otpadnih voda na biljne testne organizme. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Thompson JE, Legge RL, Barber RF (1987) The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* 105: 317-344
- Timbrell J (2000) Primary Events: Lipid Peroxidation. U: *Principles of Biochemical Toxicology* (J Timbrell, ur.), Taylor and Francis, London, UK str. 204–213
- Uma S, Prasad TG, Udaya Kumar M (1995) Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Ann Bot* 76: 43-49
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266: 37–56
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 53: 1227–1236