Učinak dušika na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišaja Evernia prunastri

Ćavarušić, Božana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:189243

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno- matematički fakultet

Biološki odjsek

Božana Ćavarušić

Učinak dušika na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišaja *Evernia prunastri*

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se od srca svojoj mentorici Mirti Tkalec na velikoj pomoći i puno strpljenja tijekom pisanja ovog rada.

Veliko hvala mami Gordani i sestrama Saneli i Mareli na velikoj potpri, strpljenju i bodrenju kada je bilo najteže. Bez vas moj bi put bio puno teži.

Od srca se zahvaljujem i svom dečku Ivici što je svo vrijeme studija bio uz mene, bodrio me i davao mi snagu koju drugi nisu mogli. Hvala na svoj ljubavi, strpljenju i vjeri u mene.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su svojom prisutnošću olakšali i uljepšali godine studiranja.

Posebno hvala baki Marici i didi Mići bez kojih ne bih dobila mogućnost pisati ovaj rad.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak dušika na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u lišaja *Evernia prunastri*

Božana Ćavarušić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lišajevi su fotosintetski organizmi koji se često koriste kao bioindikatori zagađenja zraka. Vrsta lišaja *Evernia prunastri* vrlo je osjetljiva na zagađenje zraka dušikovim spojevima. Štetan utjecaj dušikovih spojeva povezan je i s drugim okolišnim parametrima poput osvjetljenja i vlažnosti. Cilj ovog istraživanja bio je provjeriti kako dušik u obliku amonijevih iona odnosno nitrata djeluje na fotosintetsku učinkovitost i pigmente lišaja *Evernia prunastri*. Uzorci lišajeva tretirani su 30 minutnim uranjanjem u 1 M otopinu kalijevog nitrata, 1 M otopinu amonijevog nitratai 0,5 M otopinu amonijevog sulfata. Dio uzoraka tijekom trajanja pokusa izložen je slabijem intenzitetu svjetla (40 µmol fotona m^{-2} s^{-1}), a dio jačem (100 µmol fotona m^{-2} s^{-1}) kako bi se utvrdio utjecaj osvjetljenja. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* i određivanje udjela klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida te kvocijenta feofitinizacije napravljeno je 3., 7. i 14. dan nakon tretmana dušikom. Rezultati su pokazali da dušikovi spojevi imaju značajan negativan učinak na fotosintezu u lišaja *Evernia prunastri* budući da su uzrokovali sniženje vrijednosti parametara fluorescencije klorofila kao i smanjenje udjela fotosintetskih pigmenata u tkivu. Značajniji utjecaj pokazali su tretmani dušikom u obliku amonijevih iona, a nešto manji utjecaj oni gdje je dušik bio samo u obliku nitrata. Izlaganje lišajeva tretiranih dušikom jačem intenzitetu svjetlosti imalo je negativniji utjecaj na fotosintetsku učinkovitost i pigmente u odnosu na izlaganje slabijem intenzitetu.

(72 stranica, 34 slika, 29 tablica, 40 literaturnih navoda, hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: fotosinteza, pigmenti, kalijev nitrat, amonijev nitrat, amonijev sulfat, svjetlost

Voditelj: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof.

Dr. sc. Ines Radanović, izv. prof.

Dr. sc. Iva Juranović Cindrić, izv. prof.

Dr. sc. Draginja Mrvoš- Sermek, izv. prof

Rad prihvaćen: 5.9.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

The effect of nitrogen on photosynthetic efficiency and pigments in the lichens *Evernia prunastri*

Božana Ćavarušić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lichens are photosynthetic organisms that are often used as bioindicators of air pollution. One of the lichen species that is very sensitive to air pollution by nitrogen compounds is *Evernia prunastri.* The harmful effect of nitrogen compounds is related also to the other environmental parameters such as light intensity and humidity. The goal of this research was to find out how nitrogen in the form of ammonium ions or nitrates affects photosynthetic efficiency and pigments of the *Evernia prunastri*. Lichen samples were treated by immersion in a 1 M potassium nitrate solution, a 1 M ammonium nitrate solution and a 0,5 M ammonium sulfate solution for 30 minutes. In order to determine the influence of light, one group of the samples was exposed to a lower light intensity (40 μmol photon m^{-2} s^{-1}) and another to a higer light intensity (100 μmol photon m^{-2} s^{-1}) during the experiment. Chlorophyll *a* flourescence measurements as well as the determination of the content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids, and the phaeophytinization quotient were done on the 3rd, 7th and 14th day after the nitrogen treatment. The results showed that nitrogen compounds have a significant negative effect on photosynthesis of the *Evernia prunastri* since they caused a decrease of chlorophyll flourescence parameters as well as a decrease in the content of photosynthetic pigments in lichen tissue. A treatment with nitrogen in the form of ammonium ions had a more severe effect than a treatment with nitrogen applied only in the form of nitrate. Exposure of nitrogen-treated lichen to a higher light intensity had a more negative effect on the photosynthetic performance and pigments than exposure to a lower light intensity.

(72 pages, 34 figures, 29 tables, 40 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Supervisor: Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

Key words: photosyntesis, pigments,potassium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, light

Reviewers: Dr. Mirta Tkalec, Assoc.Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc.Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc.Prof.

Dr. Draginja Mrvoš Sermek, Assoc.Prof.

Thesis accepted: September 5, 2017

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Što su lišajevi? 1

1.2. Lišajevi- bioindikatori zagađenja 2

1.3. *Evernia prunastri* (L.) Ach 4

1.4. Fotosinteza 5

1.5. Ciljevi istraživanja 11

2. MATERIJALI I METODE 12

2.1. Istraživani materijal 12

2.2. Kemikalije 12

2.3. Tretiranje kemikalijama 13

2.4. Mjerenje fluorescencije klorofila *a in vivo* 15

2.5. Ekstrakscija i određivanje udjela fotosintetskih pigmenata 16

2.6. Statistička obrada 16

3. REZULTATI 18

3.1. Fluorescencija klorofila *a in vivo* 18

3.1.1. Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) 18

3.1.2. Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY) 23

3.1.3. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) 29

3.1.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescecije (NPQ) 35

3.2. Fotosintetski pigmenti 42

3.2.1. Klorofil *a* 42

3.2.2. Klorofil *b* 46

3.2.3. Ukupni karotenoidi 50

3.2.4. Kvocijent feofitinizacije 53

4. RASPRAVA 58

5. ZAKLJUČAK 68

6. LITERATURA 69

7. ŽIVOTOPIS 72

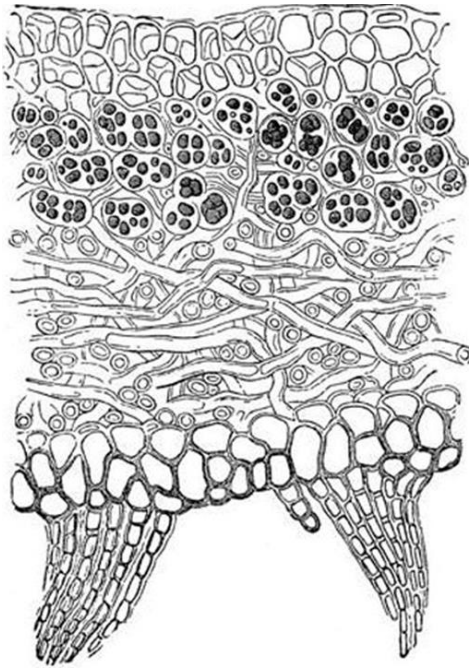
1. UVOD

1.1. Što su lišajevi?

Lišajevi su organizmi koje čine predstavnici dvaju carstava. Jedan predstavnik iz carstva je gljiva (mikobiont), a drugi uvijek mora imati mogućnost procesa fotosinteze (fotobiont). Ako ulogu fotobionta ima alga tada se taj član naziva fikobiont, a kada tu ulogu preuzima cijanobakterija nazivamo ga cijanobiont. Priroda simbioze u lišaja je još diskutabilna i zavrjeđuje daljnje istraživanje. Većina literature i mnoga istraživanja slažu se da su lišajevi klasičan primjer mutualističkog odnosa, u kojem oba člana imaju korist od međusobnog odnosa. Unatoč tome, neki ih smatraju primjerom parazitskog odnosa s obzirom na to da u odnosu većinu koristi ima mikobiont, a fotobiont se sporije razvija u takvom odnosu nego kao slobodnoživući organizam (Ahmadijan, 1993 prema Nash, 2008). U prilog tvrdnji da je odnos u lišajeva mutualistički ide i činjenica da fotobiont fotosintetizira i mikobionta opskrbljuje potrebnim ugljikohidratima koji su produkti tog procesa. Mikobiont, s druge strane, opskrbljuje fotobionta potrebnom vodom i mineralnim tvarima koje crpi iz zemlje ili atmosfere, a osim toga i štiti fotobionta od previsokog intenziteta svjetlosti. Neobična zajednica, upravo zbog simbiotskog odnosa, može se naći u svim terestričkim područjima, od tropskih do polarnih regija (Nash, 2008). Mogu se naći na područjima visokih i jako niskih temperatura, jako izraženog saliniteta, poplavljenim ili ekstremno suhim tlima, tlima siromašnim mineralnim tvarima pa i na područjima onečišćenog zraka. Ipak, većina je lišajeva osjetljiva na promjene okoliša u kojem žive i koji je karakterističan za njihovu vrstu (Paoli i sur, 2014)

Lišajevi se nazivaju i “pioniri vegetacije” zbog njihove velike tolerancije na stres što ih ujedno i odvaja od ostalih eukariotskih organizama. Većina lišajeva su spororastući i dugoživući organizmi pa bismo mogli reći da tijekom dužih razdoblja zadržavaju prilično nepromijenjenu morfologiju (Nash, 2008), a samo rijetki među njima, oni koji žive u ekstremnim uvjetima, koriste kratka povoljna razdoblja za brzi rast. Lišajevi nemaju mogućnost periodički odbacivati svoje dijelove kao što biljke odbacuju lišće. Tradicionalno su podijeljeni u tri glavne skupine: korasti, listasti i grmasti tj. fruktozni lišajevi. Građeni su iz 4 sloja (Slika 1). Prvi sloj naziva se plektenhim, a čini ga sloj gusto isprepletenih hifa gljiva. Hife ulaze u drugi, gendijalni sloj u kojem se nalaze alge pa iz tog sloja crpe ugljikohidrate koji su ondje nastali procesom fotosinteze. Srž lišaja čini mreža hifa gljiva te u njoj dolazi do izmjene plinova. Zadnji sloj građen je

slično kao i prvi, od hifa gljiva, a sadrži i rizoide kojima se lišaj pričvršćuje za podlogu (Nash, 2008).



Slika 1 Prikaz slojevitosti anatomske građe lišajeva. Preuzeto i prilagođeno prema: https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1094/2016/11/03154447/OSC_Microbio_05_05_lichenstr.jpg

1.2. Lišajevi - bioindikatori zagađenja

Svjedoci smo sve većeg onečišćenja zraka koji je posljedica urbanizacije, industrijalizacije, pojačanog prometa motornim vozilima kao samog povećanja broja ljudi na Zemlji. Također, zbog nastanaka urbanih središta sve je manje zelenih površina na Zemlji te tako problemi onečišćenja zraka postaju globalni ekološki problemi, problemi svih nas. Zimi zbog slabije cirkulacije zraka, onečišćeni se zrak zadržava bliže površini Zemlje te tada problem onečišćenog zraka postaje još jasniji. U onečišćenom zraku nalazi se velika količina teških metala. To su elementi gustoće veće od 4 g/cm^3. Neesencijalni teški metali toksični su ili otrovni u vrlo niskim koncentracijama. Također, tu su i razni štetni sumporni i dušikovi spojevi, najčešće u obliku oksida nastali kao posljedica izgaranja fosilnih goriva.

Poznato je da su kisele kiše načinile mnoge štete kulturnoj baštini kao i živim organizmima na Zemlji. Za nastajanje kiselih kiša odgovoran je sumporov dioksid (SO_2)

koji u vlažnoj atmosferi oksidira te nastale kiseline snižavaju pH vrijednost kiša koje potom padaju na tlo. U prošlosti sumporov dioksid bio je glavni onečišćivač zraka koji je utjecao štetno na fiziologiju lišajeva kao i na prisutnost lišajeva na nekom području. U poslijednjem desetljeću značajno je pao štetan utjecaj sumporova dioksida na lišajeve i njegovo mjesto, kao glavnog globalnog onečišćivača, koji štetno djeluje i na lišajeve, preuzimaju spojevi s dušikom (Munzi i sur, 2009). Dušik je element neophodno potreban za život jer sudjeluje u formiranju proteina i nukleinskih kiselina te molekula klorofila kao i enzima koji sudjeluju u procesu fotosinteze. Njegova ograničena količina utječe na rast i produktivnost obaju organizama koji čine lišaj, ali i na ekosustav u cijelosti (Nash, 2008). Atmosferski dušik (N_2) u tom obliku ne ulazi u sastav Zemljine kore te ga stijene ne ulažu u svoju strukturu tijekom formiranja kao što to rade s mnogim drugim elementima. Također, u toj formi ga ni većina organizama ne može iskoristiti. Nitrati (NO_3^-), amonijak (NH_3) ili amonijevi ioni (NH_4^+) su anorganske forme dušika koje većina organizama univerzalno koristi. Dušik se u određenom okolišu može pojavljivati u pretjeranim količinama npr. u mjestima gdje se povećana količina amonijaka nakuplja zbog odlaganja gnojiva ili u gradovima gdje je zbog tvorničke proizvodnje i motornih vozila, tj. sagorijevanja fosilnih goriva, povećana količina svih ispušnih plinova (CO, SO_2, NO_X) (Nash, 2008). Ponekad biljke zbog povećane koncentracije dušika u tlu povećavaju i njegovu koncentraciju u listu što rezultira povećanjem stope fotosinteze jer ga one ugrađuju u ugljikov kostur klorofila čime se povećava koncentracija klorofila (Ripullone i sur, 2003).

Lišajevi u svojoj građi nemaju voštanu kutikulu te cijelom površinom svoga talusa apsorbiraju tvari iz okoline pa tako i onečišćivače iz zraka. U takvim uvjetima količina apsorbiranih i akumuliranih tvari često premašuje njihove fiziološke potrebe za tim tvarima te to može izazvati stres organizma. U lišajeva koji imaju algu za fotobionta, količina pohranjenog dušika ovisi o koncentraciji tih formi u zraku. Lišajevi koji za fotobionta imaju cijanobakteriju mogu apsorbirati i i dušik u obliku N_2. Rezultat toga je da lišaji koji za fotobiont imaju cijanobakterije mogu imati veću koncentraciju dušika pohranjenu u svom talusu (2,2-4,7%), a oni koji za fotobionta imaju algu mogu imati manju količinu pohranjenog dušika u talusu (0,4-0,85%) (Nash, 2008). Međutim, mnoge vrste lišajeva osobito acidofilne vrste osjetljive su na povećanu količinu dušika pa nestaju iz takvog okoliša. Tako je u Sjevernoj Americi došlo do značajnog smanjivanja osjetljivih vrsta lišajeva u blizini gradova i poljoprivrednih površina gdje su zabilježene i povećane količine dušika (Oliver, 2011). Na primjer vrste *Hypogymnia physodes*, *Lecanora conizaeoides* i *Parmeliopsis ambigua* osobito su osjetljive na amonijak otopljen u kiši i magli dok su vrste *Evernia prunasri*, *Parmelia saxatilis*,

Lepraria incana, *Hypogymnia physodes*, te vrste iz rodova *Claonia* i *Usnea* osjetljive na dušikove okside u zraku.

Navedene karakteristike čine lišajeve dobrim bioindikatorima zagađenja zraka (Conti i Cecchetti, 2000). Raznolikost lišajeva na nekom području kao i promjene fizioloških parametara daju nam uvid u količinu okolišnog stresa koji nastaje u urbanim područjima. Učinak štetnih tvari iz onečišćenog zraka, pa tako i spojeva s dušikom, na lišajeve uvelike ovisi i o parametrima poput temperature, vlage i osvjetljenja kojima su lišajevi izloženi. Poznato je da jako osvjetljenje može imati štetan utjecaj na fotosintezu lišajeva (Demmig-Adams i Adams, 1996) u takvim okolnostima. Upravo je smanjena učinkovitost fotosinteze jedan od pokazatelja jačine stresa u lišajeva. Također, pokazatelji štetnog učinka onečišćenog zraka mogu biti pojačana produkcija etilena, gubitak elektrolita zbog oštećenja staničnih membrani, smanjenje sadržaja ATP-a i fiksacije N_2, respiracije, a dolazi i do povećane degradacije klorofila (Garty i sur, 2003). Upravo koristeći se svim navedenim karakteristikama lišajeva možemo zaključiti da oni tako postaju vrlo efikasna, ali i jeftina sredstva za određivanje stupnja onečišćenja zraka.

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

Evernia prunastri (L.) Ach, iz porodice Parmeliaceae, fruktozni je lišaj. Talus ove vrste dihotomski je razgranjen na manje ili više ogranaka (Slika 2), a može biti širine između 0,5 i 3 mm. Ako je lišaj zdrav njegova gornja površina je zelenkasto-sive boje do blijedo zeleno-žute. Donja površina talusa lišaja bojom se ne razlikuje puno od gornje ili je za nijansu svjetlija. U slučaju da lišaj obolio ili je oštećen boja mu postaje sivkasta i slabijeg je intenziteta. *Evernia prunastri* raste na kori listopadnog drveća, najčešće hrasta, pa s toga ne čudi da je vrsta široko rasprostranjena na području Slavonije. Voli vlažna, osunčana i vjetrovita područja nižih nadmorskih visina, a samo rijetko nastanjuje područja do 1675 m nadmorske visine (Nash, 2001). Vrsta *Evernia prunastri* spada u acidofilnu vrstu lišajeva te je stoga osjetljiva na prisutnost dušikovih spojeva osobito amonijaka u zraku (Munzi i sur, 2010) kao i na prisutnost teških metala. Često se koristi u istraživanjima jer je laka za sakupljanje, transport i pripremanje za analizu (Paoli i sur, 2014).

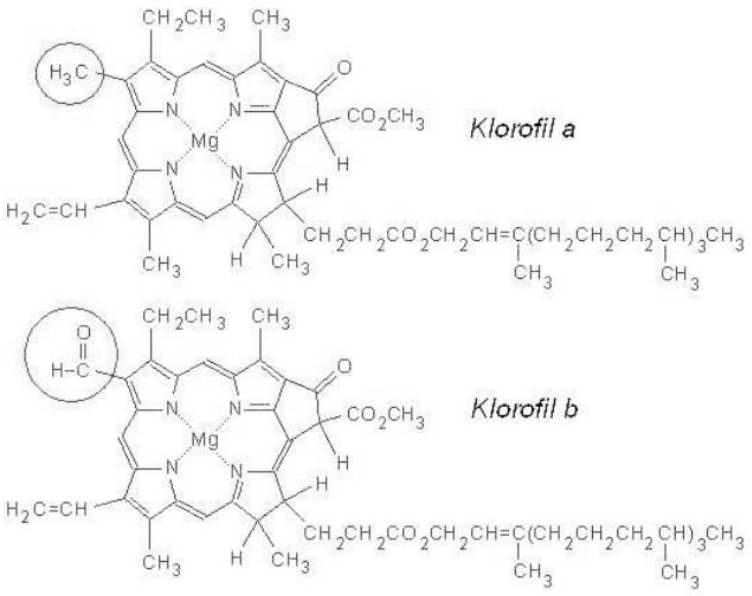


Slika 2 Vrsta *Evernia prusastri* (L) Ach, preuzeto i prilagođeno prema: https://i0.wp.com/www.herbal-supplement-resource.com/wp-content/uploads/2014/01/oakmoss_evernia_prunastri_img-e1474355017756.jpg?ssl=1

1.4. Fotosinteza

Fotosinteza je proces u kojem se pomoću sunčeve energije i vode ugljikov (IV) oksid iz zraka ugrađuje u organske spojeve uz oslobađanje kisika. To je proces u kojem se sunčeva energija pretvara u kemijsku energiju pohranjenu u kemijskim vezama organskih molekula. Svjetlost je elektromagnetsko zračenje vidljivo ljudskom oku. Naime, to je fizikalna pojava širenja magnetskih i električnih valova odnosno fotona. Povećanjem intenziteta svjetlosti linearno se povećava i učinkovitost fotosinteze sve dok u jednom trenutku daljnji dotok energije u obliku fotona više ne utječe na stopu fotosinteze ili na nju djeluje čak i negativno. Svi fotosintetski organizmi moraju imati fotosintetske pigmente. Fotosintetski pigmenti smješteni su u grana i stroma tilakoidnim membranama koje odvajaju prostor tilakoida od ostatka kloroplasta tj. njegove strome. U tilakoidnim membranama nalaze se klorofil *a* i klorofil *b* i karotenoidi. U lišajevi koji za fotobionta imaju cijanobakteriju u tilakoidnim membranama se kao pomoćni pigmenti nalaze fikobilini i fikoeritrini. Molekula klorofila izgrađena je od četiri pirolova prstena povezana u porfirinski prsten (Slika 3). Dijelovi konjugiranih dvostrukih veza odgovorni su za apsorpciju vidljive svjetlosti. U tvorbi dvostrukih veza sudjeluju i elektroni koji se apsorpcijom svjetlosti lako pobuđuju. U centru porfirinskog prstena nalazi se dvovalentni atom magnezija povezan s dušikovim atomima pirolovih prstena. Porfirinski prsten nosi različite funkcionalne skupine kao što je vinilna na prvom pirolovom prstenu, metilna skupina na drugom kod klorofila *a,*

dok se u slučaju klorofila *b* na tom mjestu nalazi aldehidna skupina. Na porfirinskom prstenu nalazimo još metilne i etilnu skupinu. Na pirolov prsten vezan je i alkohol fitol koji znatno pridonosi lipofilnim svojstvima molekule klorofila. Ako molekuli klorofila ne dostaje atom magnezija onda ga nazivamo feofitin. Klorofil *a* apsorbira svjetlost valnih duljina 430 nm i 663 nm, a klorofil *b* 453 nm i 642 nm. Klorofil *a* osobito je značajan jer njemu pripada središnja uloga u fotosintezi. Klorofil *b* je pomoćni pigment jer on prenosi vlastitu pobudu na klorofil *a* čime se povećava raspon valnih duljina svjetlosti dostupnih za fotosintezu (Dubravec i Regula, 1995). Karotenoidi su po građi terpeni. Lipofilni su spojevi koji se sastoje od izoprenskih jedinica s jednim ili dva ionska prstena. Apsorbiraju svjetlost valnih duljina od 380 nm do 550 nm te također proširuju spektar svjetlosne energije koja može sudjelovati u fotosintezi. Budući da pigmenti apsorbiraju velike količine energije, može doći do oštećenja fotosintetske membrane. Ako pobuđeno stanje klorofila potraje dulje dolazi do reakcije s molekulskim kisikom, pri čemu nastaje singletni kisik koji je vrlo reaktivan i može oštetiti stanične sastojke, pogotovo lipide. Karotenoidi gase pobuđeno stanje klorofila i na taj način djeluju zaštitnički (Pevalek- Kozlina, 2003).



