Procjena fitotoksičnosti bakra biotestom s dvije vrste vodenih leća (Lemna minor L. i L. trisulca L.)

Puhelek, Nina

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:217:218604

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Nina Puhelek

Procjena fitotoksičnosti bakra biotestom s dvije vrste vodenih leća

(*Lemna minor* L. i *L. trisulca* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za Fiziologiju bilja u Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željke Vidaković-Cifrek. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

Zahvala

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek, koja mi je omogućila izradu ovog rada. Hvala joj za uloženi trud, izdvojeno vrijeme i veliko strpljenje. Brojnim savjetima učinila je ovaj rad kvalitetnijim.

Veliko hvala i dr. sc. Mariji Babić s kojom sam prošla sve razine eksperimentalnog dijela rada. Hvala joj na ugodnim, zanimljivim i životnim pričama, ali i na hvale vrijednim savjetima.

Zahvaljujem se i svim djelatnicima Laboratorija za Fiziologiju bilja na susretljivosti i uvijek nasmijanim licima.

Najveću hvalu upućujem svojim roditeljima koji su vjerovali u moj uspjeh više od mene same. Hvala im na podršci i velikom strpljenju te pruženoj ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno–matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Procjena fitotoksičnosti bakra biotestom s dvije vrste vodenih leća (*Lemna minor* L. i *L. trisulca* L.)

Nina Puhelek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Lemna minor i *L. trisulca* uzgajane su u zasebnim kulturama te u miješanoj kulturi koja je sadržavala obje vrste. Procijenila sam učinak bakra (5 μmol dm^{-3}) na rast i nekoliko fizioloških pokazatelja te usporedila učinak na biljke u pojedinačnim i miješanim kulturama. Bakar nije uzrokovao značajnu promjenu rasta (izraženu kao porast broja biljaka) u vrste *L. trisulca*, ali je na *L. minor* djelovao inhibitorno. Nisam utvrdila razliku u odgovoru biljaka u pojedinačnim i miješanim kulturama. Tretman bakrom nije utjecao na udio topivih proteina, ali je povećao aktivnost peroksidaze u obje vrste biljaka. Vrijednosti tih dvaju parametara nisu se značajno razlikovale u pojedinačnih i miješanih kultura. Bakar nije utjecao na promjenu udjela fotosintetskih pigmenata u vrste *L. trisulca*, ali je kod *L. minor* uzrokovao povećanje udjela klorofila *a* i karotenoida u miješanim kulturama. Smanjio je optimalni prinos fotosistema II (PSII) te vrijednost nefotokemijskog gašenja u vrste *L. trisulca*, osobito u pojedinačnoj kulturi. U vrste *L. minor* nisam uočila značajan utjecaj bakra na učinkovitost fotosinteze, a nije bilo niti razlike između biljaka u miješanim i pojedinačnim kulturama. Na temelju dobivenih rezultata mogu zaključiti da se odgovor dviju biljnih vrsta na bakar u pojedinačnim kulturama ne razlikuje od odgovora u miješanoj kulturi. Međutim, u kontrolnim kulturama rast vrste *L. minor* bio je veći u pojedinačnoj kulturi.

(53 stranice, 17 slika, 3 tablice, 79 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: vodena leća, *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L., bakar, interakcija, rast, fotosinteza

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Izv. prof. dr. sc. Ines Radanović

Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 07. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagrebu

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Assessment of copper phytotoxicity by bioassay with two duckweed species (*Lemna minor* L. i *L. trisulca* L.)

Nina Puhelek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Lemna minor and *L. trisulca* were cultivated in single and mixed culture (conteining both duckweed species). Plant growth and several physiological responses to copper (5 μmol dm^{-3}) in both culture types were evaluated. Copper did not show significant effect on growth (based on frond number) of *L. trisulca*, but it inhibited growth of *L. minor*. However, there was no difference in growth of duckweed species in single and mixed cultures. Copper treatment did not cause changes in soluble proteins content, but it increased peroxidase activity in both species. There were no significant differences in these two parameters in single and mixed cultures. Copper did not affect photosynthetic pigments content in *L. trisulca*, but in *L. minor* it increased chlorophyll *a* and carotenoid content in mixed cultures. Maximum quantum yield of photosystem II (PSII) and nonphotochemical quenching of *L. trisulca* were decreased, especially in single culture. No significant effect of copper on photosynthetic efficiency of *L. minor* was noticed and also there was no differences between plants in mixed and single cultures. Based on obtained results, it could be concluded that the response of two species on copper in single cultures was not different from response in mixed culture. However, growth of *L. minor* in control cultures was greater in single cultures in comparison to mixed culture.

(53 pages, 17 figures, 3 tables, 79 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: duckweed, *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L., copper, interaction, growth, photosyntesis

Supervisor: Željka Vidaković-Cifrek

Reviewers: Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof

Dr. Vesna Petrović Peroković , Assoc. Prof.