Slika 3 Prikaz klorofila *a* i klorofila *b,* preuzeto sa https://istiqomahrrr.wordpress.com/2013/06/12/pigmen-klorofil/

U uvjetima pojačanog intenziteta svjetlosti, ali i nekim drugim stresnim uvjetima kao što je onečišćenje zraka kako bi se izbjegla fotoinhibicija do koje u tim uvjetima dolazi, mijenja se omjer pigmenata tj. smanjuje se udio klorofila, a povećava udio karotenoida (Walters, 2005). Demming- Adams i Adams (1996, prema Franck i sur,

2007) ustanovili su da se fotosintetski organizmi mogu zaštiti od prejakog svjetla smanjujući ukupnu količinu klorofila (Chl_{a+b}), a povećavajući udio karotenoida. U stresnim uvjetima također često dolazi do degradacije molekula klorofila i nastaje feofitin. Kao što je već rečeno, feofitin ima istu strukturu kao klorofil samo što u središtu porfirinskog prstena više nema Mg^{2+} ion. Lišajevima, kao i biljkama, daje smećkastu boju. U istraživanjima na lišajevima degradacija klorofila često se izražava kao kvocijent feofitinizacije (FC) odnosno kao omjer klorofila *a* i feofitina te se koristi kao pokazatelj stresnog učinka na fotobiont u lišaju (Bačkor i Loopi, 2009).

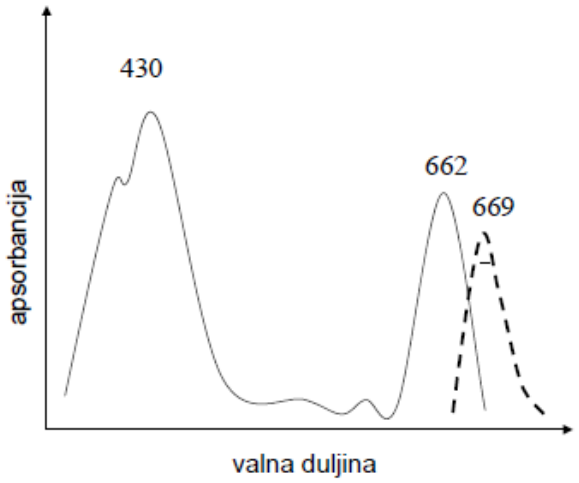
U procesu fotosinteze, razlikujemo svjetlosne reakcije fotosinteze (primarne) i one biokemijske odnosno reakcije Calvinovog ciklusa (sekundarne). U svjetlosnim reakcijama se oksidacijom vode proizvodi kisik koji je nužan za proces oksidacijskog disanja svih aerobnih organizama te nastaju molekule ATP-a i NADPH. One se dalje koriste pri procesu sinteze ugljikohidrata u reakcijama Calvinovog ciklusa.

Za procese svjetlosnih reakcija potrebni su fotosistem I (PS I) i fotosistem II (PSII). Svaki od tih fotosistema ima svoje antenske dijelove što su zapravo pigmenti, ili takozvani kolektori koji apsorbiraju fotone svjetlosti (Dubravec i Regula, 1995). U tom trenutku dolazi do pobude (ekscitacije) molekula pigmenata, tj. njihovi elektroni prelaze u više energetsko stanje. Oni rezonancijskim putem prenose energiju s jedne na drugu susjednu molekulu pigmenta do reakcijskog središta. U reakcijskom središtu PS I nalazi se specifična molekula klorofila *a* tj. P_{700} koja ima maksimum apsorpcije pri 700 nm. U tako pobuđenom stanju P_{700} je jako redukcijsko sredstvo i dva elektrona se izbijaju, a prima ih feredoksin vezan za tilakoidnu membranu. Konačan akceptor tih elektrona je NADP+ koji se reducira u NADPH + H^+. Protoni (H^+) koji su potrebni za tu reakciju dobivaju se iz medija. Preostali P^+_{700} elektrone nadoknađuje iz PS II. PS II u svom reakcijskom središtu ima poseban klorofil *a* tj. P_{680} koji ima maksimum apsorpcije pri 680 nm. Kolektori PS II apsorbiraju fotone svjetlosti te također uzrokuju pobuđivanje P_{680} nakon čega on izbacuje svoje elektrone. Elektroni putuju preko plastokinona, citokroma i plastocijanina na oksidirani P^+_{700} koji se reducira. Oksidirani P^+_{680} pak nadoknađuje svoj gubitak elektrona fotolizom vode. Fotoliza vode proces je u kojem dolazi do razgradnje vode pomoću svjetlosti na elementarni kisik i vodikove ione. Cijeli proces prati ulaženje H^+ iona u lumen tilakoidne membrane. Difuzijom H+ iona iz tilakoidnog prostora u stromu preko enzima ATP- sintetaze dolazi do oslobađanja kemijske energije i pohranjivanje u molekulama ATP-a tako da u primarnim reakcijama fotosinteze nastaje NADPH, ATP i O_2 (Pevalek- Kozlina, 2003).

Produkti primarnih reakcija kao NADPH i ATP su tvari koje povezuju primarne i sekundarne procese, jer nastaju u primarnim, a koriste se u sekundarnim procesima za redukciju CO_2. Reakcije se nazivaju Calvinovim ciklusom i odvijaju se u stromi kloroplasta (Dubravec i Regula, 1995). Reakcije su podijeljene u 3 stupnja. U prvom kao akceptor CO_2 služi ribuloza- 1,5- bisfosfat. Taj proces katalizira enzim Rubisco. Na taj način nastaju dvije molekule stabilnog intermedijera 3- fosfoglicerata. Drugi stupanj uključuje korištenje ATP-a i NADPH iz svjetlosnih reakcija za dobivanje gliceraldehid 3- fosfata. Treći stupanj je ponovno regeneracija ribuloza- 1,5- bisfosfata (Pevalek-Kozlina, 2003).

Važno je napomenuti da lišaj mora biti dobro hidratiziran kako bi se proces odvijao budući dališajevi apsorbiraju vodu cijelom svojom površinom i vodni potencijal uvelike utječe na njihov metabolizam. Naime, kada je lišaj dehidriran postaje dormantan i ne odvija se proces izmjene ugljikova dioksida pa se ne odvija ni proces foto6sinteze. Lišaj *Evernia prunastri* koji živi pričvršćen na stablu i ima razgranati talus koji je slobodan u zraku vrlo brzo gubi vodu. K tome nema niti zaštitni sloj koji smanjuje gubitak vode u lišajeva. Deblji zaštitni sloj koji sprječava gubitak vode imaju foliozni lišajevi (Nash, 2008).

U optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze, međutim dio se energije gubi u obliku topline i svjetlosti, pri čemu nastaje fenomen koji nazivamo fluorescencija klorofila (Vidaković- Cifrek i sur, 2014). Fluorescencija je pojava do koje dolazi kad elektroni pri povratku iz stanja više energije u osnovno stanje otpuštaju foton. Fluorescencijska svjetlost uvijek ima veću valnu duljinu i manju energiju nego svjetlost koja ju je izazvala (Pevalek- Kozlina, 2003) (Slika 4). Tri spomenuta načina utroška apsorbirane energije su u međusobnoj kompeticiji što znači da povećanje učinkovitosti jednog od njih dovodi do smanjenja druga dva (Vidaković- Cifrek i sur, 2014)

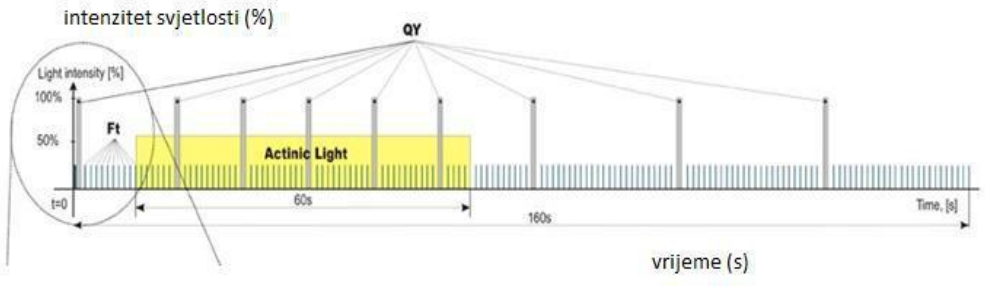


Slika 4 Apsorpcijski spektar klorofila *a* i spektar svjetlosti oslobođene fluorescencijom (preuzeto iz Vidaković- Cifrek i sur, 2014)

Iz razloga koji još nisu u potpunosti objašnjeni, glavnina fluorescencije potječe iz fotosistema II pa se s toga izmjerena fluorescencija smatra odrazom stanja fotosistema II. Pri niskom intenzitetu svjetlosti molekule plastokinona su oksidirane i kao takve mogu primiti elektrone. U takvim se uvjetima ekscitacijska energija s velikom učinkovitošću troši za fotokemijske reakcije, a intenzitet fluorescencije je vrlo nizak. Međutim, pri jakom intenzitetu osvjetljenja ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija zbog malog udjela oksidiranih plastokinona koji bi mogli primiti elektrone s PSII pa se u takvim uvjetima veći dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa u obliku fluorescencije (Vidaković- Cifrek i sur, 2014). Različiti stresni čimbenici smanjuju učinkovitost fotokemijskih reakcija čime se povećava prinos fluorescencije te se stoga fluorescencija klorofila često koristi kao pokazatelj učinkovitosti fotosinteze u istraživanjima štetnih učinaka na biljke (Vidaković- Cifrek i sur, 2014), ali u zadnje vrijeme i na lišajeve (Maslać i sur, 2016). Na stopu fluorescencije u lišajeva utječu i dušikovi spojevi u onečišćenom zraku jer ometaju stopu prijenosa energije rezonantnim putem (Paoli i sur, 2010). Primjerice, niske koncentracije amonijeva nitrata i amonijeva sulfata su u početku tretmana slabo utjecale na fotosintetsku učinkovitost lišaja *Evernia prunastri*, ali nakon određenog vremena oba su tretmana jasno pokazala inhibirajući utjecaj na fotosintetsku učinkovitost (Munzi i sur, 2010).

Fluorescencija klorofila *a in vivo* se uspješno mjeri fluorimetrom. Jedna od metoda mjerenja jest metoda saturacijskog pulsa (Maxwell i Johnson, 2000). Prije mjerenja potrebno je uzorke ostaviti u tami kako bi se sve molekule plastokinona oksidirale. Mjerenje započinje mjerenjem minimalne razine fluorescencije kada su

fotosintetski organizmi prilagođeni na tamu (F_0). Biljni materijal obasja se crvenom svjetlošću niskog intenziteta koja nije dovoljna za pokretanje fotokemijske reakcije. Potom se obasjava kratkim saturacijskim pulsom, tj. kratkotrajnom svjetlošću jakog intenziteta koja uzrokuje redukciju svih akceptora elektrona s reducirajuće strane PSII i bilježi se maksimalna fluorescencija fotosustava II nakon adaptacije u mraku (F_m). Potom se u trajanju od nekoliko desetaka do nekoliko stotina sekundi uzorak izlaže bijelom svjetlu, tj. aktiničkom zračenju koje je dovoljne jakosti da može pokrenuti i podržati proces fotosinteze, kako bismo izazvali pad intenziteta fluorescencije do ujednačene vrijednosti (F_T) (Slika 5). Na posljetku, uzorak se osvjetljava i saturacijskim pulsevima i biva zabilježena vrijednost maksimuma fluorescencije u uvjetima svjetla tj. (F'_m). Poslije svega uzorak se izlaže fazi oporavka pomoću saturacijskih pulseva u tami. Mjerenje završava očitanjem F'_0 vrijednosti tj. minimalne vrijednost fluorescencije pri crvenom osvjetljenju u uvjetima svjetla. Nakon mjerenja se fluorimetar sinhronizira s programom na računalu i podaci se obrađuju. Jednak postupak može se primijeniti i na lišajevima. Fluorescencija klorofila *a* često se mjeri na lišajevima kao pokazatelj fiziološkog stanja fotobionta lišaja (Paoli i sur, 2015). Pri svom mjerenju koristila sam se FluorPen fluorimetrom i pripadajućim uputstvima (FluorPen Manual and User Guide, 2015). Koristila sam opciju NPQ protokol s obzirom na to da sam željela pratiti maksimalni kvantni prinos fotosustava II u mraku (QYmax), efektivni kvantni prinos fotosustava II na svjetlu (QY), fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) te nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ). NPQ protokol zapravo je metoda saturacijskog pulsa. Određeni parametri daju se izračunati iz formula navedenih u protokolu, a navest ću ih u poglavlju Materijali i Metode.



Slika 5 Prikaz postupka mjerenja parametara fluorescencije klorofila pomoću uređaja FluorPen. Intenzitet svjetlosti označen je na y osi, a vremenski interval u kojem se mjerenje odvija na x osi grafa. Preuzeto i prilagođeno prema FluorPen Manual and User Guide, 2015

1.5. Ciljevi istraživanja

Budući da su lišajevi izvrsni indikatori zagađenja u okolišu, cilj ovog istraživanja je utvrditi kako *Evernia prunastri* (L.) Ach reagira na stres uzrokovan dušikom u obliku nitrata i amonijevih iona praćenjem učinkovitosti fotosinteze i mjerenjem količine pigmenata nakon 3, 7 i 14 dana od tretmana. Također, cilj je provjeriti hoće li učinak istih na lišaj biti jednak ili različit na jačoj i slabijoj količini osvjetljenja ako se drugi parametri, kao vlaga i temperatura, održavaju stalnima.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Istraživani materijal

Istraživanje sam provodila na vrsti lišaja *Evernia prunastri* (L.) Ach. Materijal je sakupljen u napuštenom voćnjaku u blizini Požege na terenu nepoznatog onečišćenja. U laboratorij su dopremljeni u kartonskim kutijama kako bi se održala što veća vlažnost. Budući da ih nije bilo lako odvojiti od kore drveća bez većeg oštećivanja na terenu, u laboratorij su dopremljeni na granama drveća. Prvi korak bio je odvojiti uzorke od kore drveća. Nakon toga bilo je potrebno očistiti materijal od mahovine ili drugih vrsta lišajeva. Za uzorke sam odabrala naizgled najzdravije primjerke trudeći se da masa i, u koliko je to moguće, oblik talusa svih uzoraka budu podjednaki. Pazila sam da svi uzorci imaju vršni dio talusa, otprilike 1-2 cm udaljenosti od ruba. Time sam osigurala da svi uzorci budu podjednako metabolički aktivni. Koristeći se mrežicom, gumicama i Petrijevim zdjelicama pripremila sam 48 improviziranih postolja za uzorke (Slika 6). Na taj način smješteni lišajevi, koje prskamo vodom kako bismo ih vlažili, apsorbiraju količinu vode koja im je potrebna, a višak vode prolazi kroz mrežicu na dno Petrijeve zdjelice. Voda s dna polagano isparava i lišajevi na mrežicama imaju na raspolaganju potrebu vlagu dulje vrijeme. Nakon što sam uzorke smjestila na Petrijeve zdjelice poprskala sam lišajeve destiliranom vodom. Uzorci su potom aklimatizirani 10 dana u klima- komori u uvjetima 16 h svjetla (60 μmol fotona m^{-2} s^{-1}) i 8 h tame uz temperaturu 22 ± 2 °C. Tijekom aklimatizacije lišajeve sam prskala destiliranom vodom jednom dnevno dok ne postanu meki na dodir kako bi imali dovoljno vlage za normalan rast.

2.2. Kemikalije

Za istraživanje je bilo potrebno pripremiti 1 M otopinu kalijeva nitrata KNO_3, 1 M otopinu amonijeva nitrata NH_4NO_3 te 0,5 M otopinu amonijeva sulfata $(NH_4)_2SO_4$. Za pripremu otopine KNO_3 volumena 0,5 L zadane koncentracije bilo je potrebno vagnuti 50,5 g krutog KNO_3. Za pripremu istog volumena otopine NH_4NO_3 zadane koncentracije bilo je potrebno vagnuti 40,0 g krute tvari, a za pripremu 0,5 M otopine $(NH_4)_2SO_4$ jednakog volumena potrebno je vagnuti 33,0 g krutog $(NH_4)_2SO_4$. Izvagane mase tvari otopila sam u 0,4 L destilirane vode te nakon potpunog otapanja nadopunila destiliranom vodom do željenih volumena. Kako bih pospješila otapanje krutih tvari u proces sam uključila i magnetnu miješalicu. Nakon pripreme otopinama sam pomoću pH- metra podesili pH vrijednost na 6,5. Pri tom procesu koristila sam otopine HCl i

NaOH. Jednako sam učinila i s destiliranom vodom koju sam koristila za prskanje lišajeva.

2.3. Tretiranje kemikalijama

Uzorke sam podijelila u 4 skupine sa po 12 uzoraka u svakoj (Tablica 1). Svaku sam od pripremljenih otopina razlila u 12 čašica pazeći da u svakoj bude podjednak volumen otopine. Uronivši prvih 12 uzoraka u 12 čašica s 1 M otopinom KNO_3 započela sam mjerenje od 30 min koji su planirani za izlaganje lišaja kemikalijama. Bitno je paziti da se svi uzorci u otopinu urone približno istovremeno. Ponovila sam postupak uranjanja 12 slijedećih uzoraka u 12 čašica s 1 M otopinom NH_4NO_3 mjereći isto vrijeme. U 12 čašica s 0,5 M otopinom $(NH_4)_2SO_4$ uronila sam također 12 uzoraka na 30 min. Posljednjih 12 uzoraka služili su kao kontrola i oni su bili uronjeni na 30 min u destiliranu vodu određene pH vrijednosti (Slika 6). Nakon tretmana iz svake sam skupine tretiranih lišajeva odvojila 6 uzoraka koje sam izložila jačem osvjetljenju (100 μmol fotona m^{-2} s^{-1}), a 6 uzoraka izložila sam slabijem osvjetljenju (40 μmol fotona m^{-2} s^{-1}). U klima- komori temperatura je bila 20 ± 2 °C. Tijekom daljnjeg pokusa lišaje sam jednom na dan prskala destiliranom vodom pH vrijednosti 6,5.

Tablica 1 Opis tretmana. Uzorci su bili podijeljeni u 4 skupine. Jedna skupina bila je kontrolna, druga skupina tretirana je kalijevim nitratom, treća skupina amonijevim nitratom i posljednja skupina amonijevim sulfatom. Sve otopine bile su zadanih koncentracija i pH vrijednost im je bila 6,5. Tretman je trajao 30 min. Potom je jednak broj uzoraka (6 replika) od svakog tretmana i kontrole izložen jačem osvjetljenju i slabijem osvjetljenju.

TRETMAN	**1.**	**2.**	**3.**	**4.**	**5.**	**6.**	**7.**	**8.**
medij	H_2O	H_2O	KNO_3	KNO_3	NH_4NO_3	NH_4NO_3	$(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2SO_4$
***c* (moldm^{-3})**	1	1	1	1	1	1	0,5	0,5
***t* (min)**	30	30	30	30	30	30	30	30
pH	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
jačina osvjetljenja (μmol fotona m^{-2} s^{-1})	100	40	100	40	100	40	100	40

Mjerenja fluorescencije klorofila *a in vivo* provela sam 3., 7. i 14. dana od početka pokusa te sam izračunala pripadajuće fluorescencijske parametre. Istih dana izvršila sam i uzorkovanje lišajeva. Uzorkovala sam lišajeve tako što sam od svakog uzorka odrezala komadić talusa lišaja, približno jednakih veličina, koje sam zatim spremila u ranije pripremljene i označene paketiće. Paketiće uzorkovanih lišajeva osušila sam u liofilizatoru. Nakon toga uzorci tretiranih lišajeva bili su spremni za daljnju obradu i korištenje pri određivanju fotosintetskih pigmenata. Budući da je tretman dušikovim spojevima djelovao jako negativno na lišajeve, što se vidjelo u promjeni boje lišaja iz zelene u smeđu, izvršila sam dodatno mjerenje fluorescencije korofila *a* i 21. dan nakon početka pokusa kako bih provjerila dolazi li do oporavka.



Slika 6 Uzorci lišaja *Evernia prunastri* za vrijeme tretmana kemikalijama. Vidljiv je smještaj lišajeva na mrežice na Petrijevim zdjelicama.

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

Prije mjerenja fluorescencije klorofila *a* u uvjetima *in vivo* uzorke sam poprskala destiliranom vodom određene pH vrijednosti te ih ostavila da odstoje u mraku kako bi se molekule plastokinona oksidirale. Kao što je već rečeno, pri mjerenju sam se koristila uređajem FluorPen fluorimetrom i pripadajućim protokolom. Na talus svakog lišaja stavila sam kvačicu pazeći da što bolje talusom lišaja prekrijem otvor na kvačici kroz koji prolazi svjetlost tijekom mjerenja. Kvačicu sam potom pričvrstila za fluorimetar i odabrala protokol koji omogućuje mjerenje i izračunavanje nefotokemijskog gašenje fluorescencije (NPQ), fotokemijskog gašenje fluorescencije (QP), maksimalni kvantni prinos fotosustava II u mraku (QYmax) te efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY). Nakon što sam sa svim uzorcima postupila isto, FluorPen fluorimetar sam povezala s odgovarajućim programom na računalu na koje sam spremila svoje dobivene podatke. Uređaj FluorPen određuje vrijednosti fluorescencijskih parametara prema formulama (FluorPen Manual and User Guide, 2015 i Vidaković- Cifrek, 2014):

a) MAKSIMALNI KVANTNI PRINOS FOTOSUSTAVA II U MRAKU

$QYmax = F_v/F_m$

$F_v = F_m - F_0$

b) EFEKTIVNI KVANTNI PRINOS FOTOSUSTAVA II

$QY = (F'_m - F_T) / F'_m$

c) FOTOKEMIJSKO GAŠENJE

$QP = (F'_m - F_T) / (F'_m - F'_0)$

d) NEFOTOKEMIJSKO GAŠENJE

$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m$

pri čemu su:
F_m =maksimalni prinos fluorescencije uzorka prilagođenog na uvjete tame
F_0 = minimalni prinos fluorescencije
F_v = varijabilna fluorescencija
F'_m= maksimalna fluorescencija u uvjetima svjetla
F_T= fluorescencija ravnotežnog stanja

2.5. Ekstrakcija i određivanje udjela fotosintetskih pigmenata

Nakon sušenja lišajeva u liofilizatoru tijekom 24 sata, čuvala sam ih spremljene u hladnjaku na +4 °C. Sve sam uzorke najprije usitnila škaricama što je više bilo moguće te sam odvagnula približno 10 mg usitnjenih uzoraka i rasporedila ih u ranije pripremljene smeđe tubice za centrifugiranje. Smeđe tubice trebale bi čuvati pigmente od svjetla koje ih može oštetiti. Uzorcima sam potom dodala 1 mL dimetilsulfoksida (DMSO) tj. jakog organskog otapala i na vrhu spatule $MgCO_3$. Sadržaj tubica najprije sam vorteksirala, a potom inkubirala 30 min u vodenoj kupelji na temperaturi od 60 °C. Nakon inkubacije uzorke sam centrifugirala na temperaturi od 21 °C, 15 minuta, na 25000 g. Po završetku sam ispipetirala 1 mL supernatanta u kojem se nalaze pigmenti u nove, čiste tubice. Te sam uzorke koristila za mjerenje klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida i računanje kvocijenta feofitinizacije (FC). Spektrofotometrijski sam izmjerila apsorbanciju svakog uzorka pri valnim duljinama od 415, 435, 480, 649 i 665 nm i pri tome sam koristila staklene kivete. Koncentraciju fotosintetskih pigmenata odredila sam prema formulama (Kranner i sur, 2002):

a) Maseni udio klorofila *a* u tkivu (mg/g suhe tvari): ca = $\frac{12{,}9 \cdot \mathrm{A665} - 3{,}45 \cdot \mathrm{A649}}{m \cdot 1000}$

b) Maseni udio klorofila *b* u tkivu (mg/g suhe tvari): : cb = $\frac{21{,}99 \cdot \mathrm{A649} - 5{,}32 \cdot \mathrm{A665}}{m \cdot 1000}$

c) Maseni udio ukupnih karotenoida u tkivu (mg/g suhe tvari):

ck = $\frac{(1000 \cdot \mathrm{A480} - 2{,}14 \cdot ca - 70{,}16 \cdot cb)/220}{m \cdot 1000}$

d) Kvocijent feofitinizacije: FC = $\frac{A435}{A415}$

A480/665/649/435/415 = apsorbancije uzoraka pri određenim valnim duljinama

m = masa uzorka

2.6. Statistička obrada

Dobivene rezultate istraživanja sam prikazala u računalnom programu Microsoft office Excel 2007 i Statistica 13.1. Za rezultate svakog od tretmana (po šest replika uzoraka) izrazila sam srednju vrijednost i pripadajuću standardnu pogrešku. Koristeći te podatke načinila sam grafičke prikaze za svaki praćeni parametar toga dana. Postupak je bio isti pri obradi podataka vezanih uz količinu pigmenata kao i za izradu pripadajućih grafičkih prikaza. Provela sam faktorijalnu analizu varijance (two- way ANOVA) kojom sam provjerila koji parametri utječu na promjene zabilježene u uzorcima. Potom sam provela analizu varijance (one-way ANOVA) kako bih detaljnije provjerila kako se uzorci pojedinog tretmana razlikuju od uzoraka kontrolne skupine i međusobno.

3. REZULTATI

3.1. Fluorescencija klorofila *a in vivo*

3.1.1. Maksimalni kvantni prinos fotosistem II (QYmax)

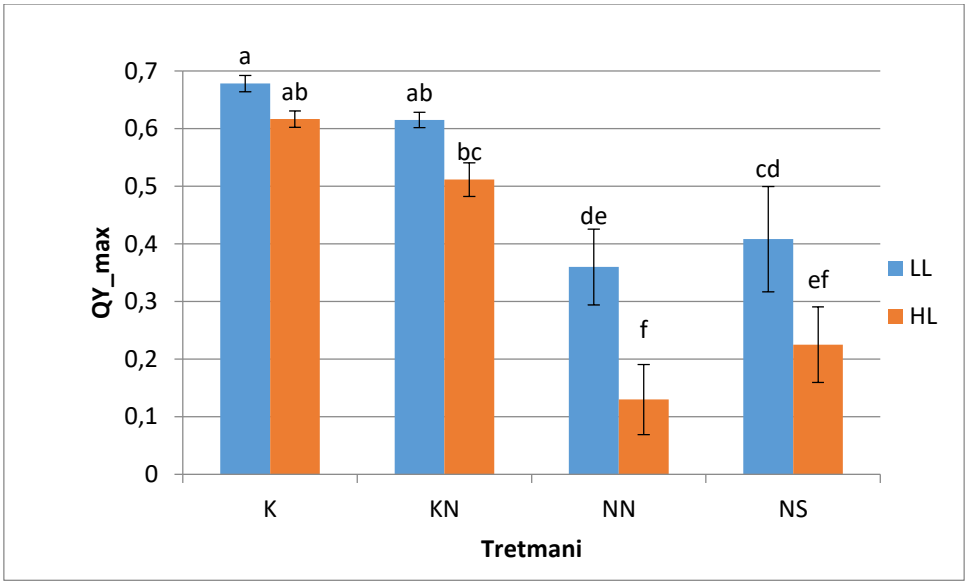
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QYmax, a također je značajan utjecaj imao i intenzitet osvjetljenja kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 2).

Tablica 2 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QYmax s obzirom na različite dušikove spojeve (tretman) kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QYmax ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.250852	1	15.1142	***0.000372***
tretman	1.337573	3	26.8636	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.052123	3	1.0468	0.382397

Dobiveni rezultati za maksimalni kvantni prinos fotosustava II u mraku (QYmax) pokazuju da 3. dan nakon tretmana (Slika 7) sve grupe tretiranih lišajeva, neovisno o intenzitetu svjetla kojem su bile izložene, pokazuju nižu vrijednost QYmax u odnosu na kontrolne skupine. Značajnije smanjenje u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i skupinu tretiranu kalijevim nitratom, pokazale su skupine tretirane amonijevim nitratom ($p<0,001$) i one tretirane amonijevim sulfatom ($p<0,01$).

Također, skupine koje su bile izložene slabijem osvjetljenju pokazuju veće vrijednosti u odnosu na tretirane skupine izložene jačem osvjetljenju. Značajnije više vrijednosti ($p<0,05$) QYmax pokazuju grupe lišajeva koji su tretirani amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom te potom izloženi nižem intenzitetu osvjetljenja u odnosu na one izložene višem. Kontrolne grupe ne pokazuju značajnu razliku ovisno o intenzitetu svjetla.



Slika 7 Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 7. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QYmax, a također je značajan utjecaj imao i intenzitet osvjetljenja kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 3).

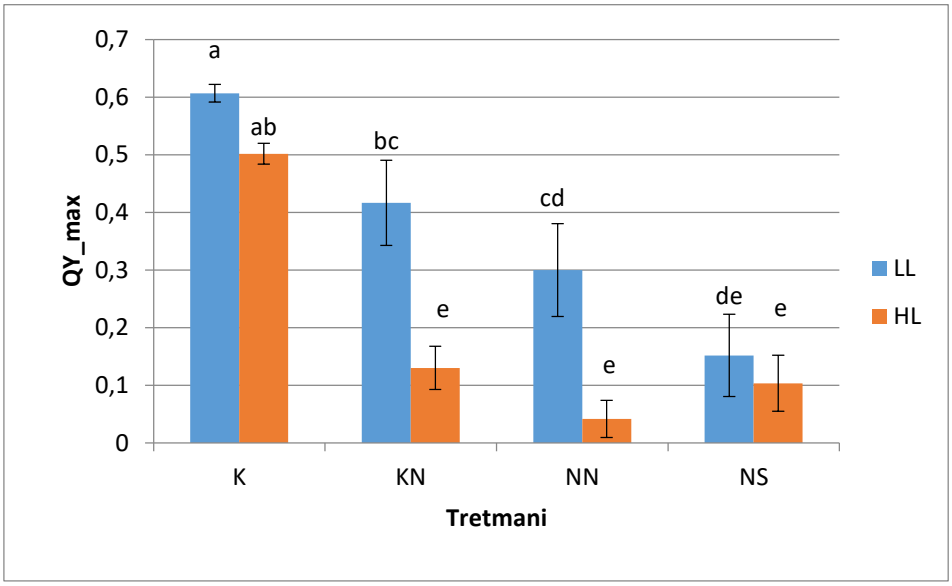
Tablica 3 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QYmax s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QYmax ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.365752	1	21.8083	***0.000034***
tretman	1.324523	3	26.3253	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.121073	3	2.4064	0.081461

Sve skupine tretiranih lišajeva nakon 7 dana tretmana, neovisno o intenzitetu svjetlosti kojem su bile izložene, pokazuju nižu vrijednost QYmax u odnosu na kontrolne skupine (Slika 8) i ta razlika je statistički značajna ($p<0,001$). Uspoređujući skupine tretiranih lišajeva izloženih slabijem intenzitetu osvjetljenja međusobno,

uočava se statistički značajna razlika samo između onih tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom ($p<0,05$) koji je dao najniže vrijednosti. Uspoređujući međusobno grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja ne uočava se statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Također je vidljivo da su vrijednosti QYmax lišajeva koji su bili tretirani kalijevim nitratom i amonijevim nitratom te izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja značajnije smanjene u odnosu na one jednako tretirane, a potom izložene slabijem osvjetljenju ($p<0,05$). Značajnija razlika ne uočava se samo uspoređivanjem grupe lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom i izloženih jačem odnosno slabijem intenzitetu osvjetljenja ($p>0,05$) gdje je kod obje grupe izmjerena znatno niža vrijednost ovog parametra u odnosu na kontrole. Kontrolne grupe ne pokazuju značajnu razliku ovisno o intenzitetu svjetla.



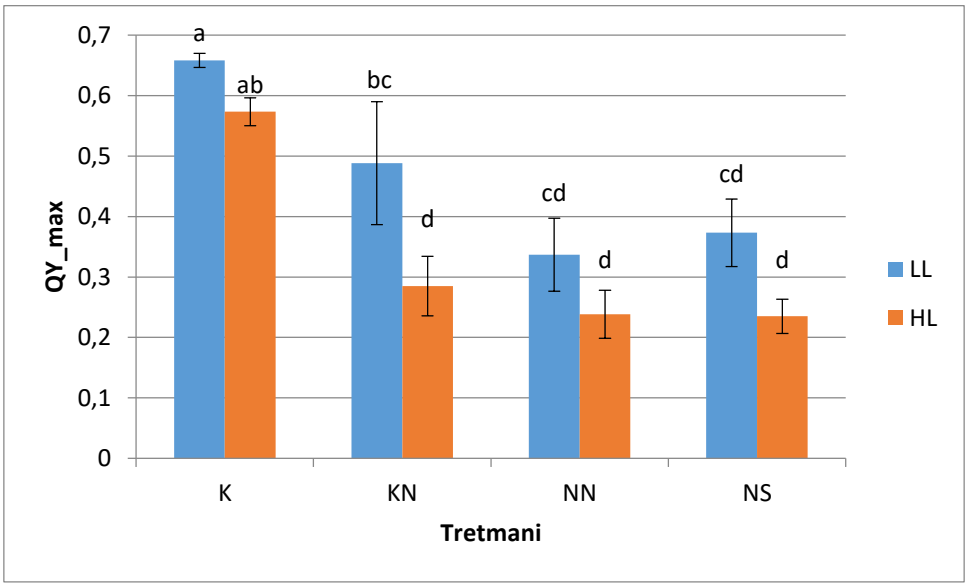
Slika 8 Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 14. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QYmax, a također je značajan utjecaj imao i intenzitet osvjetljenja kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 4).

Tablica 4 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QYmax s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QYmax ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.206719	1	12.1967	***0.001183***
tretman	0.823123	3	16.1885	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.025406	3	0.4997	0.684638

Sve grupe tretiranih lišajeva nakon 14. dana imaju značajno nižu ($p<0,01$) vrijednost QYmax od svojih kontrola (slika 9). Uspoređujući grupe tretiranih lišajeva izloženih nižem intenzitetu svjetla među njima se ne uočava statistički značajna razlika. Jednako je s tretiranim uzorcima koji su izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja.



Slika 9 Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Tretirane grupe izložene jačem intenzitetu svjetlosti pokazale su nižu vrijednost QYmax od onih izloženih slabijem osvjetljenju. Međutim razlika je statistički značajna

(p<0,05) samo kod uzoraka tretiranih kalijevim nitratom. Kontrolne grupe ne pokazuju značajnu razliku ovisno o intenzitetu svjetla.

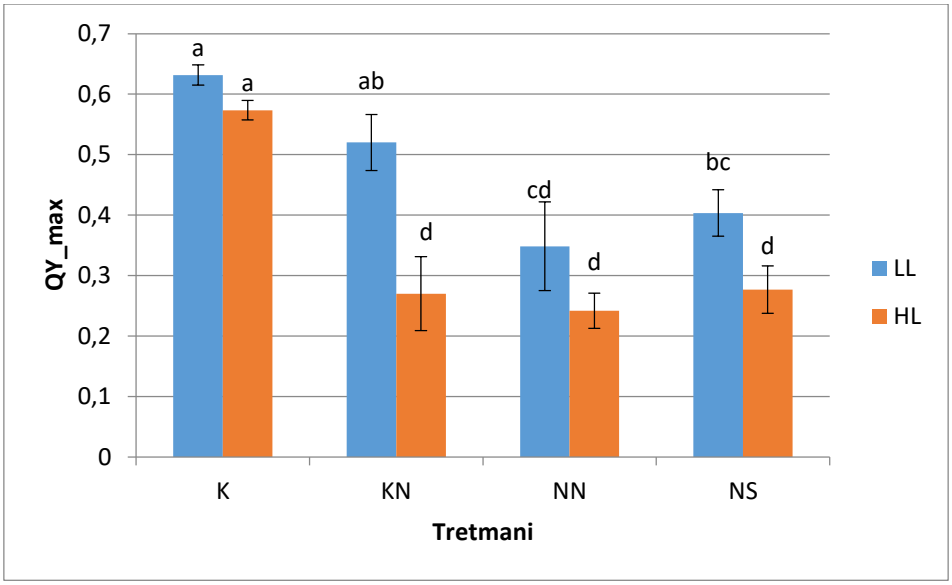
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 21. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QYmax, a također je značajan utjecaj imao i intenzitet osvjetljenja kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 5).

Tablica 5 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QYmax s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 21. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QYmax (p<0,05) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.220052	1	18.7818	***0.000096***
tretman	0.664706	3	18.9112	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.059923	3	1.7048	0.181419

Sve skupine tretiranih lišajeva su 21. dan nakon tretmana, u odnosu na kontrolne skupine, pokazale niže vrijednosti QYmax, a razlike su i statistički značajne (p<0,01) osim kod tretmana kalijevim nitratom pri slabijem intenzitetu svjetla (Slika 10). Uspoređujući grupe lišajeva koji su nakon tretmana izloženi slabijem intenzitetu svjetla uočava se da je amonijev nitrat značajnije smanjio vrijednost QYmax u odnosu na kalijev nitrat. Između grupa lišajeva koji su nakon tretmana izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja nema značajnije razlike.

Između grupa lišajeva koji su tretirani kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom te potom izloženi različitom intenzitetu svjetla uočava se značajno veća vrijednosti (p<0,05) ako su lišajevi bili izloženi slabijem intenzitetu svjetla, a razlike nema ako uspoređujemo grupe lišajeva koje su tretirane amonijevim nitratom te potom izložene različitom intenzitetu svjetla (p>0,05). Kontrolne grupe također ne pokazuju značajnu razliku ovisno o intenzitetu svjetla.



Slika 10 Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 21. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

3.1.2. Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY)

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa samo tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QY, dok intenzitet osvjetnjenja nije imao značajnijeg utjecaja (Tablica 6).

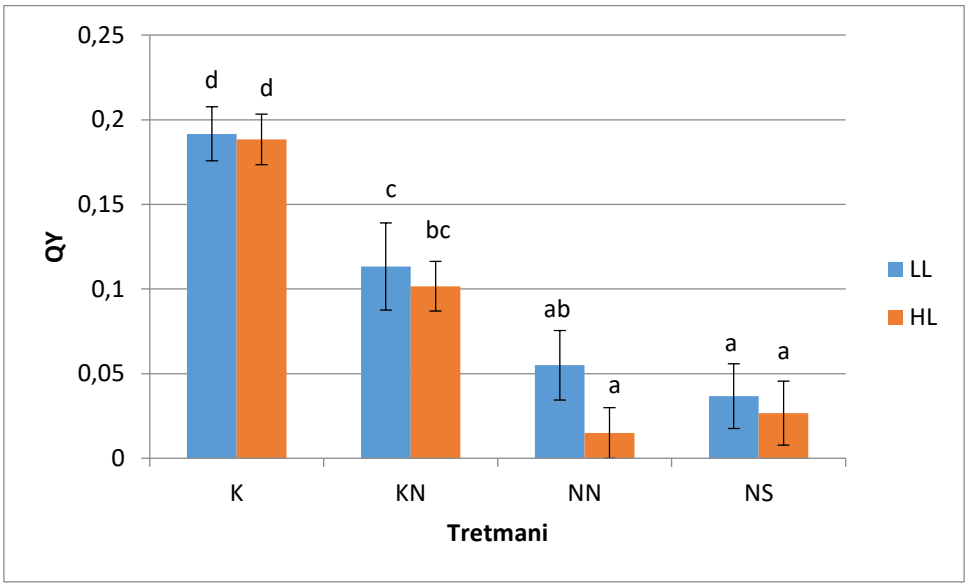
Tablica 6 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QY s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QY ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.003169	1	1.5505	0.220313
tretman	0.200756	3	32.7431	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.002373	3	0.3870	0.762937

Sve grupe tretiranih lišajeva 3. dan nakon tretmana pokazuju izrazito nižu vrijednost QY u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11). Nastala je statistički značajna

razlika (p<0,01), a posebno velika statistički značajna razlika nastala je između grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i njegove kontrole skupine (p<0,001). Uspoređujući rezultate za grupe tretiranih lišajeva koji su potom izloženi slabijem intenzitetu osvjetljenja, uočava se statistički značajna razlika između onih tretiranih kalijevim nitratom gdje su vrijednosti veće i onih tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom (p<0,05). Slično je i s grupama tretiranih lišajeva izloženih jačem intenzitetu osvjetljenja.

Između kontrolnih grupa međusobno te grupa koje su nakon tretmana dušikovim spojevima izložene različitim intenzitetima svjetlosti ne pojavljuje se statistički značajna razlika (p>0,05).



Slika 11 Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate (p<0,05).

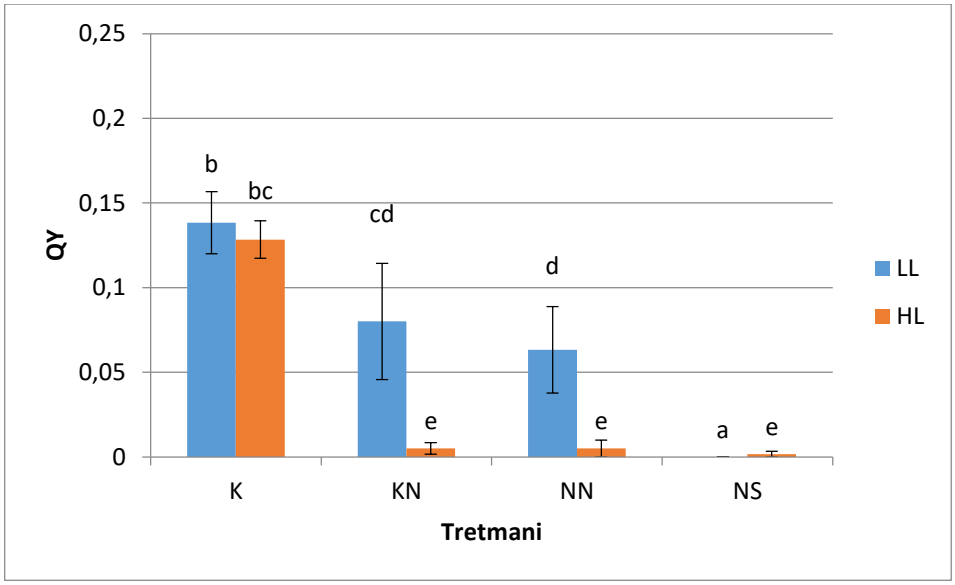
Faktorijalna analiza pokazala je da je 7. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QY, a također značajan utjecaj pokazuje i intenzitet osvjetljenja (Tablica 7).

Tablica 7 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QY s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QY (p<0,05) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.015052	1	8.64028	***0.005439***
tretman	0.115673	3	22.13306	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.012340	3	2.36108	0.085761

Sve grupe tretiranih lišajeva 7. dan nakon tretmana pokazuju izrazito nižu vrijednost QY od kontrolnih skupina (Slika 12). Posebno velika statistički značajna razlika (p<0,001) uočava se uspoređujemo li lišajeve tretirane amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom, koji su potom izloženi slabijem osvjetljenju, s njihovom kontrolnom skupinom i skupinom lišajeva tretiranih kalijevim nitratom koji su izloženi istom intenzitetu svjetlosti. Također, statistički značajna razlika (p<0,001) uočava se uspoređivanjem svih grupa tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti i imaju puno niže vrijednosti odkontrolneskupine. Među grupama lišajeva tretiranih i izloženih jačem intenzitetu svjetla nema statistički značajne razlike (p>0,05).

Također je jači intenzitet svjetlosti utjecao na izrazito veliko sniženje QY vrijednosti koje se uočava u svih tretiranih skupina lišajeva ali ne i u kontrolnoj skupini (p<0,05).



Slika 12 Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 14. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QY kao i intenzitet osvjetljenja, ali i kombinacija tih dvaju faktora (Tablica 8).