Thesis accepted: September 07, 2017

SADRŽAJ:

1 Uvod **1**

1.1 Vodene leće 1

1.2 Lemna-test 3

1.3 Prisutnost bakra u okolišu i njegov učinak na biljke 4

1.4 Fotosinteza 7

2 Cilj **10**

3 Materijal i metode **11**

3.1 Lemna-test 11

3.1.1 Biljni materijal 11

3.1.2 Hranjive podloge 11

3.1.3 Izvedba Lemna-testa 13

3.1.4 Pokazatelji učinka bakra u Lemna-testu 14

3.1.4.1 Određivanje prirasta broja biljaka 14

3.1.4.2 Određivanje prirasta mase biljaka 15

3.1.4.3 Određivanje topivih proteina i mjerenja aktivnosti peroksidaze 15

3.1.4.4 Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata 17

3.1.5 Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa 18

3.2 Usporedba rezultata i korištene oznake 21

3.3 Statistička obrada podataka 22

4 Rezultati **23**

4.1 Učinak bakra na pojedinačne i miješane kulture vodenih leća *Lemna minor* L. i *L. trisulca* L. 23

4.1.1 Izgled biljaka 23

4.1.2 Prirast broja biljaka 24

4.1.3 Prirast mase svježe tvari biljaka 26

4.1.4 Udio suhe tvari 28

4.1.5 Udio topivih proteina 29

4.1.6 Specifična aktivnost gvajakol peroksidaze 30

4.1.7 Udio fotosintetskih pigmenata 31

4.1.7.1 Udio klorofila *a* 31

4.1.7.2 Udio klorofila *b* 32

4.1.7.3 Udio karotenoida 32

4.2 Učinkovitost fotosinteze 33

4.2.1 Optimalni prinos PSII 33

4.2.2 Efektivni prinos PSII 35

4.2.3 Stopa prijenosa elektrona 36

4.2.4 Fotokemijsko gašenje 37

4.2.5 Nefotokemijsko gašenje 38

5 Rasprava 39

6 Zaključak 45

7 Literatura 46

8 Životopis 53

1. UVOD

1.1. Vodene leće

Vodene leće male su vodene biljke iz porodice *Lemnaceae*. Ova kozmopolitska porodica jednosupnica obuhvaća pet rodova: *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* i *Wolffiella* (Appenroth i sur. 2013, Sovjenya i sur 2016). Nalazimo ih u slobodno plutajućem obliku ili, rjeđe, neposredno ispod površine vode, npr. *L. trisulca*. Često tvore kolonije. Ovisno o vrsti, veličina biljaka varira između 1 – 60 mm^2 (Landolt i Kandeler 1987). Građa tijela nije diferencirana u korijen, izdanak i listove kao u većine biljaka već ima izgled produljenog lističa. Širi dio tijela, distalni, odgovara listu, dok uži, proksimalni dio odgovara reduciranoj osi izdanka. Biljke roda *Lemna* iz svog proksimalnog dijela razvijaju jedan korjenčić duljine do pet centimetara. Njegova je uloga održavanje biljke u horizontalnom položaju. Na proksimalnom dijelu tijela sa svake se strane nalazi po jedna struktura s meristemskom regijom („reproduktivni džep“) unutar koje počinje razmnožavanje. Razmnožavanje je najčešće vegetativno, pupanjem. Novonastale biljke kćeri odvajaju se, ovisno o vrsti, nakon nekog vremena od majčinske biljke. Cvatu rijetko i samo u optimalnim uvjetima (Krajnčič i Devidé 1980) što za posljedicu ima prestanak vegetativnog razmnožavanja biljke.

Jednostavna građa biljaka, malih, ali okom vidljivih dimenzija, brz i pretežno vegetativni način razmnožavanja (čime nastaju genetski jednaki klonovi) te osjetljivost na prisutnost različitih tvari u hranidbenoj podlozi svojstva su koja čine vodene leće pogodnim organizmima za izvođenje biotestova. Također, budući da za uzgoj i izvođenje pokusa nije potreban veliki prostor vodene leće su pogodne biljke za rad u laboratoriju. Osim što su dobri bioindikatori i testni organizmi u ekotoksikologiji, biljke roda *Lemna* imaju veliki kapacitet bioakumulacije nekih toksičnih tvari što ih čini pogodnim za primjenu u tehnologijama pročišćavanja vodenih staništa (Mkandawire i Dudel 2005, Babić i sur. 2009, Radić i sur. 2010).

U istraživanjima fiziologije biljaka, laboratorijskim testovima te u ekotoksikološkim istraživanjima i biomonitoringu okoliša mogu se koristiti sve vrste iz porodice *Lemnaceae*. Najčešće korištena vrsta je *L. minor* (Wang 1986 i 1987, Naumann i sur. 2006, Khellaf i

Zerdaoui 2010), ali postoje radovi u kojima su korištene i vrste *L. gibba* (Sazmasz i Obek 2009)*, L. trisulca* (Prasad i sur. 2001), *Spirodela polyrhiza* (Rahman i sur. 2007).