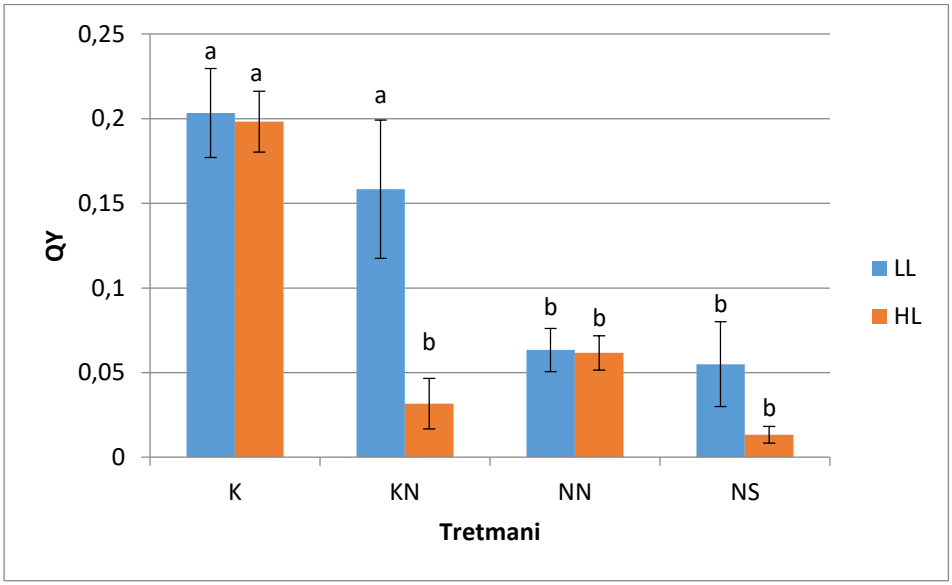
Tablica 8 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QY s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QY ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.022969	1	7.9972	***0.007285***
tretman	0.191023	3	22.1701	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.030456	3	3.5347	***0.023116***

14. dan nakon tretmana grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom te izloženih slabijem intenzitetu svjetla pokazuju statistički značajno nižu vrijednost QY u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu tretiranu kalijevim nitratom koje su izložene jednakom intenzitetu svjetla ($p<0,01$) (Slika 13). Sve grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju

značajno niže vrijednosti u odnosu na svoju kontrolnu skupinu ($p<0,01$), a posebno se ističe grupa tretirana amonijevim sulfatom koja ima najnižu vrijednost.

Statistički značajna razlika uočava se među grupama lišajeva tretiranih kalijevim nitratom koje su potom izložene slabijem intenzitetu svjetla gdje je vrijednost QY značajno viša nego pri jačem intenzitetu svjetlosti ($p<0,05$). Statistički značajne razlike nema među kontrolnim grupama kao niti grupama lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom koje su potom izložene različitom intenzitetu svjetlosti ($p>0,05$).



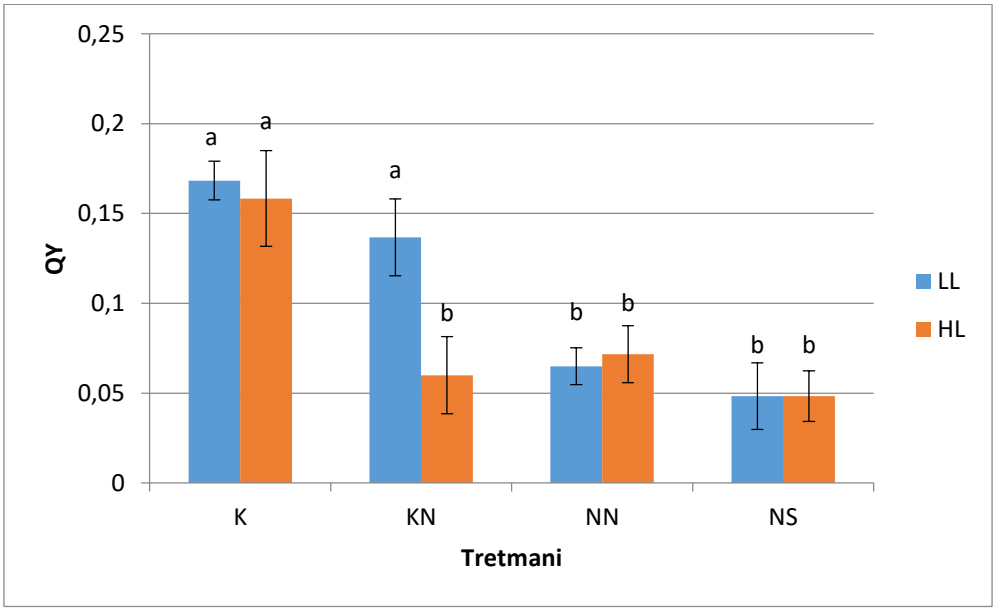
Slika 13 Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 µE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 µE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 21. dan pokusa samo tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QY, dok je utjecaj intenziteta svjetlosti bio neznatan (Tablica 9).

Tablica 9 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QY s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 21. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QY ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.004800	1	2.4273	0.127115
tretman	0.090825	3	15.3097	***0.000001***
svjetlo x tretman	0.013267	3	2.2363	0.098847

Grupe lišajeva koji su 21. dan tretirani amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom te koji su potom izloženi slabije osvjetljenju pokazuju statistički značajno niže vrijednosti QY u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i onu tretiranu kalijevim nitratom ($p<0,01$). Sve skupine tretiranih lišajeva koje su izložene jačem intenzitetu osvjetljenja razlikuju se od svoje kontrolne skupine ($p<0,01$) sa značajno nižim vrijednostima QY, ali se međusobno statistički ne razlikuju značajno (Slika 14).



Slika 14 Efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 21. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i izloženih slabijem svjetlu imala je veću vrijednost QY od isto tretirane grupe lišajeva koji su izloženi jačem osvjetljenju, a ta je razlika i statistički značajna ($p<0,05$). Kontrolne grupe i grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom ne pokazuju velike razlike s obzirom na različit intenzitet svjetlosti kojem su bile izložene.

3.1.3. Fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP)

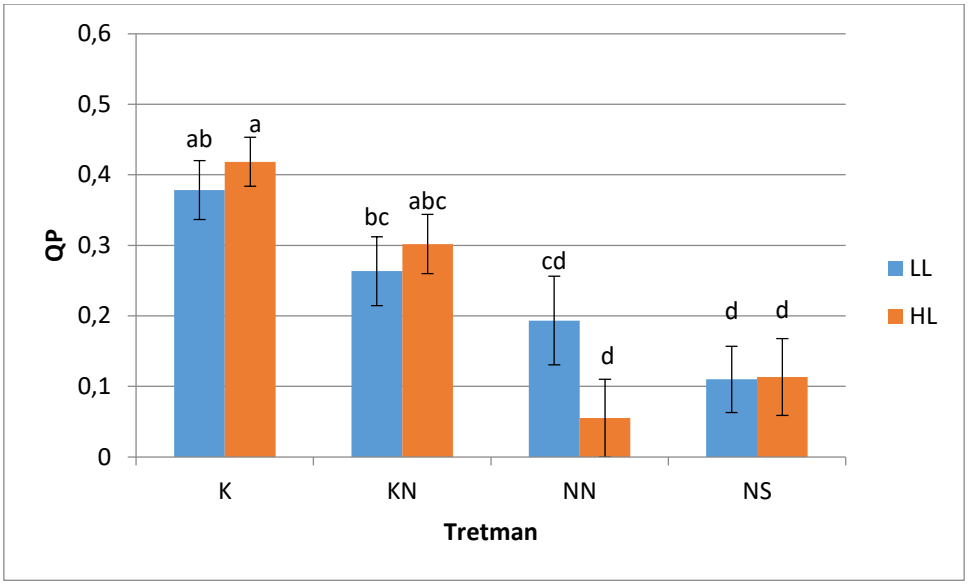
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa samo tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QP, dok intenzitet osvjetljenja nije imao značajnijeg utjecaja (Tablica 10).

Tablica 10 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QP s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QP ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu**.**

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.001102	1	0.0781	0.781373
tretman	0.702123	3	16.5786	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.066923	3	1.5802	0.209194

3. dan nakon tretmana grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom koje su potom izložene slabijem intenzitetu svjetla pokazuju značajnije smanjenje vrijednosti QP u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 15). U slučaju kada su tretirani lišajevi izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja uočava se statistički značajno sniženje vrijednosti kod grupa tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$).

Uspoređujući tretirane uzorke izložene slabijem intenzitetu međusobno ne uočava se statistički značajna razlika među njima. No, u slučaju kada su tretirani lišajevi izloženi jačem intenzitetu osvjetljenja uočava se statistički značajna razlika ($p<0,05$) između lišajeva tretiranih amonijevim nitratom, amonijevim sulfatom i onih tretiranih kalijevim nitratom.



Slika 15 Fotokemijsko gašenje fuorescencije (QP) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Kontrolna grupa i grupa lišaja tretiranih kalijevim nitratom koje su potom izložene jačem intenzitetu svjetlosti imaju nešto veću vrijednost QP u odnosu na isto tretirane grupa lišajeva izložene slabijem intenzitetu svjetlosti. Obratno je ako uspoređujemo grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom izložene jačem osvjetljenju s onima izloženim slabijem osvjetljenju. No, razlike koje su nastale nisu statistički značajne ($p>0,05$).

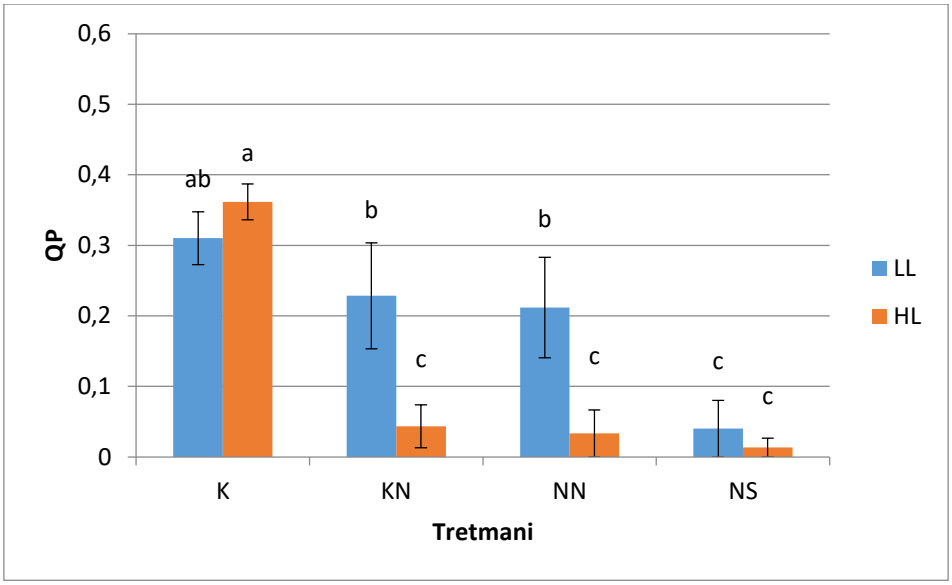
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 7. dan pokusa tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na QP, a također i intenzitet svjetlosti kojem su lišajevi bili izloženi te kombinacija tih dviju parametara (Tablica 11).

Tablica 11 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QP s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QP ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.085852	1	6.89506	***0.012188***
tretman	0.607123	3	16.25333	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.122373	3	3.27605	***0.030724***

U odnosu na kontrolne skupine sve grupe tretiranih lišajeva 7. dan nakon tretmana pokazuju nižu vrijednost QP neovisno o intenzitetu svjetla kojem su bili izloženi (Slika 16). Grupa lišajeva tretirana amonijevim sulfatom te izložene slabijem intenzitetu osvjetljenja pokazuje značajno nižu vrijednosti ($p<0,05$) u odnosu na grupe tretirane kalijevim nitratom i amonijevim nitratom izložene istom intenzitetu svjetlosti. Sve grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju vrlo niske vrijednosti QP koje su statistički značajne u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,01$), a posebno ona skupina lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom ($p<0,001$). Uspoređujući grupe tretiranih lišajeva izložene jačem intenzitetu osvjetljenja međusobno ne uviđa se statistički značajna razlika.

Kontrolna grupa lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti pokazuje malo veću, ali ne značajno različitu vrijednost QP u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu slabijem intenzitetu svjetlosti. Suprotno, sve grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju nižu vrijednost od isto tretiranih grupa lišajeva koji su izloženi slabijem intenzitetu osvjetljenja. Ta razlika je i statistički značajna kada se uspoređuju grupe uzoraka tretiranih s amonijevim nitratom i kalijevim nitratom ($p<0,05$).



Slika 16 Fotokemijsko gašenje fuorescencije (QP) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Faktorijalna analiza pokazala je da je 14. dan pokusa utjecaj samog intenziteta svjetlosti na nastale promjene bio neznatan, ali utjecaj spojeva s dušikom kao i utjecaj kombinacije tih dvaju faktora doveo je do statistički značajne promjene (Tablica 12).

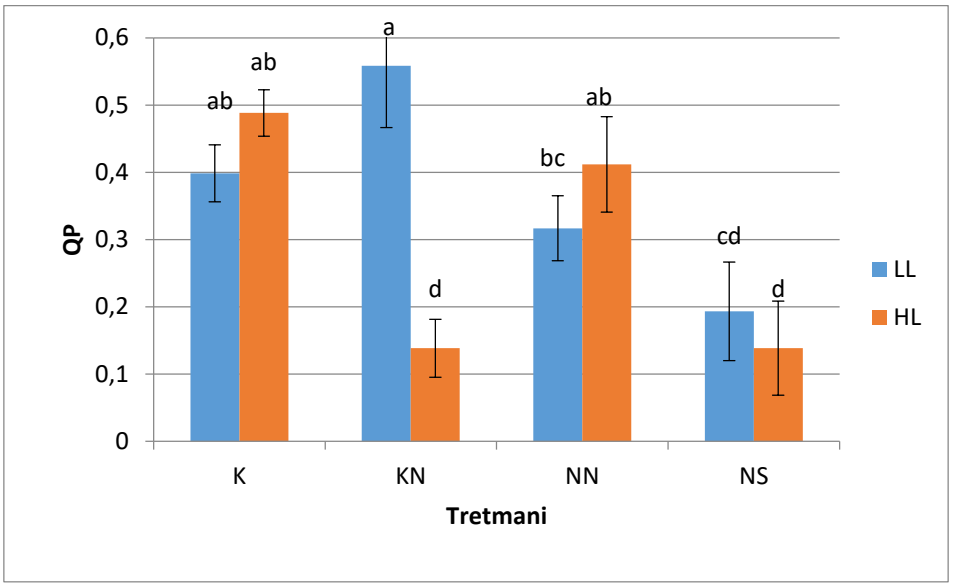
Tablica 12 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QP s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na QP ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.063075	1	2.7224	0.106783
tretman	0.495575	3	7.1298	***0.000602***
svjetlo x tretman	0.526575	3	7.5758	***0.000398***

U odnosu na kontrolnu skupinu, 14. dan nakon tretmana skupine tretirane amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom izložene slabijem intenzitetu svjetla pokazuju nižu vrijednost QP, a grupa tretirana kalijevim nitratom izložena slabijem intenzitetu svjetla višu vrijednost QP (Slika 17). Skupina tretirana amonijevim sulfatom

pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu lišajeva tretiranih kalijevim nitratom koja je potom izložena istom intenzitetu svjetlosti ($p<0,05$). Statistički značajna razlika pojavljuje se i uspoređivanjem grupa lišajeva koji su tretirani kalijevim nitratom i amonijevim nitratom te potom izloženi slabijem intenzitetu svjetla.

Sve tretirane skupine izložene jačem intenzitetu svjetla pokazuju nižu vrijednost QP u odnosu na svoju kontrolnu skupinu. Statistički značajno sniženje vrijednosti QP u odnosu na kontrolnu skupine, ali i skupinu lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i izloženih jačem intenzitetu svjetlosti, pokazuju grupe lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom izloženih jačem intenzitetu svjetlosti.



Slika 17 Fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Grupe tretirane kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom izložene slabijem intenzitetu svjetla imaju veću vrijednost od isto tretiranih skupina izloženih jačem osvjetljenju, ali je značajna samo promjena kod grupe lišajeva koji su tretirani kalijevim nitratom ($p<0,05$). Suprotno tome, kontrolna skupina i grupa lišajeva tretiranih amonijevim nitratom izloženih jačem osvjetljenju imaju veću vrijednost QP od one izložene slabijem osvjetljenju, no niti u jednom slučaju nije došlo do statistički značajne razlike ($p>0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da 21. dan nakon tretiranja dušikovim spojevima ne dolazi do statistički značajne razlike djelovanjem dušikovih spojeva, ali niti djelovanjem jačeg intenziteta svjetlosti (Tablica 13).

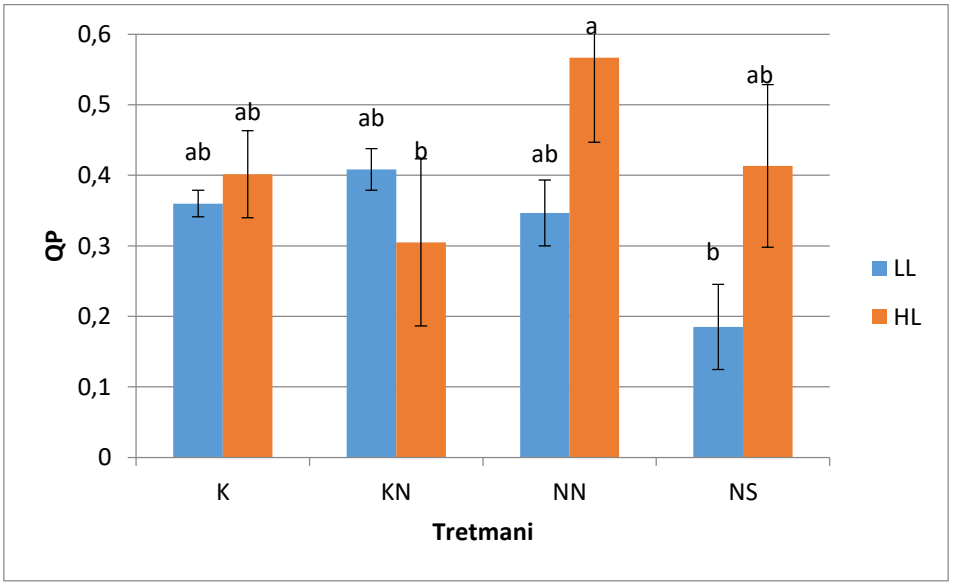
Tablica 13 Faktorijalna analiza varijance napravljena za QP s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 21. dan nakon tretmana.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.112133	1	2.8448	0.099454
tretman	0.153350	3	1.2968	0.288774
svjetlo x tretman	0.226717	3	1.9173	0.142284

Grupa lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom te potom izloženih slabijem osvjetljenju, u odnosu na kontrolnu skupinu, pokazale su 21. dan nakon tretmana nešto nižu vrijednost QP, a grupa tretirana amonijevim nitratom ne pokazuje značajnije promjene u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 18). Grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom te potom izloženih također slabijem intenzitetu svjetla, pokazuje blago povećanje QP u odnosu na kontrolnu skupinu. Unatoč tome statistički je jedino značajna razlika ($p<0,05$) koja je nastala između grupe lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom u odnosu na ostale tretirane skupine i kontrolnu skupinu koje su izložene istom intenzitetu osvjetljenja.

Suprotno tome grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom koji su izloženi jačem intenzitetu svjetla pokazuju nešto veću vrijednost QP u odnosu na svoju kontrolu, a grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom, izložena istom intenzitetu svjetlosti, nešto nižu vrijednost od kontrolne skupine. Ipak među njima se ne pojavljuje statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i izložena slabijem intenzitetu svjetlosti pokazuje veću vrijednosti QP od grupe isto tretiranih lišajeva izloženih jačem intenzitetu svjetlosti. Ostale skupine tretiranih lišajeva pokazuju veću vrijednost kada su izložene jačem osvjetljenju nego slabijem. Nastale promjene nisu statistički značajne ($p>0,05$).



Slika 18 Fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 21. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,05 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

3.1.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ)

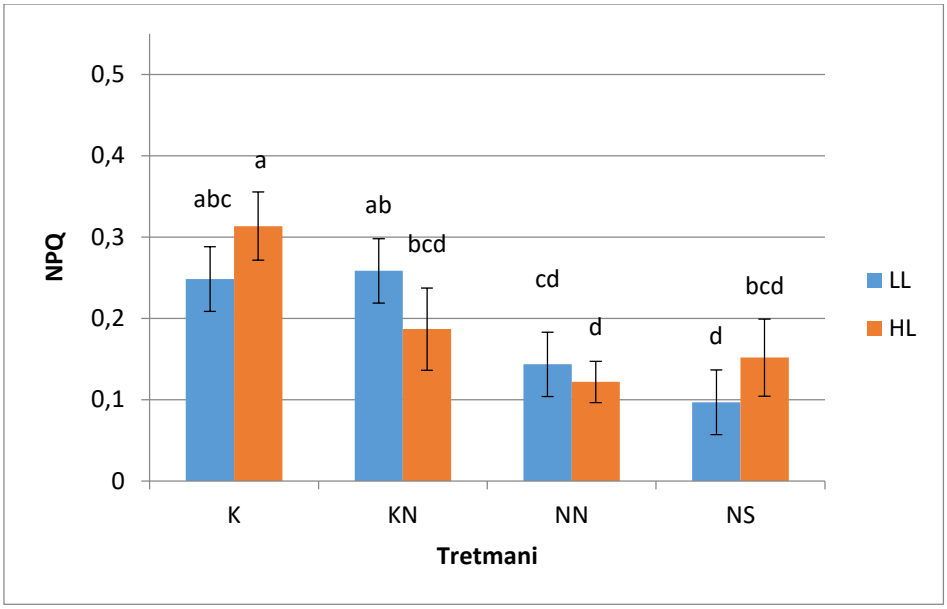
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa samo tretiranje dušikovim spojevima značajno utjecalo na NPQ, dok intenzitet svjetla kojem su lišajevi bili izloženi nije imao značajan utjecaj (Tablica 14).

Tablica 14 Faktorijalna analiza varijance napravljena za NPQ s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na NPQ ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0,000533	1	0,0601	0,807566
tretman	0,203367	3	7,6411	***0,000375***
svjetlo x tretman	0,038033	3	1,4290	0,248540

Grupe lišajeva koji su bili tretirani amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom te izloženi slabijem osvjetljenju 3. dan nakon tretmana (Slika 19) pokazuju nižu vrijednost NPQ u odnosu na kontrolnu grupu i grupu lišajeva tretiranih kalijevim nitratom te izloženih istom intenzitetu osvjetljenja, a ta je razlika i statistički značajna ($p<0,05$). Grupa tretirana kalijevim nitratom pokazuje nešto višu vrijednost NPQ od kontrolne skupine, ali ta razlika nije statistički značajna ($p>0,05$). Sve grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju sniženu vrijednosti NPQ u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$), ali među njima međusobno se ne pokazuje statistički značajna razlika.

Grupe lišajeva tretiranih kalijev nitratom i amonijevim nitratom te izloženih slabijem osvjetljenju pokazuju nešto veću vrijednost NPQ nego grupe lišajeva tretiranih na isti način, ali izloženih jačem osvjetljenju. Obratno, kontrolna skupina i skupina lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom izloženih slabijem svjetlu pokazuju nižu vrijednost NPQ od isto tretiranih skupina lišajeva koje su izloženi jačem osvjetljenju. Međutim, nastale razlike nisu statistički značajne ($p>0,05$).



Slika 19 Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

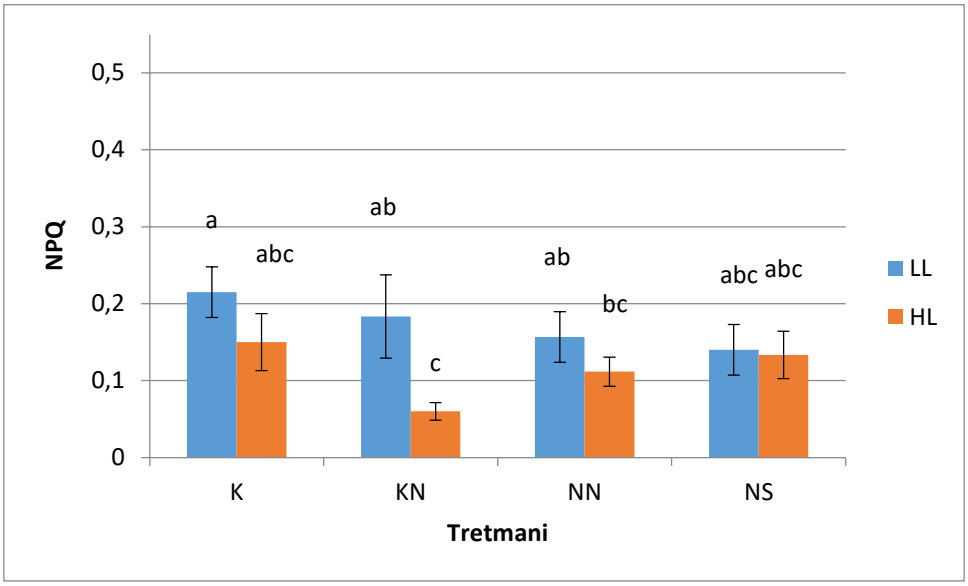
Faktorijalna analiza pokazala je da je 7. dan pokusa samo intenzitet svjetla kojem su lišajevi bili izloženi značajnije utjecao na NPQ, dok tretman dušikovim spojevima na to nije imao značajniji utjecaj (Tablica 15).

Tablica 15 Faktorijalna analiza varijance napravljena za NPQ s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na NPQ ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0,043200	1	6,4182	***0,015318***
tretman	0,025575	3	1,2666	0,298832
svjetlo x tretman	0,021317	3	1,0557	0,378651

Sve grupe tretiranih lišajeva 7. dan nakon tretmana, neovisno o tome jesu li izložene jačem ili slabijem osvjetljenju, pokazuju smanjenu vrijednost NPQ u odnosu na svoje kontrolne skupine, ali razlike nisu statistički značajne (Slika 20).

Grupe lišajeva izloženih slabijem intenzitetu svjetlosti pokazuju veću vrijednost NPQ u odnosu na one izložene jačem intenzitetu osvjetljenja. Statistički značajna razlika ($p<0,05$) uočava se uspoređujući grupu lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i izloženih jačem intenzitetu osvjetljenja u odnosu na isto tretiranu grupu lišajeva izloženih slabijem intenzitetu osvjetljenja. Među ostalim grupama isto tretiranih lišajeva koji su izloženi različitom intenzitetu svjetlosti nema statistički značajne razlike ($p<0,05$).



Slika 20 Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

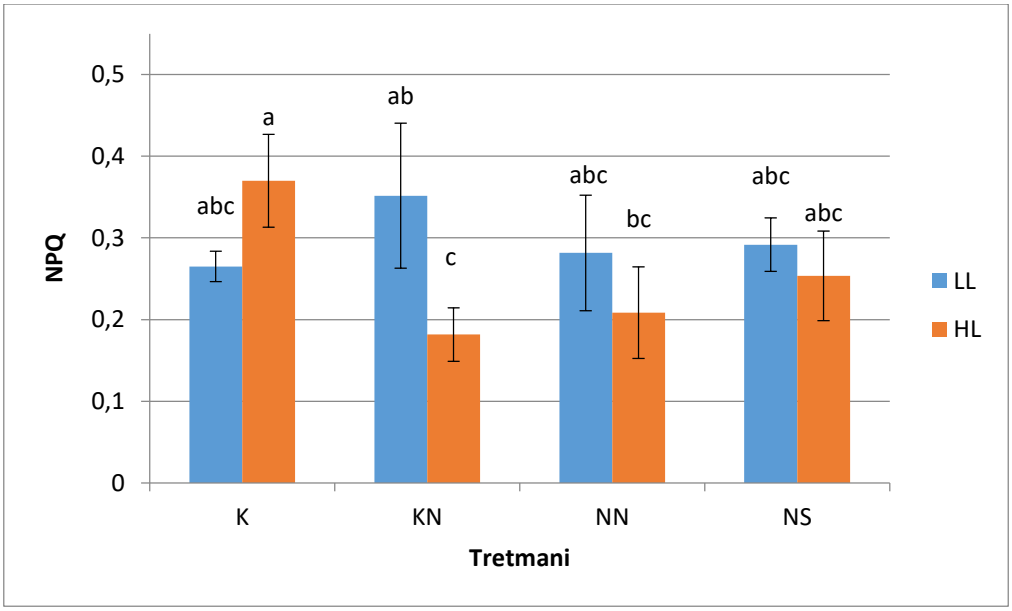
Faktorijalna analiza pokazala je da 14. dan nakon pokusa na NPQ uzoraka lišajeva značajno ne utječe niti tretman dušikovim spojevima niti intenzitet svjetla kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 16).

Tablica 16 Faktorijalna analiza varijance napravljena za NPQ s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.023408	1	1.2624	0.267893
tretman	0.033375	3	0.6000	0.618795
svjetlo x tretman	0.116908	3	2.1016	0.115254

14. dan nakon tretmana grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i izloženih slabijem intenzitetu svjetla pokazuje nešto veću vrijednost NPQ u odnosu na kontrolnu skupinu, a grupe tretirane amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom koje su izložene slabijem intenzitetu svjetla ne pokazuju veću promjenu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu (Slika 21). Nastale razlike u odnosu na kontrolu i uspoređujući tretirane lišajeve međusobno nisu statistički značajne ($p>0,05$). Suprotno tome sve grupe tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem osvjetljenju pokazuju nižu vrijednost NPQ od vrijednosti kontrolnu skupine. Značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,05$) uočava se u grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim nitratom. Uspoređujući grupe tretiranih lišajeva izloženih jačem osvjetljenju međusobno, ne uočava se statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Kontrolna skupina lišajeva izložena jačem osvjetljenju ima nešto veću vrijednost u odnosu na kontrolnu skupinu lišajeva izloženu slabijem osvjetljenju. Obratno, sve ostale grupe tretiranih lišajeva izložene jačem osvjetljenju pokazuju nižu vrijednost od isto tretiranih skupina lišajeva izloženih slabijem osvjetljenju, s tim da je značajna razlika uočena samo u skupina lišajeva koji su tretirani kalijevim nitratom i izloženi različitom intenzitetu svjetla ($p<0,05$).



Slika 21 Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da 21. dan nakon pokusa na NPQ uzoraka lišajeva značajno ne utječe niti tretmanam dušikovim spojevima niti intenzitet svjetla kojem su lišajevi bili izloženi (Tablica 17).

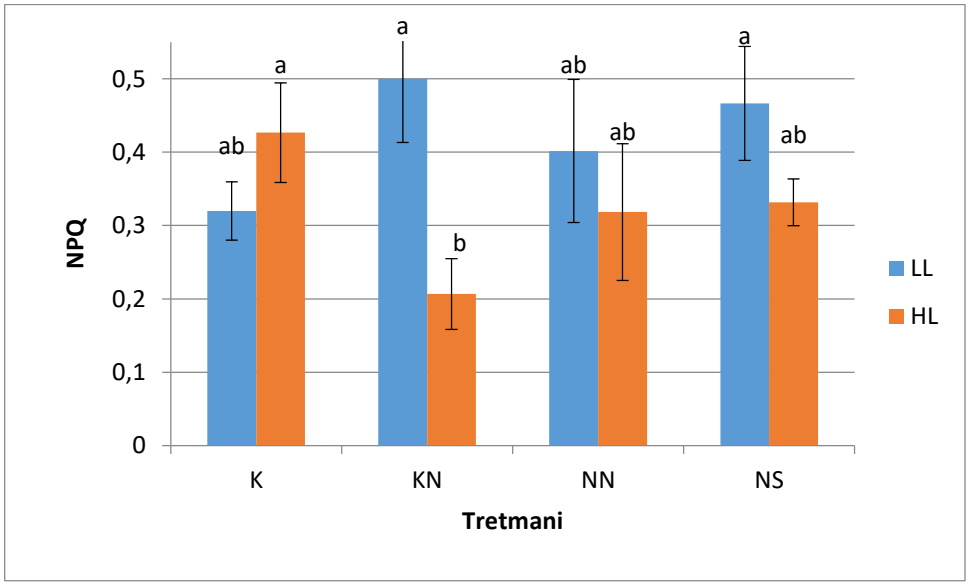
Tablica 17 Faktorijalna analiza varijance napravljena za NPQ s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 21. dan nakon tretmana.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.123019	1	3.9688	0.053206
tretman	0.014773	3	0.1589	0.923341
svjetlo x tretman	0.244756	3	2.6321	0.063090

Sve skupine tretiranih lišajeva izloženih slabijem intenzitetu osvjetljenja pokazuju 21. dan nakon tretmana veću vrijednost NPQ od svoje kontrolnu skupine (Slika 22). Međutim, nastale razlike nisu statistički značajne ($p<0,05$) kao ni razlike koje se uočavaju ako uspoređujemo tretirane lišajeve izložene slabijem osvjetljenju

međusobno. Suprotno tome svi tretmani izloženi jačem osvjetljenju pokazuju nižu vrijednost NPQ od svoje kontrolne skupine, a osobito grupa lišajeva tretiranih kalijev nitratom gdje je razlika i statistički značajna ($p<0,05$). Uspoređujući grupe tretiranih lišajeva izloženih jačem intenzitetu svjetla međusobno, ne uočava se statistički značajna razlika.

Kontrolna grupa lišajeva izložena jačem intenzitetu osvjetljenja pokazuje veću vrijednost NPQ od kontrolne grupe lišajeva izložene slabijem osvjetljenju. Obratno, NPQ tretiranih lišajeva koji su izloženi slabijem osvjetljenju veći je od onih izloženih jačem osvjetljenju. Najveća se razlika, koja je ujedno i statistički značajna ($p<0,05$), pojavljuje između grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom izloženih različitom intenzitetu osvjetljenja.



Slika 22 Nefotokemijsko gašenje fuorescencije (NPQ) za uzorke *Evernia prunastri* mjereno 21. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

.

3.2. Fotosintetski pigmenti

3.2.1. Klorofil *a*

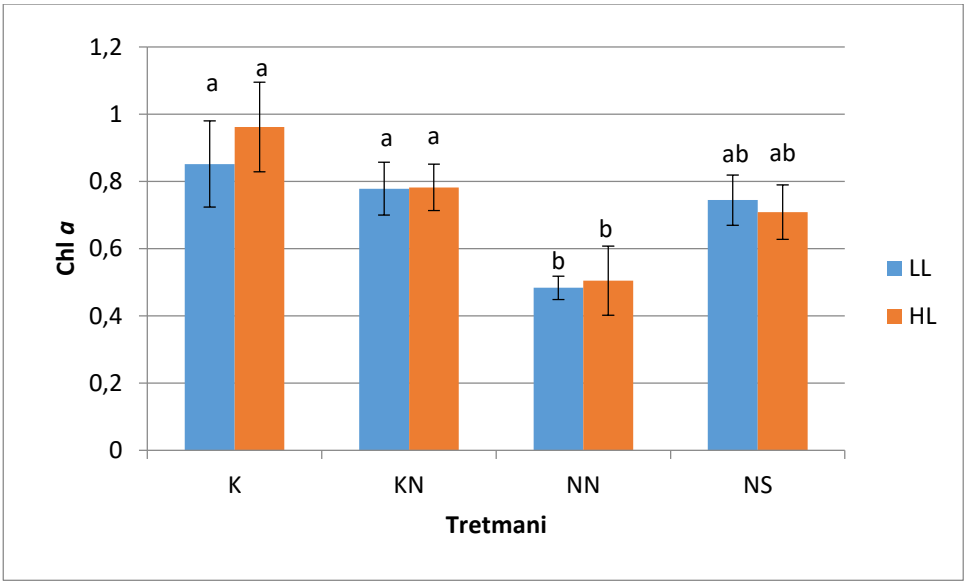
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan nakon pokusa na udio klorofila *a* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet osvjetljenja nije ima značajan utjecaj (Tablica 18).

Tablica 18 Faktorijalna analiza varijance napravljena za koncentraciju klorofila *a* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla u kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0,00750	1	0,1447	0,705700
tretman	1,07208	3	6,8954	***0,000751***
svjetlo x tretman	0,03419	3	0,2199	0,881999

Sve grupe tretiranih lišajeva 3. dan nakon tretmana, neovisno o intenzitetu svjetla kojem su nakon tretmana bile izložene, pokazuju nešto nižu vrijendost klorofila *a* od kontrolnih skupina (Slika 23). Grupe tretirane amonijevim nitartom pokazuju najveću razliku u odnosu na kontrolne skupinu, ali i u odnosu na ostale skupine tretiranih lišajeva. Ta je razlika i statistički značajna ($p<0,01$).

Kontrolna skupina lišajeva izložena jačem intenzitetu osvjetljenja ima nešto veći udio klorofila *a* u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu slabijem intenzitetu osvjetljenja. Skupine lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim nitratom izloženih različitom intenzitetu svjetlosti pokazuju približno jednak udio klorifila *a*, dok grupa lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom izložena slabijem intenzitetu osvjetljenja pokazuje nešto malo veću vrijednost od isto tretirane skupine lišajeva koja je izložena jačem osvjetljenju. Nastale razlike nisu statistički značajne ($p>0,05$).



Slika 23 Udio klorofila *a* (mg/g) (Chl *a*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška,za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Faktorijalna analiza pokazala je da je 7. dan nakon pokusa na udio klorofila *a* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet osvjetljenja nije ima značajan utjecaj (Tablica 19).

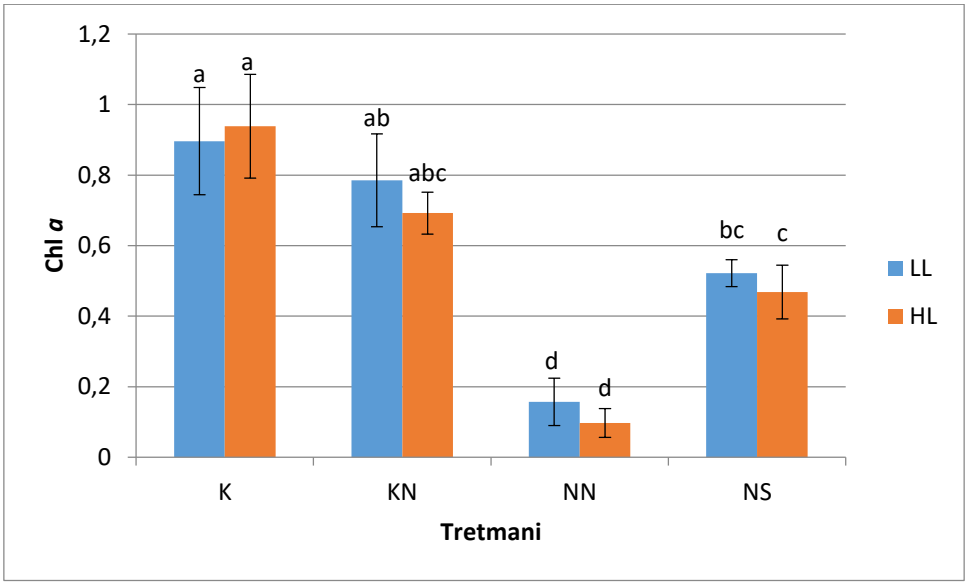
Tablica 19 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio klorofila *a* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0,02035	1	0,3436	0,561043
tretman	4,21462	3	23,7202	***0,000000***
svjetlo x tretman	0,03047	3	0,1715	0,915016

Sve grupe tretiranih lišajeva pokazale su nižu vrijednost klorofila *a* u odnosu na kontrolne skupine 7. dan nakon tretmana (Slika 24). Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolne skupine, ali i skupine lišajeva tretiranih kalijevim nitratom, pokazuju skupine tretirane amonijevim nitratom izložene slabijem i jačem osvjetljenju

(p<0,001) te grupe tretirane amonijevim sulfatom (p<0,01) izložene također jačem i slabijem osvjetljenju.

Kontrolna skupina lišajeva izložena jačem intenzitetu svjetlosti pokazuje malo veću vrijednost klorofila *a* od one izložene slabijem intenzitetu svjetlosti. Sve ostale skupine tretiranih lišajeva koji su izloženi jačem osvjetljenju pokazuju niži udio klorofila *a* u odnosu na isto tretirane grupe lišajeva koje su izložene slabijem osvjetljenju. Međutim, nastale razlike nisu statistički značajne (p>0,05).



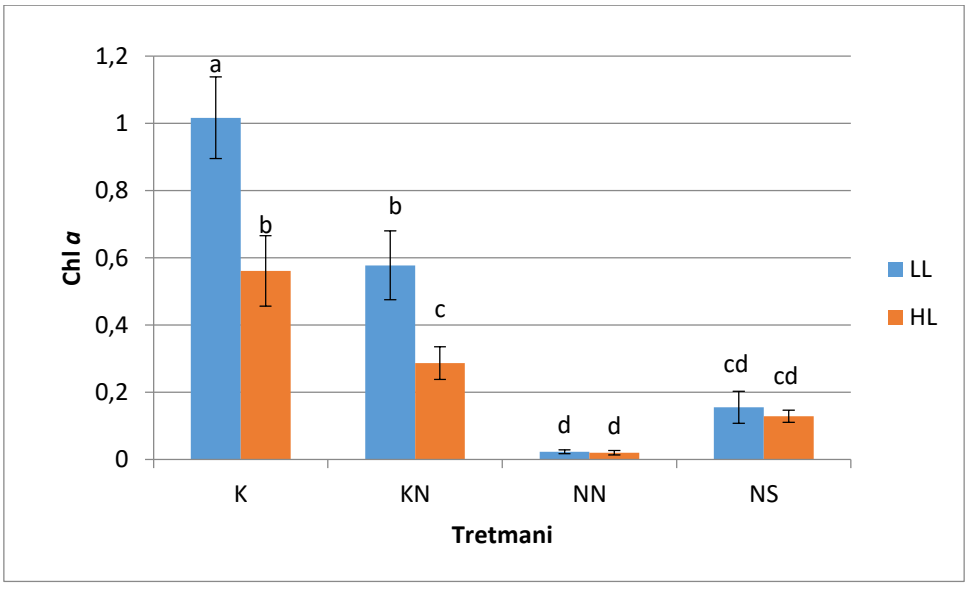
Slika 24 Udio klorofila *a* (mg/g) (Chl *a*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate (p<0,05).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 14. dan pokusa na udio klorofila *a* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet osvjetljenja nije ima značajan utjecaj (Tablica 20).

Tablica 20 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio klorofila *a* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla u kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu (p<0,05) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.450927	1	14.5899	***0.000456***
tretman	4.203872	3	45.3391	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.426641	3	4.6014	***0.007377***

Sve grupe tretiranih lišajeva pokazuju niži udio klorofila *a* u odnosu na kontrolnu skupinu 14. dan nakon tretmana (Slika 25). Nastale razlike statistički su značajne za sve skupine tretiranih lišajeva (p<0,05), a poseban utjecaj imali su amonijev nitrat (p< 0,001) i amonijev sulfat (p<0,01). Grupe tretirane amonijevim nitratom imale su značajno niži udio klorofila *a* u odnosu na grupe tretirane kalijevim nitratom pri oba intenziteta osvjetljenja.



Slika 25 Udio klorofila *a* (mg/g) (Chl *a*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška ,za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate (p<0,05).

Grupe koje su nakon tretmana izložene jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju niže vrijednosti klorofila *a* u odnosu na one grupe koje su nakon tretmana izložene slabijem osvjetljenju. Značajna razlika ($p<0,05$) uočava se uspoređivanjem kontrolnih skupina i skupina tretiranih kalijevim nitratom izloženih različitom intenzitetu svjetla.

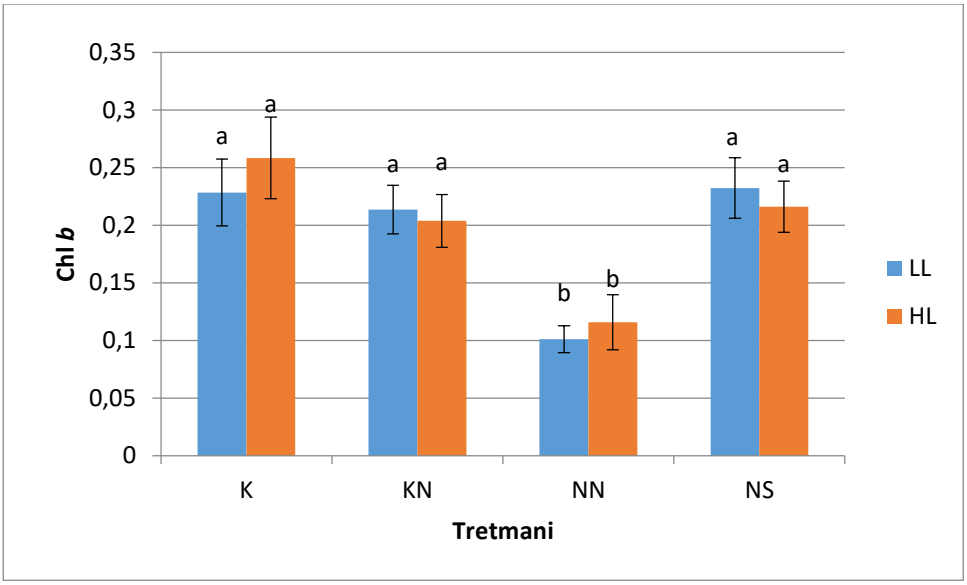
3.2.2. Klorofil *b*

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan nakon pokusa na udio klorofila *b* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet osvjetljenja nije ima značajan utjecaj (Tablica 21).

Tablica 21 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio klorofila *b* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.000265	1	0.0713	0.790868
tretman	0.130399	3	11.7003	***0.000012***
svjetlo x tretman	0.004177	3	0.3748	0.771614

Skupine lišajeva tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom koje su izložene slabijem intenzitetu svjetlosti ne pokazuju veću promjenu u odnosu na svoju kontrolnu skupinu lišajeva ($p>0,05$) 3. dan nakon tretmana (Slika 26). Skupina lišajeva koji su tretirani amonijevim nitratom te izloženi slabijem intenzitetu svjetla pokazuje pak statistički značajnu razliku ($p<0,001$) u odnosu na svoju kontrolnu skupinu, ali i ostale skupine izložene istom intenzitetu svjetla. Skupine lišajeva koju su tretirane kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom te izložene jačem intenzitetu svjetla pokazuju nešto nižu vrijednost od svoje kontrolne skupine, ali nastala razlika nije statistički značajna ($p>0,05$). Skupina lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i izloženih jačem intenzitetu svjetla pokazuju statistički značajnu razliku ($p<0,001$) u odnosu na svoju kontrolnu skupinu, ali i ostale skupine izložene istom intenzitetu svjetla.



Slika 26 Udio klorofila *b* (mg/g) (Chl *b*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Faktorijalna analiza pokazala jeda je 7. dan pokusa na udio klorofila *b* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet osvjetljenja nije imao utjecaj (Tablica 22).

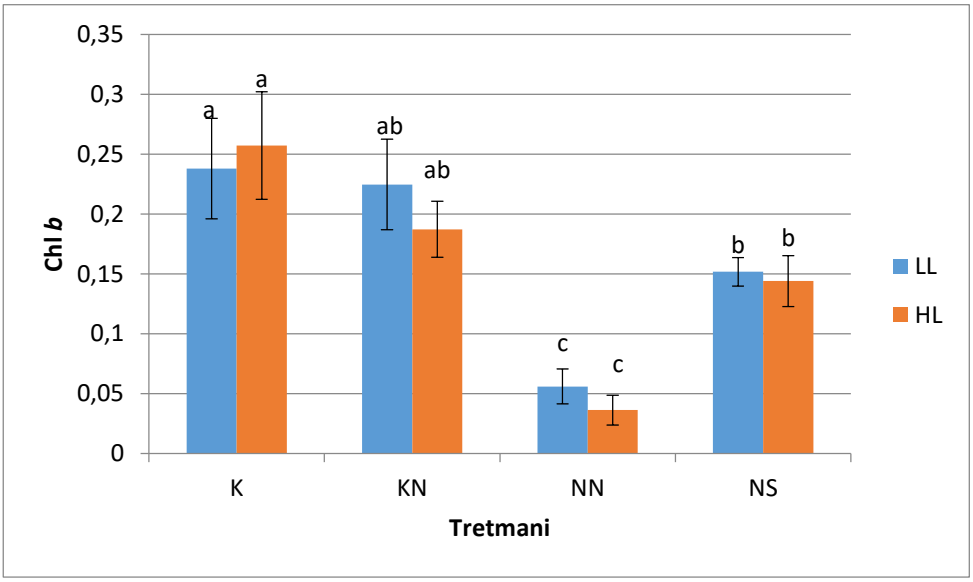
Tablica 22 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio klorofila *b* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla u kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.001558	1	0.3092	0.581286
tretman	0.274328	3	18.1453	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.005107	3	0.3378	0.798095

Pri oba intenziteta svjetlosti skupine lišajeva tretiranih kalijevim nitratom ne pokazuju statistički značajnu promjenu ($p>0,05$) u odnosu na kontrolne skupine 7. dan nakon tretmana, dok grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom imaju značajno niži udio klorofila *b,* kako u odnosu na kontrolne skupine tako i u odnosu na ostale

tretmane (Slika 27). Skupine lišajeva tretiranih amonijevim sulfatom također imaju niže vrijednosti ($p<0,01$) u odnosu na kontrolne skupine.

Kontrolna skupina lišajeva izložena jačem intenzitetu svjetlosti pokazuje nešto veću vrijednost u odnosu na onu izloženu slabijem intenzitetu svjetlosti. Suprotno tome, sve ostale skupine tretiranih lišajeva koje su izložene jačem intenzitetu svjetlosti pokazuju nešto manju vrijednost od skupina isto tretiranih lišajeva koji su izloženi slabijem intenzitetu svjetlosti. Međutim, nastale razlike nisu statistički značajne ($p>0,05$).



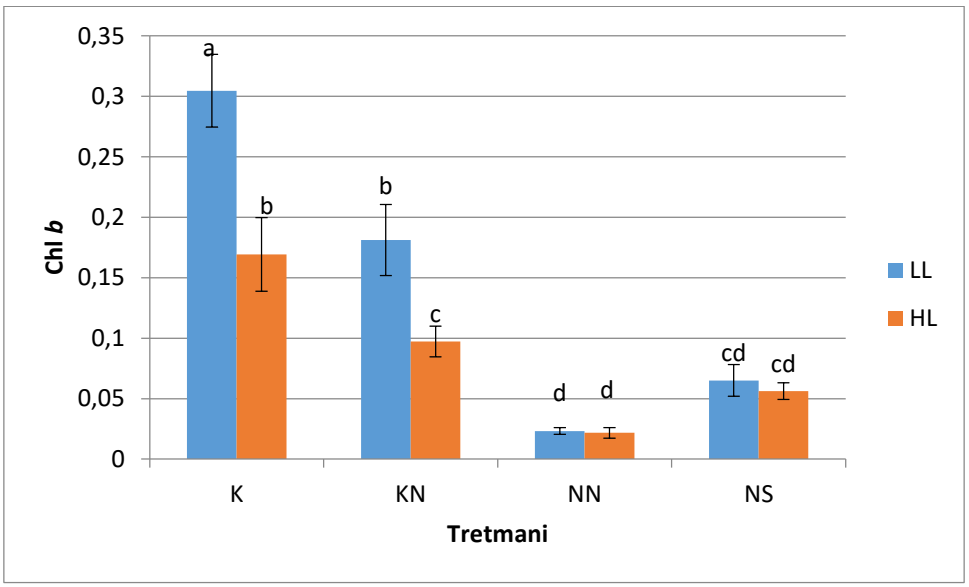
Slika 27 Udio klorofila *b* (mg/g) (Chl *b*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 14. dan pokusa na udio klorofila *b* značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, ali i intenzitet osvjetljenja kojem su lišajevi bili izloženi. Također značajniji utjecaj imala je i kombinacija tih dvaju parametara (Tablica 23).

Tablica 23 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio klorofila *b* s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla u kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno (p<0,05) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.039543	1	16.9539	***0.000186***
tretman	0.323675	3	46.2585	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.036786	3	5.2574	***0.003748***

Svi grupe tretiranih lišajeva 14. dan nakon tretmana imaju nižu vrijednost klorofila *b* u odnosu na kontrolne skupine (Slika 28) . Te su razlike i statistički značajne (p<0,05), a posebno kada je riječ o skupinama lišajeva koji su tretirani amonijevim nitratom (p<0,001) i amonijevim sulfatom (p<0,01). Uspoređujući međusobno skupine tretiranih lišajeva koji su izloženi i slabijem i jačem intenzitetu svjetla, uočava se statistički značajna razlika među njima (p<0,05). Udio izmjeren kod grupa tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom bio je značajno niži nego kod grupa tretiranih kalijevim nitratom.



Slika 28 Udio klorofila *b* (µg/mL) (Chl *b*), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 µE $m^{-2} s^{-1}$), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 µE $m^{-2} s^{-1}$). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate (p<0,05).

Niže udjele klorofila *b* imaju grupe tretiranih lišajeva koje su bile izložene jačem intenzitetu svjetlosti od onih izloženih slabijem osvjetljenju. Statistički značajna razlika ($p<0,05$) uočava se uspoređujući kontrolne skupine lišajeva te one koje su tretirane kalijevim nitratom izložene različitom intenzitetu osvjetljenja.

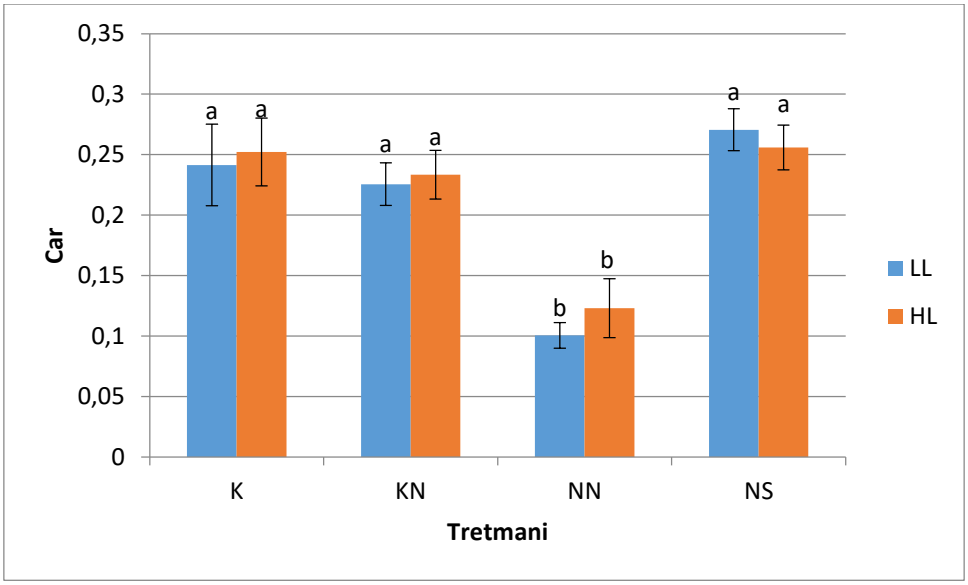
3.2.3. Ukupni karotenoidi

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa na udio ukupnih karotenoida značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok utjecaj intenziteta svjetlosti nije bio značajan (Tablica 24).

Tablica 24 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio karotenoida s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu na koncentraciju klorofila *a* ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.000530	1	0.1769	0.676299
tretman	0.170167	3	18.9343	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.002195	3	0.2442	0.864946

Dobiveni rezultati pokazuju da 3. dan nakon tretmana pri oba intenziteta svjetla grupe lišajeva tretirane kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom imaju sličan udio karotenoida kao i pripadajuća kontrolna skupina (Slika 29). Grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom pokazuju značajno niži udio ($p<0,001$) u odnosu na kontrolnu skupinu i ostale skupine tretiranih lišajeva koji su izloženi jednakom intenzitetu svjetlosti.



Slika 29 Udio karotenoida (µg/mL) (Car), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 µE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 µE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Faktorijalna analiza pokazala je da je 7. dan pokusa na koncentraciju karotenoidaznačajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok utjecaj intenziteta svjetlosti nije bio značajan (Tablica 25).

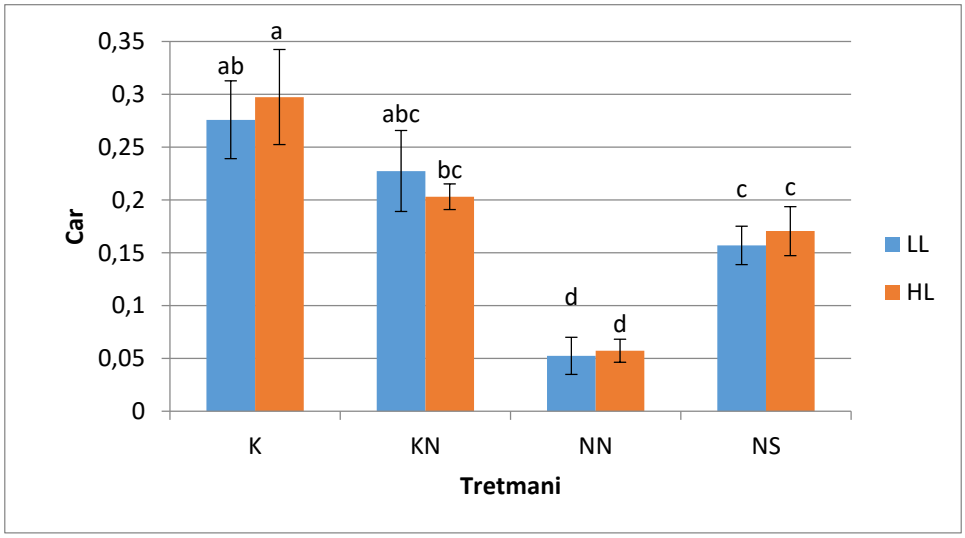
Tablica 25 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio karotenoida s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.000179	1	0.0379	0.846532
tretman	0.342525	3	24.2117	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.003602	3	0.2546	0.857599

Sve skupine tretiranih lišajeva, neovisno o intenzitetu svjetlosti kojoj su bile izložene, 7. dan nakon tretmana pokazuju nižu koncentraciju karotenoida od kontrolnih skupina (Slika 30). Ta je razlika statistički značajna ako uspoređujemo grupe tretirane amonijevim nitratom ($p<0,001$) s njihovim kontrolnim skupinama kao i sa skupinama lišajeva koji su tretirani ostalim dušikovim spojevima i izloženi odgovarajućem

intenzitetu svjetlosti. Također, statistički je značajna razlika ($p<0,05$) nastala ako uspoređujemo grupe lišajeva tretirane amonijevim sulfatom s njihovim kontrolnim skupinama.

Uspoređujući grupe jednako tretiranih lišajeva koji su izloženi različitom intenzitetu svjetlosti ne uočava se statistički značajna razlika ($p>0,05$).



Slika 30 Udio karotenoida (mg/g) (Car), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

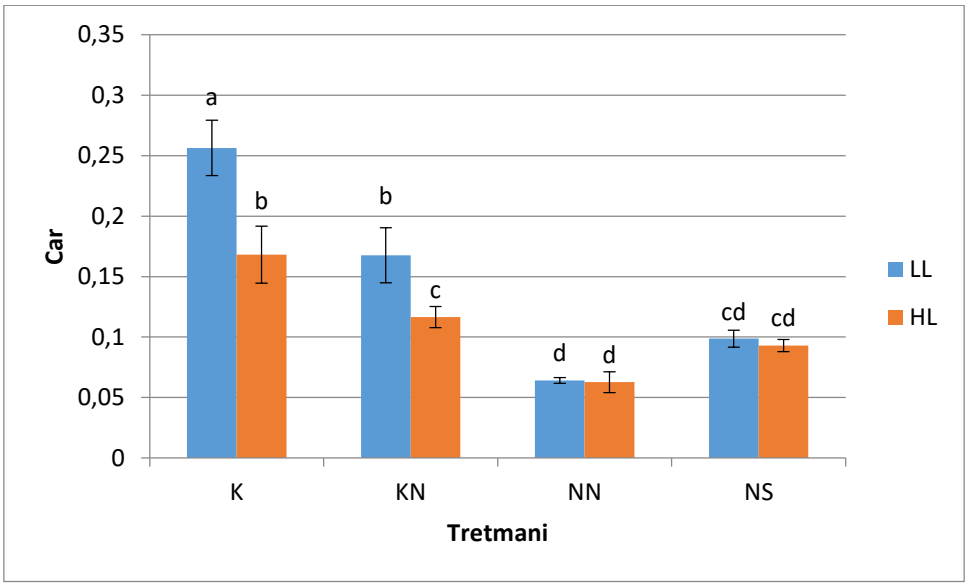
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 14. dan pokusa na udio karotenoida značajno utjecao tretman dušikovim spojevima,ali i intenzitet svjetlosti kao i kombinacija tih dvaju parametara (Tablica 26).

Tablica 26 Faktorijalna analiza varijance napravljena za udio karotenoida s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.016117	1	11.7798	***0.001405***
tretman	0.150090	3	36.5657	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.015193	3	3.7014	***0.019274***

Sve grupe lišajeva tretiranih dušikovim spojevima pokazuju nižu vrijednosti koncentracije karotenoida od kontrolne skupine 14. dan nakon pokusa (Slika 31). Nastala razlika statistički je značajna ($p<0,05$), a posebno ona nastala djelovanjem amonijeva nitrata ($p<0,001$)) koji pokazuje značajno sniženje i u odnosu na grupe tretirane kalijevim nitratom pri oba intenziteta.

Niži udio karotenoida pri jačem intenzitetu svjetlosti u odnosu na slabiji intenzitet ima kontrolna skupina i skupina tretirana kalijevim nitratom dok ostale imaju slične vrijednosti pri oba intenziteta.



Slika 31 Udio karotenoida (mg/g) (Car), izražen kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška, za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

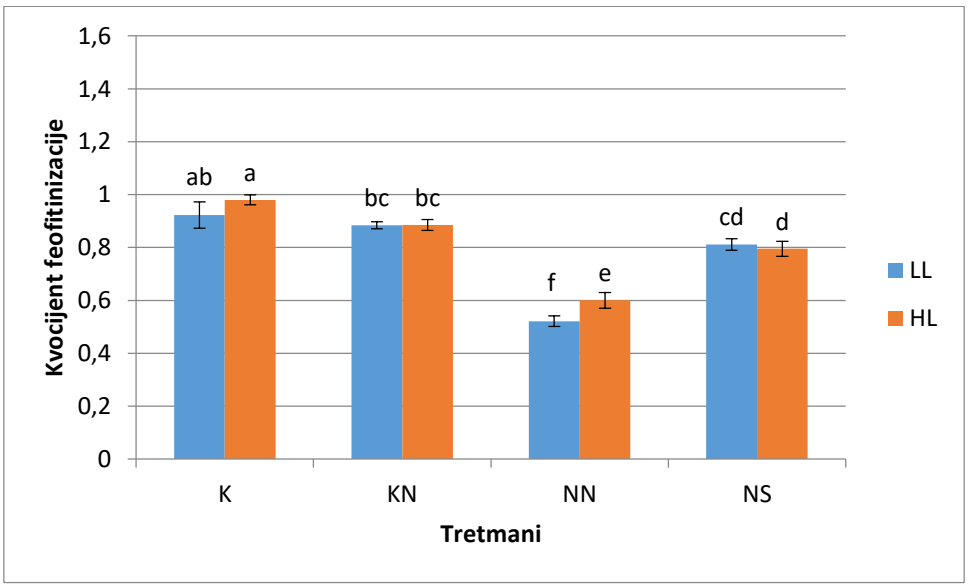
3.2.4. Kvocijent feofitinizacije

Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 3. dan pokusa na kvocijent feofitinizacije značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet svjetlosti nije imao značajnijeg utjecaja (Tablica 27).

Tablica 27 Faktorijalna analiza varijance napravljena za kvocijent feofitinizacije s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 3. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu (p<0,05) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.01111	1	2.503	0.121526
tretman	1.04709	3	78.604	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.01842	3	1.383	0.261889

Sve grupe tretiranih lišajeva 3. dan nakon pokusa pokazale su nešto nižu vrijednost kvocijenta feofitinizacije od kontrolnih skupina, no statistički je značajna razlika (p<0,001) uočena uspoređujući grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom pri oba intenziteta te kod grupe tretirane kalijevim nitratom pri jačem intenzitetu (Slika 32). Grupe tretirane amonijevim nitratom imaju niži kvocijent i u usporedbi s ostalim tretiranim grupama pri oba intenziteta osvjetljenja dok grupa tretirana amonijevim sulfatom ima niži kvocijent od tretmana s kalijevim nitratom samo pri jačem intenzitetu osvjetljenja.



Slika 32 Kvocijent feofitinizacije za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 3. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate (p<0,05).

Kontrolna skupina i skupina tretirana amonijevim nitratom te izložena jačem intenzitetu svjetlosti imaju veći kvocijent feofitinizacije u odnosu na skupine izložene slabijem intenzitetu svjetlosti, međutim statistički je značajna samo promjena uočena kod onih tretiranih amonijevim nitratom.

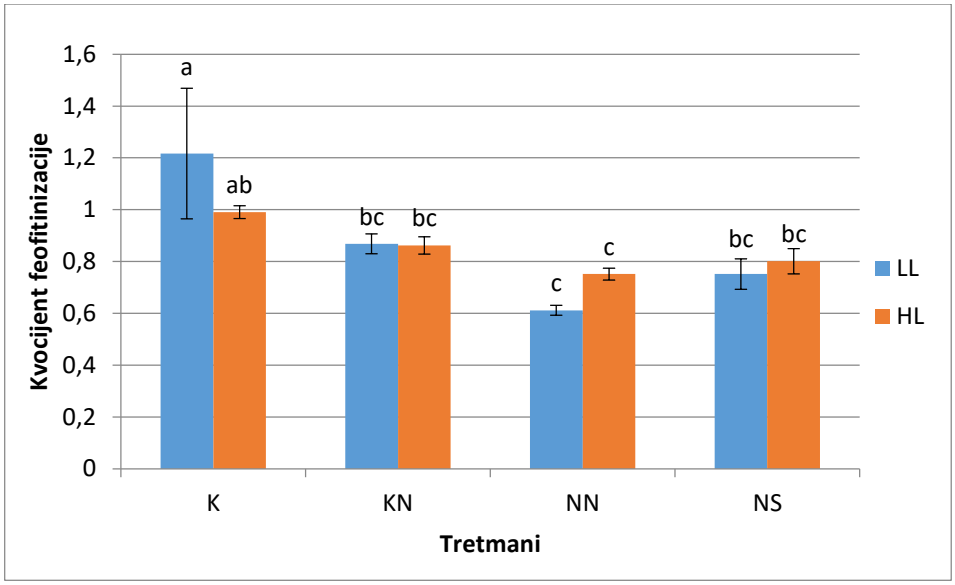
Rezultati dobiveni faktorijalnom analizom pokazuju da je 7. dan pokusa na kvocijent feofitinizacije značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, dok intenzitet svjetlosti nije imao značajnijeg utjecaja (Tablica 28).

Tablica 28 Faktorijalna analiza varijance napravljena za kvocijent feofitinizacije s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 7. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.02212	1	0.4028	0.529261
tretman	1.48623	3	9.0202	***0.000110***
svjetlo x tretman	0.13850	3	0.8406	0.479732

.

Svi uzorci pokazuju nižu vrijednost kvocijenta feofitinizacije od kontrolnih skupina 7. dan nakon pokusa, a razlika je i statistički značajna ($p<0,05$) osim kod grupa tretiranih kalijevim nitratom i amonijevim sulfatom pri jačem intenzitetu osvjetljenja (Slika 33). Posebno značajnu razliku u odnosu na kontrolne skupine, pokazuju skupine lišajeva tretiranih amonijevim nitratom. Uspoređujući međusobno grupe tretiranih lišajeva ne uočava se statistički značajna razlika ($p>0,05$).



Slika 33 Kvocijent feofitinizacije za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 7. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

Faktorijalna analiza pokazala je da je 14. dan pokusa na kvocijent feofitinizacije značajno utjecao tretman dušikovim spojevima, ali i intenzitet svjetlosti (Tablica 29).

Tablica 29 Faktorijalna analiza varijance napravljena za kvocijent feofitinizacije s obzirom na različite dušikove spojeve kojim su lišajevi vrste *Evernia prunastri* (L.) Ach bili tretirani te intenzitet svjetla pri kojem su rasli 14. dan nakon tretmana. Faktori koji značajno utječu ($p<0,05$) podebljani su i u kurzivu.

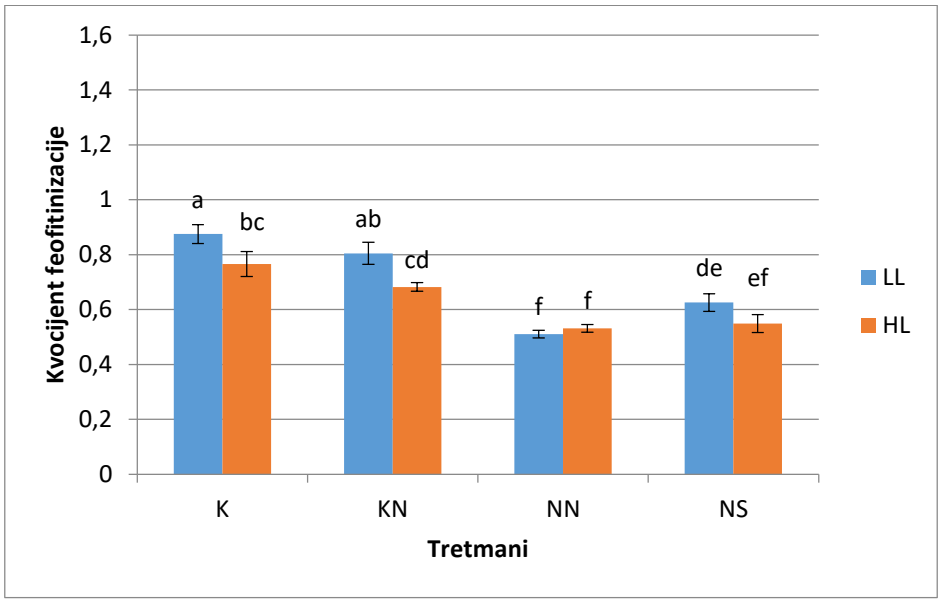
EFEKT	SUME KVADRATA	STUPANJ SLOBODE	F-vrijednost	P-vrijednost
svjetlo	0.06216	1	10.873	***0.002054***
tretman	0.68485	3	39.928	***0.000000***
svjetlo x tretman	0.03755	3	2.189	0.104284

14. dan nakon pokusa sve grupe tretiranih lišajeva imaju značajno niži kvocijenta feofitinizacije od kontrolnih skupina osim grupa tretirana kalijevim nitratom pri oba intenziteta svjetla (Slika 34). Posebno je statistički značajna razlika nastala uspoređujući grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom ($p<0,001$) i amonijevim

sulfatom ($p<0,05$) s kontrolnim skupinama i skupinama lišajeva tretiranih kalijevim nitratom izloženih odgovarajućem intenzitetu svjetlosti.

Kontrolna skupina i skupina lišajeva tretiranih kalijevim nitratom koje su izložene slabijem intenzitetu svjetlosti imaju značajno veći kvocijent feofitinizacije u odnosu na isto tretirane skupine izložene jačem intenzitetu svjetlosti. Grupe tretirane amonijevim nitratom i izložene različitom intenzitetu svjetlosti imaju sličan kvocijent feofitinizacije.

.



Slika 34 Kvocijent feofitinizacije za uzorke *Evernia prunastri* mjeren 14. dana nakon tretmana. Tretmani: K – kontrola, lišajevi prskani vodom pH vrijednosti 6,5, KN – lišajevi tretirani otopinom kalijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NN – lišajevi tretirani otopinom amonijeva nitrata (c=1 M, pH=6,5), NS – lišajevi tretirani otopinom amonijeva sulfata (c=0,5 M, pH=6,5), HL- svjetlo jačeg intenziteta (100 μE m^{-2} s^{-1}), LL – svjetlo slabijeg intenziteta (40 μE m^{-2} s^{-1}). Različita slova iznad stupaca predstavljaju statistički značajno različite rezultate ($p<0,05$).

4. RASPRAVA

Lišajevi su organizmi koji jako ovise o vlažnosti odnosno suhoći atmosfere okoliša u kojem se nalaze, ali su i jako osjetljivi na promjene u okolišu, osobito zagađenje zraka (Munzi i sur, 2009). Lišajevi su, ovisno o vrsti, različito osjetljivi na zagađenje zraka, a jedan od pokazatelja toga je odsutnost ili prisutnost određene vrste na nekom području (Bačkor i sur, 2003). Također, pokazatelji štetnog učinka onečišćenog zraka mogu biti fiziološke promjene kao što su pojačana produkcija etilena, gubitak elektrolita zbog oštećenja staničnih membrani, smanjenje sadržaja ATP-a i fiksacije N_2, respiracije, a dolazi i do povećane degradacije klorofila te smanjenje učinkovitosti fotosinteze (Garty i sur, 2003). Također, učinak štetnih tvari iz onečišćenog zraka, pa tako i spojeva s dušikom na lišajeve, uvelike ovisi i o parametrima poput temperature, vlage i osvjetljenja samih lišaja. Poznato je, kao što je ranije rečeno, da jako osvjetljenje može imati štetan utjecaj na fotosintezu lišajeva kao i na sastav pigmenata. Zrak može biti zagađen teškim metalima, ali i dušikovim spojevima. Glavni izvori deponiranog dušika su amonijak (NH_3) posebno u ruralnim područjima i dušikovi oksidi (NO_x) u urbanim područjima, osobito u blizini cesta i autocesta. Dušikovi spojevi formiraju se sagorijevanjem fosilnih goriva ili oksidacijom atmosferskog dušika, a cestovni promet je zasigurno glavni izvor dušikovih oksida (Frati i sur, 2005). U ovom istraživanju proučavala sam utjecaj dušikovih spojeva, upravo u obliku amonijaka i nitrata, na fotosintetsku aktivnost i pigmente lišaja *Evernia prunastri*. To sam načinila mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo* te proučavanjem koncentracije pojedinih pigmenata tijekom određenog razdoblja. Mjerenjem fluorescencije klorofila *a in vivo* dobivamo podatke o aktivnosti fotosustava II, a on je najskloniji oštećenjima pri različitim stresnim uvjetima (Bačkor i Loopi, 2009). Također, proučila sam kako na metabolizam i sastav pigmenata istraživane vrste lišaja utječe slabiji odnosno jači intenzitet svjetla. Naime, Sun i sur (2016) utvdili su da veća koncentracija dušika dostupnog biljkama riže značajno utječe na povećanje učinka fotosinteze i koncentracije klorofila u biljaka. Također, Piccoto i sur (2011) u svom istaživanju zaključuju da jača svjetlost potiče organizme da investiraju „višak“ dostupnog dušika ugrađujući ga u komponente fotosintetskog aparata (molekule klorofila) odnosno enzime koji sudjeluju u procesu fotosinteze (Rubisco, ATP-sintaza, citokrom) kako bi se osigurala učinkovitija uporaba energije. S obzirom na to pretpostavila sam da će u mom istraživanju jači intenzitet svjetlosti također potaknuti iskorištavanje „viška“ dušika iz okoliša za izgradnju novih molekula klorofila odnosno enzima.

Od parametara koji nam mogu reći nešto o fotosintetskoj aktivnosti lišaja pratila sam promjene maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II u mraku (QYmax), efektivnog kvantnog prinosa fotosustava II (QY), fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) te nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) kroz određeno vremensko razdoblje.

Maksimalni kvantni prinos fotosustava II (QYmax) jest omjer varijabilne fluoerscencije i maksimalnog signala fluorescencije. On nam, kao što samo ime govori, kazuje mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II. Faktorijalna analiza pokazala je da su na QYmax, tijekom svih istraživanih dana (3., 7., 14. i 21. dan nakon tretmana), značajan utjecaj imali i intenzitet osvjetljenja i sami dušikovi spojevi. U mnogim biljnim vrstama optimalna vrijednost QYmax iznosi oko 0,83 (Maxwell i Johnson, 2000) dok je u lišaja ona nešto manja i uobičajene vrijednosti su od 0,5-0,76 (Paoli i sur, 2010) što se slaže s mojim istraživanjem. Detaljnija analiza je pokazala da je značajno smanjenje vrijednosti QYmax nastalo već 3. i 7. dana od početka pokusa, posebno za grupe lišajeva tretiranih amonijevim nitratom i amonijevim sulfatom. Također, jače smanjenje uočava se u grupa tretiranih lišajeva koji su bili izloženi jačem osvjetljenju čak i u grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom. To ne potvrđuje našu teoriju da će jače osvjetljenje potaknuti iskorištavanje „viška“ dušika iz okoliša, a mogući razlog je prejaka koncentracija korištenih kemikalija te bi istraživanje trebalo proširiti radeći i s drugim koncentracijama istih spojeva. Smanjenje vrijednosti QYmax ukazuje na smanjenje fotosintetske učinkovitosti lišaja i često se povezuje s fotoinhibicijom ili čak oštećenjem fotosustava II (Maxwell i Johnson, 2000). Međutim, trend smanjenja se ne nastavlja jer se 14. i 21. dana od početka pokusa uočava povećanje vrijednosti QYmax što upućuje na mogući oporavak fotosintetskog aparata. Do sličnih rezultata došli su i Vos i sur (2005) istražujući učinkovitost fotosinteze na krumpiru (*Solanum tuberozum* L.) gdje su ustanovili da višak dušika u te vrste također ne potiče učinkovitost fotosinteze.

Provedena su dva istraživanja koja su također istraživala utjecaj dušikovih spojeva na lišajeve prateći maksimalni kvantni prinos fotosustava II. Naime, Pirintsos i sur, (2009) prema Munzi i sur (2009) ustanovili su da fotosintetska učinkovitost lišaja *Evernia prunastri* ima negativan odgovor samo na spojeve s amonijakom dok nije jako osjetljiva na one spojeve koji sadrže samo dušik u obliku dušikovih oksida. To objašnjava i ide u prilog rezultatima koje sam i ja dobila u ovom istraživanju. Također, u drugom istraživanju, Munzi i sur (2010) dio su uzoraka lišaja *Evernia prunastri* svaki treći dan prskali otopinom NH_4NO_3 koncentracije 0,05, a dio otopinom $(NH_4)_2SO_4$ koncentracije 0,025 M. Došli do zaključka da amonijev nitrat i amonijev sulfat prvih dva

tjedna slabo utječu na fotosintetsku aktivnost lišaja, ali da nakon određenog vremena oba spoja pokazuju izrazit utjecaj na fotosintezu lišaja. Također, u svom istraživanju na dio uzoraka lišaja primijenili su amonijev nitrat kocentracije 1 M i amonijev sulfat koncentracije 0,5 M, što su jednake koncentracije koje sam i ja upotrijebila u istraživanju. U njihovom istraživanju QYmax bilo je moguće pratiti dva ili tri tjedna sve dok se pokazivala određena aktivnost fotosintetskog aparata pa makar ona bila i mala, ali nakon tri tjedna fotosintetska aktivnost bila je gotovo ugašena. Njihove vrijednosti QYmax za grupe tretirane amonijevim nitratom kretale su se u rasponu od 0,45-0,05, a za amonijev sulfat 0,3-0,05. Moje vrijednosti svih promatranih dana za grupe tretirane amonijevim nitratom bile su vrlo slične njihovim, tj. 0,4-0,05. Vrijednosti QYmax u mom istraživanju za grupe tretirane amonijevim sulfatom kretale su se od 0,4-0,1, ali za razliku od mojih rezultata rezultati Munzi i sur (2010) ne pokazuju tendenciju jačeg porasta tih vrijednosti u kasnijim fazama istraživanja.

Unatoč tom što je metoda tretiranja lišajeva dušikovim spojevima bila različita, došli smo do sličnih rezultata. Također, unatoč blažem povećanju vrijednosti QYmax 21. dana, na temelju istraživanja Munzi i sur (2010), za pretpostaviti je da će se fotosintetska aktivnost lišaja ugasiti.

Za razliku od lišaja *Evernia prunastri* , koji ne podnosi dušik i onečišćenje zraka (Munzi i sur, 2009), rezultati dobiveni istraživanjem utjecaja istih dušikovih spojeva na lišaj *Flavoparmelia caperata* donose potpuno druge rezultate. Naime, rezultati istraživanja koje je provela Smetiško (2017) pokazuju da je utjecaj dušikovih spojeva na taj lišaj tijekom svih testiranih dana (3., 7. i 14. dan od tretmana) bio puno manji u odnosu na utjecaj istih spojeva na lišaja *Evernia prunastri* tj. vrijednosti QYmax su se u odnosu na kontrolne skupine puno manje promijenile.

Drugi parametar koji sam pratila kako bih utvrdila fotosintetsku aktivnost lišajeva jest efektivni kvantni prinos fotosustava II (QY). Naime, to je parametar koji također jako ovisi o uvjetima okoliša u kojem se lišaj nalazi. U uvjetima slabijeg intenziteta svjetla neometan je tok elektrona kroz fotosustave te je vrijednosti QY veća. U uvjetima jačeg osvjetljenja količina apsorbirane energije je prevelika u odnosu na onu koja je potrebna za fotosintezu pa dolazi do smanjenja protoka elektrona te je vrijednost QY manja. U koliko je vrijednost QY manja niža je i učinkovitost fotosinteze (Miyake i sur, 2009). Faktorijalnom analizom utvrdila sam da je tretman dušikovim spojevima imao značajan utjecaj u početku mjerenja tj. već 3. dan. Nakon toga, 7. i 14. dan, uz tretmane dušikom značajan utjecaj na QY imao je i intenzitet osvjetljenja, a potom je njegov utjecaj polagano oslabio. Detaljnija analiza pokazuje da nema veće

razlike između kontrolnih grupa izloženih različitom intenzitetu svjetla, a također je utvrđeno i da su svi dušikovi spojevi već 3. i 7. dana značajno smanjili QY. U smanjenju su se posebno istaknuli spojevi koji sadrže amonijeve ione tj. amonijev nitrat i amonijev sulfat, a nešto manje se istaknuo kalijev nitrat. Grupa lišajeva tretiranih kalijevim nitratom izloženih slabijem intenzitetu svjetla je grupa s najmanje negativnim učinkom na QY. Uočava se i značajnije smanjenje QY u grupa lišajeva koji su nakon tretmana izloženi jačem intenzitetu svjetla. Budući da između kontrolnih skupina nema razlike ovisno o intenzitetu svjetla može se pretpostaviti da su nastale promjene rezultat zajedničkog djelovanja jačeg osvjetljenja i toksičnsti dušikovih spojeva. Od 14. dana pa do 21. dana, mjerenja su pokazala blagi porast vrijednosti QY što nas može navesti na razmišljanje o oporavku lišaja. Uočava se manji utjecaj svjetla 21. dana mjerenja. Ovi rezultati mogu se usporediti s onima dobivenim za QYmax te možemo zaključiti da amonijev nitrat i amonijev sulfat imaju jači negativan učinak na fotosintetsku učinkovitost nego kalijev nitrat.

I ovoga puta uspoređujući svoje rezultate s rezultatima Smetiško (2017) uviđaju se značajne razlike među dvije različito tolerantne vrste lišajeva. Rezultati Smetiško (2017) pokazuju da na vrijednst QY lišaja *Flavoparmelia caperata* svi dušikovi spojevi imaju podjednak utjecaj te se ne izdvajaju posebno dušikovi spojevi koji sadrže dušik u obliku amonijevih iona. Također, 3. i 7. dan, u odnosu na kontrolu, niže su vrijednosti QY onih grupa tretiranih lišajeva koji su izloženi slabijem intenzitetu svjetla. Grupe tretiranih lišajeva izložene jačem intenzitetu svjetla pokazuju veće vrijednosti QY u odnosu na kontrolu.

Kako bih pokušala razjasniti primijećene promjene u fotosintetskoj učinkovitosti pratila sam i fotokemijsko gašenje fluorescencije (QP) koje odražava redoks-stanje primarnog akceptora elektrona fotosustava II (plastokinona), koji je pokazatelj oksidiranih reakcijskih centara na fotosustavu II (Maxwell i Johnson, 2000). Faktorijalna analiza varijance pokazala je da je učinak dušikovih spojeva započeo odmah 3. dan, a 7. dan uz tretmane dušikom značajan utjecaj pokazao je i intenzitet svjetla kao i kombinacija tih dvaju parametara. Međutim s vremenom oba faktora prestaju imati učinak na QP. Detaljnijom analizom utvrdila sam da su svi dušikovi spojevi osim kalijevog nitrata smanjili QP već 3. dan što ukazuje na to da je manje otvorenih PS II centara, odnosno da su reducirani i potvrđuje da je došlo do zastoja u prijenosu elektrona koji se ne prenose do NADP+. Trend se nastavlja 7. i 14. dan nakon tretmana i učinak je veći pri višem intenzitetu svjetlosti što se slaže s rezultatima i za ostale pokazatelje, QYmax i QY. Vjerojatno se negativan učinak dušikovih spojeva još povećava pri većoj količini fotona kad je ekscitacijski pritisak još

i veći (Maxwell i Johnson, 2000). Također, kao i kod prethodnih parametara amonijevi spojevi su imali negativniji učinak nego kalijev nitrat s time da je zanimljivo da je jak negativan učinak, osobito 7. dana kako na QY tako i na QP, pokazao upravo amonijev sulfat. Za pretpostaviti je da je ovdje osim negativnog učinka amonijaka i sulfat u previsokoj koncentraciji mogao djelovati toksično. Na kraju pokusa sve grupe tretiranih lišajeva, neovisno o intenzitetu svjetla kojem su bile izložene, pokazuju povećanje vrijednosti QP koje se vraćaju na one slične kontroli što ukazuje da se lišaj donekle pokušava adaptirati na novonastale uvjete. Ako taj podatak uzmemo u obzir možemo se zapitati hoće li se taj trend i dalje nastaviti.

Munzi i sur (2010) u svom istraživanju pokazuju da se vrsti *Evernia prunastri* nakon trećeg tjedna gasi fotosintetska aktivnost barem prema QYmax koji su oni mjerili. U mojem istraživanju vrijednosti QY i QYmax su nakon 3 tjedna dalje dosta niže od kontrolnih što znači da i dalje postoji zastoj u linearnom toku elektrona ali se na neki način povećala frakcija otvorenih PS centara. Za objašnjenje su potrebna detaljnija istraživanja te produljenje pokusa na više tjedana.

Rezultati Smetiško (2017) na lišaju *Flavoparmelia caperata* pokazuju da dušikovi spojevi nisu statistički značajno utjecali na vrijednosti QP parametra. Također, u tom istraživanju utjecaj intenziteta svjetlosti na QP varira i ne pokazuje se značajan utjecaj jačeg intenziteta svjetlosti na smanjenje QP.

Posljednji parametar koji sam pratila u okviru istraživanja fluorescencije klorofila *a in vivo* na vrsti lišaja *Evernia prunastri* je nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) koji odražava gubitak energije u obliku topline (Vidaković- Cifrek, 2014). Faktorijalnom analizom utvrdila sam da je u početku samo tretman dušikovim spojevima značajnije utjecao na NPQ, a nakon 7. dana nema učinka dušikovih spojeva na NPQ. Detaljnija analiza pokazuje da su samo 3. dan mjerenja vrijednosti za NPQ tretiranih lišajeva bile uglavnom značajno manje od onih kontrolnih grupa, a kasnije u pokusu bilježi se značajan porast tih vrijednosti iako se vrijednosti 21. dan zadržavaju na onim sličnim kontroli. Rezultati su pomalo neočekivani jer je bilo za očekivati da se višak ekcitacijskog pritiska uslijed negativnog učinka dušika oslobodi putem topline što bi rezultiralo povećanjem vrijednosti NPQ. To se uobičajeno dešava kod biljaka izloženih jakim intenzitetima svjetlosti, suši i drugim stresnim uvjetima (Maxwell and Johnson, 2000). No ovdje prvo imamo sniženje NPQ vrijednosti pa je za pretpostaviti da lišaj ima neku drugu strategiju za oslobađanje viška ekscitacijske energije. Niže vrijednosti maksimalnog kvantnog prinosa fotosustava II uočene tijekom pokusa mogu prema jednim autorima ukazivati da je došlo do oštećenja

fotosustava II budući da tijekom zastoja toka elektrona oni mogu prijeći na kisik pa nastaju reaktivni oblici kisika koji oštećuju fotosustav II, a osobito je osjetljiv D1 protein u reakcijskom središtu i molekule klorofila (Barber, 1995). No neki autori pretpostavljaju da bi niži QYmax mogao značiti inaktivaciju PS centra i time smanjenje ekscitacijskog pritiska (Miyake i sur, 2009). Paoli i sur (2010) su detaljnim istraživanjem fluorescencije klorofila, takozvanim JIP testom, utvrdili da amonijak utječe na protok energije kroz fotosustav II jer povećava prosječnu količinu energije apsorbirane u aktivnim PS centrima te povećava oslobađanje djela energije inaktivacijom djela PS centara. Također utvrdili su da amonijak uzrokuje snažno smanjenje protoka elektrona kroz transportni lanac što se slaže s mojim rezultatima.

Rezultati Smetiško (2017) pokazuju da su uzorci lišaja *Flavoparmelia caperata* pretrpjeli puno manje promjene vrijednosti NPQ nakon tretmana u odnosu na svoju kontrolnu skupinu kao i u odnosu na lišaj *Evernia prunastri*. Tretirane supine lišajeva *Flavoparmelia caperata,* za razliku od lišaja *Evernia prunastri,* ne pokazuje veće smanjenje vrijednost NPQ tretiranih skupina u odnosu na kontrolne skupine.

Osim fluorescencije klorofila *a* u ovom radu mjerila sam i udio klorofila *a,* klorofila *b* i ukupnih karotenoida u tkivu lišaja te kvocijent feofitinizacije kao pokazatelj degradacije klorofila.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je učinak dušikovih spojeva koji su korišteni, kao i intenziteta svjetlosti koji se pratio 3., 7. i 14. dana od početka pokusa, bio sličan za klorofila *a* i klorofil *b*. U daljnjem tekstu ću ih s toga navoditi samo kao klorofile, a u koliko se pojave neke razlike među njima posebno ću ih naglasiti.

Faktorijalna analiza pokazala je da 3. i 7. dana od početka pokusa samo tretiranje dušikovim spojevima značajno utječe na smanjenje udjela klorofila, a 14. dan uočava se značajan utjecaj i intenziteta svjetlosti kao i utjecaj kombinacije tih dvaju parametara. Rezultati pokazuju da su svi dušikovi spojevi snizili udio klorofila u tkivu lišaja, ali različitim intenzitetom i u različito vrijeme nakon tretmana. Najznačajniji utjecaj na smanjenje imao je amonijev nitrat neovisno o intenzitetu svjetlosti kojem su lišajevi bili izloženi budući da je do sniženja udjela klorofila došlo već 3. dan i da su vrijednosti uvijek bile značajno niže nego kod ostalih tretmana, dok je kod tretmana kalijevim nitratom učinak zabilježen tek 14. dan. Uzrok tome je ranije spomenut negativniji utjecaj amonijaka na lišajeve od utjecaja drugih dušikovih spojeva npr. dušikovih oksida (Munzi i sur, 2009). Do jednakog zaključka došli su Munzi i sur (2010) koji su utvrdili negativniji utjecaj amonijeva nitrata i amonijeva sulfata na lišajeve u odnosu na kalijev nitrat. Rezultati dobiven za udio klorofila poklapaju se s rezultatima

koje sam utvrdila za fluorescenciju budući da dušikovi spojevi osobito u obliku amonijevih iona smanjuju oboje. Kao što sam već spomenula jedna je mogućnost da je to posljedica oštećenja fotosintetskog aparata što dovodi do degradacije klorofila i oštećenja fotosustava II pa time i smanjene fotosintetske učinkovitosti. Druga je mogućnost da je to mehanizam kojim se lišajevi pokušavaju adaptirati na stres u ovom slučaju uzrokovan dušikom. Naime, Tkalec i sur (2015) su slične rezultate dobili za mesojednu biljku *Drosera rotundifolia* izloženu svjetlosnom stresu i zaključili da nefunkcionalni PS centri zajedno sa smanjenom koncentracijom klorofila mogu smanjiti ekscitacijski pritisak na fotosintetski aparat te predstavljaju prilagodbu na stresne uvjete koji bi inače doveli do fotoinhibicije i ireverzibilnog oštećenja. Za potvrdu te teorije bilo bi potrebno ponoviti eksperiment i produljiti vrijeme istraživanja.

Sama svjetlost u početku pokusa ne pokazuje značajan utjecaj na udio klorofila, ali se utjecaj vidi 14. dan kada su grupe kontrolnih lišajeva i lišajeva tretiranih kalijevim nitratom pri slabijem intenzitetu svjetla pokazivale puno veće vrijednosti od onih izloženih jačem intenzitetu svjetla.

Rezultati ne iznenađuju jer se može pretpostaviti da su lišajevi nakon aklimatizacije na 60 μmol fotona m^{-2} s^{-1} bili prilagođeni tom intenzitetu svjetla pa je izlaganje jačem intenzitetu svjetlosti dovelo do prilagodbe fotosintetskog aparata tj. smanjenja koncentracije fotosintetskih pigmenata, uglavnom klorofila te mijenjaja njihovog omjera (Walters, 2005). Pretpostavku potvrđuje i dio istraživanja fluorescencije klorofila *a in vivo,* posebno ako se promatraju kontrolne skupine u kojima se ne uočava značajna razlika s obzirom na intenzitet svjetlosti kojem su bile izložene promatranih dana. Međutim, zanimljivo je da je učinak primijećen i na uzorcima koji ili nisu bili tretirani ili su bili tretirani manje toksičnim kalijevim nitratom.

Uspoređujući svoje rezultate s rezultatima Smetiško (2017), uviđam da je u oba istraživanja amonijev nitrat imao najvećeg utjecaja na klorofil, ali za razliku od značajnog utjecaja amonijeva sulfata na lišaj u mom istraživanju, ne uočava se značajan utjecaj amonijeva sulfata na lišaj *Flavoparmelia caperata.* Također, udio klorofila je bio puno veći u kontrolnim kao i u grupama tretiranih lišajeva *Flavoparmelia caperata* u odnosu na lišaj *Evernia prunastri*što je vjerojatno posljedica razlike između vrsta.

U usporedbi s nekim drugim istraživanjima na vrsti *Evernia prunastri*, npr. Lackovičova i sur (2013), Frati i sur (2016) vrijednosti klorofila *a* i *b* u kontrolnim uzorcima u ovom istraživanju bile su niže što se eventualno može povezati s dosta niskim intenzitetom svjetlosti na koji su lišajevi bili aklimatizirani. To baš nije

očekivano budući da je za pretpostaviti da će lišajevi kao i biljke pri nižim intenzitetima svjetlosti imati više vrijednosti klorofila kako bi učinkovito apsorbirale malu količinu svjetlosti (Walters, 2005). Međutim, moguće je da je kod lišajeva drugačije. Naime, Piccotto (2010) je u svom istraživanju pokazao da lišajevi sa sunčanijih staništa imaju više klorofila nego oni sa sjenovitih što je povezao s razlikom u gustoći fotobionta odnosno u broju stanica alga po jedinici površine.

Također sam proučavala i udio ukupnih karotenoida u lišaja *Evernia prunastri* koji je pokazao trend vrlo sličan onom za klorofil *a* i *b*, dakle smanjenje osobito nakon tretmana sa spojevima koji sadrže amonijeve ione. Do istih rezultata, tj. smanjenja udjela karotenoida lišajeva nakon tretmana dušikovim spojevima, došli su i Frati i sur (2005) što ukazuje da dušikovi spojevima imaju negativan učinak na sve fotosintetske pigmente. Neobično je da je također, kao i kod klorofila, 14. dan došlo do smanjenja karotenoida i kod kontrolnih uzoraka i onih tretiranih kalijevim nitratom izloženih višem intenzitetu svjetlosti iako bi za očekivati bilo obratno s obzirom na zaštitnu ulogu karotenoida. Međutim, kod lišajeva u obrani od viška svjetlosti važnu ulogu ima i gljiva koja štiti fotobionta te različiti sekundarni metaboliti (Piccotto i Tretiach, 2010).

I ovoga puta uspoređujući rezultate sa Smetiško (2017) zaključujem da lišaj *Flavoparmelia caperata* pokazuje puno veći udio karotenoida u kontrolnih i tretiranih skupina od lišaja *Evernia prunastri.* Kada promatramo grupe tretiranih lišajeva udio je više od duplo veći. Očekivano je da i na koncentraciju karotenoida lišaja *Flavoparmelia caperata* najznačajniji utjecaj pokazuje tretman amonijevim nitratom.

Posljednji parametar koji sam proučavala je kvocijent feofitinizacije. To je parametar koji se često koristi kao pokazatelj stresnog učinka na fotobiont u lišaju (Bačkor i Loopi, 2009). Faktorijalna analiza varijance pokazuje da je u početku jedino tretiranje dušikovim spojevima značajnije utjecalo na kvocijent feofitinizacije, a tek 14. dan uočava se i značajniji utjecaj svjetlosti. Kvocijent feofitinizacije pokazao se kao osjetljiviji pokazatelj nego udio klorofila budući da je do smanjenja kod svih tretmana došlo već 3. dan osim kod tretmana s kalijevim nitratom pri nižem intenzitetu osvjetljenja što pokazuje da ubrzo nakon tretiranja dušikom te tijekom cijelog pokusa dolazi do degradacije klorofila. I ovdje je učinak veći kod tretmana sa spojevima koji sadrže amonijak. Naime, veće količine amonijaka dovode do acidifikacije klorofila što uzrokuje izlazak magnezija iz molekule klorofila pa nastaje feofitin. To je pokazatelj da do primijećenog smanjenja udjela klorofila koji sam primijetila u istraživanju ipak nije došlo samo uslijed pokušaja prilagodbe na stres nego zbog direktnog negativnog

učinka amonijaka. Također, 14. dan grupe kontrolnih lišajeva i onih tretiranih kalijevim nitratom, a izložene jačem osvjetljenju pokazuju niže vrijednosti kvocijenta od onih izloženih slabijem osvjetljenju. To znači da je iako je viši intenzitet svjetlosti korišten u mojem istraživanju bio relativno nizak (100 μmol fotona m^{-2} s^{-1}) došlo do degradacije klorofila. Uobičajeno tek vrijednosti iznad 300 μmol fotona m^{-2} s^{-1} uzrokuju fotoinhibiciju i oštećenje fotosustava (Očenášová i sur, 2014), ali kao što sam već napomenula ovi lišajevi su bili aklimatizirani na vrlo niske vrijednosti (60 μmol fotona m^{-2} s^{-1}) pa je moguće da su doživjeli svjetlosni stres.

Rezultati Smetiško (2017) na lišaju *Flavoparmelia caperata* pokazuju povećanje vrijednosti kvocijenta feofitinizacije 7. dana u odnosu na mjerenje 3. dan neovisno o intenzitetu svjetlosti kojem su lišaji bili izloženi. Vrijednosti su se 14. dan od početka pokusa ponovno vratile na na nešto niže vrijednosti, sličnije onima mjerenim 3. dan. Rezultati Smetiško (2017) pokazuju da je na smanjenje vrijednosti kvocjenta feofitinizacije 14. dan od početka pokusa, kao i u mom slučaju, najznačajniji utjecaj imao amonijev nitrat. Dobiveni rezultati govore da je u slučaju oba lišaja došlo do degradacije klorofila.

Na temelju svih rezultata mogu zaključiti da je lišaj *Evernia prunastri*vrlo osjetljiv na tretiranje dušikovim spojevima što se slaže s rezultatima iz literature. Naime poznato je da jelišaj *Evernia prunastri* jače osjetljiv na spojeve s dušikom od npr. lišaja *Xanthoria parietina*, što barem djelomično ovisi o gotovo peterostruko većoj kationskoj izmjeni u lišaja *Evernia prunastri* (Gaio-Oliveira i sur, 2001 prema Paoli i sur, 2015), zatim o većoj površini talusa lišaja koja je u doticaju s okolinom s obzirom da je riječ o fruktoznom lišaju i većem unosu dušikovih spojeva što je prilagodba na niske koncentracije dušika u okolišu (Gaio-Oliveira i sur, 2005 prema Paoli i sur, 2015). Štoviše, pokazalo se da lišaj *Evernia prunastri* postupno reagira na povećanje koncentracije dušika ili na duljinu perioda izloženosti dušiku (Munzi i sur, 2012). Toksičnost dušikovih spojeva kod osjetljivih je vrsta povezana s nakupljanjem dušika u tkivu lišaja što dovodi do acidifikacije pigmenata i posljedično smanjuje fotosintetsku učinkovitost te smanjuje količinu ugljikohidrata za sintezu aminokiselina koje se mogu koristi za asimilaciju toksičnog amonijaka. Također toksičnost može biti povezana sa smanjenim unosom kalija i fosfora do koje dolazi kod viška dušika, a za lišajeve je fosfor vrlo važan za stvaranje novih fotobionata koji bi mogli ukloniti višak dušika ugrađujući ga u svoje spojeve (Carter i sur, 2017). Veća toksičnost amonijevih spojeva koju sam primijetila može se objasniti s činjenicom da lišajevi lakše uzimaju amonijak odnosno amonijeve ione (NH_4^+) nego negativno nabijene oblike dušika kao što je nitrat, a slobodan amonijak, ako se brzo ne veže u aminokiseline je toksičan i može

narušiti protonski gradijent važan za nastanak ATP (Neuhauser i sur, 2007 prema Munzi i sur, 2012).

Moguće povećanje koncentracije klorofila uslijed povećanja koncentracije dušikovih spojeva u okolišu, što za posljedicu ima povećanje fotosintetskog kapaciteta nužno potrebnog za stvaranje ugljikovih kostura aminokiselina, opaženo je samo u tolerantnih vrsta lišajeva (Hauk i sur, 2010 prema Munzi i sur, 2014). Budući da lišaj *Evernia prunastri* to nije, ne čudi da jači intenzitet svjetlosti nije smanjio štetan učinak dušika u mom istraživanju.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja na lišaju *Evernia prunastri* nakon tretiranja dušikovim spojevima i izlaganja uzoraka različitom intenzitetu svjetla, zaključila sam slijedeće:

- Dušikovi spojevi imaju značajan negativan učinak na fotosintetsku učinkovitost u lišaja *Evernia prunastri*. Veći utjecaj pokazuju spojevi dušika koji sadrže dušik u obliku amonijevih iona, a nešto manji utjecaj pokazuju oni koji sadrže dušik samo u obliku nitrata. Svi promatrani parametri fluorescencije klorofila (QYmax, QY, QP i NPQ) pokazali su se kao osjetljivi pokazatelji štetnog utjecaja.
- Dušikovi spojevi značajno utječu na smanjenje udjela fotosintetskih pigmenata i kvocijenta feofitinizacije. Smanjenje udjela pigmenata zbog djelovanja dušikovih spojeva u direktnoj je vezi sa smanjenjem fotosintetske učinkovitosti lišaja *Evernia prunastri*.
- Izlaganje lišajeva tretiranih dušikovim spojevima jačem intenzitetu svjetlosti ima negativan utjecaj što se očituje u smanjenju fotosintetske učinkovitosti lišaja kao i u smanjenom udjelu fotosintetskih pigmenata.
- Lišaj *Evernia prunastri,* u odnosu na druge lišajeve, vrlo je osjetljiv na zagađenje dušikovim spojevima.

6. LITERATURA

Bačkor M., Paulikova K., Geralska A., Davidson R. (2003): Monitorig of air pollution in Košice (Eastern Slovakia) using lichens.Polish Journal of Environmental Studies 12, 141-150.

Bačkor M., Loppi S. (2009): Interactions of lichens with heavy metals. Biologia Plantarum 53, 214–222.

Carter T. S., Clark C. M., Fenn M. E., Jovan S., Perakis S. S., Riddell J., Schaberg P. G., Greaver T. L., Hastings M. G.(2017): Mechanisms of nitrogen deposition effects on temperate forest lichens and trees. Ecosphere 8(3), e01717.

Conti M. E., Cecchetti G. (2000): Biological monitoring: licens as bioindictors of air pollution assessment- a review. Environmental Pollution 114, 472-492.

Demming-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. III (1996): In vivo functions of carotenoids in higher plantsFederation of American Societies for Experimental Biology 10, 403-412.
.
Dubravec K. D., Regula I. (1995): Fiziologija bilja, Školska knjiga, Zagreb.

Franck N., Winkler S., Pastenes C., Infante R. (2007): Acclimation to sun and shade of three accessions of the Chilean native berry-crop murta. Agroforest Systems 69, 215–229.

Frati L., Caprasecca E., Santoni S., Gaggi C., Guttova A., Gaudino S., Patti A., Rosamillia S., Pirintsos S. A., Loppi S. (2005): Effect of NO_2 and NH_3 from road traffic on epiphytic lichens. Environmental Pollution 142, 58-64.

Garty J., Tomer S., Levin T., Lehr H. (2003): Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel. Environmental Research 91, 186–198.

Kranner I., Beckett R. P., Varma A. K. (2002): Protocols in lichenology. Springer Verlag, Berlin.

Lackovičova A., Guttova A., Bačkor M., Pišut P., Pišut I. (2013): Response of *Evernia prunastri* to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. The Lichenologist 45, 89–100.

Očenášová P., Barták M., Hájek J. (2014): Photoinhibition of photosynthesis in Antarctic lichen *Usnea antarctica*. II. Analysis of non-photochemical quenching mechanisms activated by low to medium light doses. Czech Polar Reports 4, 90-99.

Majumder S., Mishra D., Ram S. S., Jana N. K., Santra S., Sudarshan M., Chakraborty A. (2012): Physiological and chemical response of the lichen, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, to the urban environment of Kolkata, India. Environmental Science and Pollution Research20, 3077–3085.

Maslać A., Maslać M., Tkalec M. (2016): The impact of cadmium on photosynthetic performance and secondary metabolites in the lichens Parmelia sulcata, Flavoparmelia caperata and Evernia prunastri. Acta Botanica Croatica 75(2), 186-193.

Maxwell K., Johnson G. N. (2000): Chloropyll fluorescence- a practical guide. Journal of Experimental Botany 51:659- 668.

Miyake C., Amako K., Shiraishi N., Sugimoto T. (2009): Acclimation of tobacco leaves to high light intensity drives the plastoquinone oxidation system—relationship among the fraction of open PSII centers, non-photochemical quenching of chl fluorescence and the maximum quantum yield of PSII in the dark. Plant and Cell Physiology50, 730–743.

Munzi S., Pisani T., Loppi S. (2009): The integrity of lichen chell membrane as a suitable parameter for monitoring biological effects of acute nitrogen pollution. Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 2009–2012.

Munzi S., Pisani T., Paoli L., Loppi S. (2010): Time- and dose- dependency of the effects of nitrogen pollution on lichens. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1785- 1788.

Munzi S., Paoli L. , Fiorini E. , Loppi S. (2012): Physiological response of the epiphytic lichen Evernia prunastri (L.) Ach. to ecologically relevant nitrogen concentrations. Environmental Pollution 17, 2529

Munzi S., Pisani T., Paoli L., Renzi M., Loppi S. (2013): Effect of nitrogen supply on the C/N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach.Turkish Journal of Biology 37, 165-170.

Nash III T. (2008): Lichen Biology, second edition, Arizona State University, USA, 1-498.

Neuhäuser B., Dynowsky M., Mayer M., Ludewig U. (2007): Regulation of NH4+ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. Plant Physiology 143, 1651–1659.

Oliver, Marie (2011): Canaries in a coal mine: using lichens to measure nitrogen pollution. Science Findings 131, 1-5.

Paoli L., Pirintsos S. A., Kotzabasis K., Pisani T., Navakoudis E., Loppi S. (2010): Effects of ammonia from livestock farming on lichen photosynthesis. Environmental Pollution 158, 2258-2265.

Paoli L., Munzi S., Guttova A., Senko D., Sardella G., Loppi S. (2014): Lichen as suitable indicators of the biological effects of atmospheric pollutants around a municipal solid waste incinerator (S Italy). Ecological Indicators 52, 362- 370.

Paoli L., Benesperi R., Proietti Pannunzi D., Corsini A., Loppi S. (2015): Biological effects of ammonia released from a composting plant assessed with lichens. Environmental Science and Pollution Research 21:5861–5872.

Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Profil international, Zagreb.

Piccotto M., Tretiach M. (2010): Photosynthesis in chlorolichens: the influence of the habitat light regime. Journal of Plant Research 123, 763–775.

Piccotto M., Bidussi M., Tretiach M. (2011): Effects of the urban environmental conditions on the chlorophyll a fluorescence emission in transplants of three ecologically distinct lichens. Environmental and Experimental Botany 73, 102–107.

Ripollune F., Grassi G., Lauteri M., Borghetti M. (2003): Photosynthesis–nitrogen relationships: interpretation of different patterns between Pseudotsuga menziesii and Populus × euroamericana in a mini-stand experiment. Tree Physiology 23, 137–144.

Smetiško M. (2017): Utjecaj dušikovih spojeva na fotosintetske pokazatelje u lišaja *Flavoparmelia caperata*. Diplomski rad, Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu

Sparrius L. B. (2006): Response of epiphytic lichen communities to decreasing ammonia air concentracions in a moderately polluted area of The Netherlands. Environmental Pollution 146, 375-379.

Sun J., Ye M., Peng S., Li Y. (2016): Nitrogen can improve the rapid response of photosynthesis to changing irradiance in rice. (*Oryza sativa* L.) plants. Scientific Reports 6:31305.

Tkalec M., Dobos M., Babic M., Jurak E. (2015): The acclimation of carnivorous round-leaved sundew (*Drosera rotundifolia* L.) to solar radiation. Acta Physiologiae Plantarum 37, 78.

Vidaković- Cifrek Ž., Pevalek- Kolzlina B., Tkalec M., Babić M., Radić- Brkanac S. (2014): Praktikum iz fiziologije bilja, skripta za internu upotrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu

Vos J., Van der Putten P. E. L., Birch C. J. (2005). Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (*Zea mays* L.). Field Crops Research 93(1), 64-73.

Walters R. G. (2005): Towards an understanding of photosynthetic acclimation. Journal of Experimental Botany56 (411): 435-447.

Korištene internet stranice:

https://i0.wp.com/www.herbal-supplement-resource.com/wp-content/uploads/2014/01/oakmoss_evernia_prunastri_img-e1474355017756.jpg?ssl=1

https://istiqomahrrr.wordpress.com/2013/06/12/pigmen-klorofil/

http://instrukcije-kemija.blogspot.com/

https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1094/2016/11/03154447/OSC_Microbio_05_05_lichenstr.jpg

7. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Božana Ćavarušić

Datum i mjesto rođenja: 23.12.1991., Frankfurt am Main, SR Njemačka

Kontakt: 095/ 1995 721; bozana.cavarusic@gmail.com

Obrazovanje:

1998.-2005.	Osnovna škola Vladimira Nazora, Đakovo
2005.-2009.	Gimnazija A. G. Matoša, Đakovo
2009.-2017.	Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije (kemije i biologije) - smijer nastavnički, Prirodoslovno- matematički fakultet, Zagreb

Radna iskustva:

Rad u prodaji i uređenju internet stranice, Studentski centar, Zagreb

Znanja i vještine:

Znanje engleskog jezika, rad na računalu (MS Office, GIMP), B kategora vozačke dozvole

Dodatne informacije:

- Diplomski rad pod nazivom Učinak dušika na fotosintezu i pigmente u lišaja *Evernia prunastri* rađen na Botaničkom zavodu Prirodoslovno- matematičkog fakulteta u Zagrebu
- Odrađena metodička praksa nastave biologije u V. Gimnaziji u Zagrebu
- Odrađena metodička praksa nastave kemije u Osnovnoj školi Gustava Krkleca u Zagrebu
- Višegodišnje sudjelovanje na manifestaciji „Noć biologije“ koja se održava na biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu
- Iskustvo terenskog rada na području Istre, Kvarnera i Gorskog kotra kao i okolice Zagreba u sklopu obaveznih ili izbornih kolegija tijekom studija
- Odslušan izborni kolegiji: Malakologija, Osnove zaštite prirode i okoliša, Metodika rada s učenicima s posebnim potrebama, Ekologija ptica u nastavi biologije, Prva pomoć, Povijest i filozofija kemije, Izvannastavne aktivnosti u biologiji, Primijenjena botanika, Kemija okoliša te Morfologija vaskularinh biljaka u sklopu koje je terenski rad na području Parka Maksimir i Botaničkog vrta u Zagrebu

Posebni ineresi:

Izrada entomološke zbirke, izrada herbarija, putovanje svijetom, čitanje knjiga