Lemna minor L. (Slika 1a), mala vodena leća, plutajuća je vrsta ovalnih listova duljine 2-5 mm, širine do 5 mm. *Lemna trisulca* L. (Slika 1b), podvodna vodena leća, submerzna je vrsta duguljastih kopljastih listova do 5-15 mm duljine (Nikolić 2013, Landolt 1986). Boja biljaka povezana je s rasporedom kloroplasta i zračnih prostora (aerenhima). Listovi vrste *L. minor* sadrže puno kloroplasta u gornjem sloju tkiva što za rezultat ima tamnozelenu boju listova. Za razliku od *L. minor*, listovi vrste *L. trisulca* tanji su, svjetliji i često prozirni zbog manjeg broja kloroplasta. Zračni prostori kod vrste *L. minor* prisutni su gotovo na cijelom distalnom području lista te u bazalnom dijelu lista, dok kod vrste *L. trisulca* u bazalnom dijelu lista nema prisutnih zračnih prostora (Landolt 1986). Ovisno o hranjivoj podlozi, vrijeme udvostručenja broja biljaka vrste *L. minor* iznosi 1,3 – 2.8 dana (Wang 1987a), a kod *L. trisulca* 1,6 – 2,4 dana u kontroliranim uvjetima (Huebert i Shay 1993). Razlika između ove dvije vrste prisutna je i kod odvajanja majčinske biljke i biljaka kćeri. Zbog bržeg odvajanja biljaka kćeri od majčinske biljke, biljke vrste *L. minor* tvore male kolonije. Kod podvodne leće *L. trisulca* protekne više vremena do odvajanje biljaka kćeri od majčinske pa ta vrsta tvori dugačke kolonije često u obliku razgranatih lanaca (Landolt 1986).



(a)



(b)

Slika 1. (a) Mala vodena leća *Lemna minor* L (preuzeto sa: http://www.fungoceva.it/erbe_ceb/lemma_minor.htm) **(b)** Podvodna leća *Lemna trisulca* L. (preuzeto sa: http://www.atlas-roslin.pl/htm/bg/bg-Lemna_trisulca.htm)

1.2. Lemna-test

Tvari koje imaju nepoželjan učinak na rast i razvoj biljaka mogu biti prisutne u okolišu kao posljedica prirodnih procesa ili uslijed djelovanja čovjeka. Zagađenja okoliša uzrokovana ljudskom djelatnošću brojnija su od prisutnosti potencijalno toksičnih tvari koje se oslobađaju prirodnim procesima (Petelet i sur. 2009). Vulkanska aktivnost, erozija tla, termalni izvori, kiselija tla te tla u blizini mora primjeri su područja na kojima je prisutna povećana količina tvari koje negativno utječu na rast i razvoj većine biljaka, no biljke tih područja razvile su specifične prilagodbe koje im omogućuju preživljavanje. Rudarstvo, poljoprivreda i industrija te različite nepredvidive nezgode poput izlijevanja opasnog otpada prilikom transporta, glavni su antropogeni izvori zagađenja (Hans i sur. 1999, Holt 2000). Iako je nadzor pri upotrebi i odlaganju toksičnih tvari u svijetu sve stroži (Defra 2010, European Commission 2000, European Union 2005, LAWA 2003, U.S. Environmental Protection Agency 2009), one se i dalje mogu naći u okolišu. Često su to posljedice nezgoda, ali i nesavjesnog ljudskog djelovanja (npr. formiranja divljih odlagališta i sl.). Kako bi se procijenilo moguće djelovanje neke toksične supstance na organizme u okolišu, provode se različiti toksikološki biotestovi. Biotestovi su postupci u kojima se djelovanje tvari (npr. neke kemikalije) procjenjuje na temelju učinka na testni organizam. Tijekom biotesta se osjetljivi testni organizmi, tkiva ili stanice izlažu određenim koncentracijama testiranih tvari tijekom određenog vremena nakon čega se mjere pokazatelji (npr. rast ili neki drugi fiziološki ili biokemijski odgovor) na temelju kojih se procjenjuje učinak testirane tvari. Kao testni organizmi često se koriste bakterije, jednostanične alge, maleni vodeni beskralješnjaci te biljke.

Biljni biotestovi vrlo su važni u detekciji onečišćenja okoliša, kao i za uspostavljanje nadzornih sustava u okolišu (Maluszynska i Juchimiuk 2005) i već su niz godina uključeni u skupine testova koji se provode u cilju procjene djelovanja različitih tvari. Lemna test je jedan od biljnih biotestova koji se često primjenjuje za određivanje biološke aktivnosti te za procjenu toksičnosti pojedinih kemikalija (Hillman 1961, Landolt 1986, citirano u Vidaković – Cifrek 1999). Biljke roda *Lemna* su zbog plutajućeg načina života cijelom donjom površinom tijela u izravnom kontaktu s hranjivom podlogom, time ujedno i s prisutnim kemikalijama. Građa koja im omogućuje visoku osjetljivost na prisutne toksikante te veliki kapacitet bioakumulacije čini biljke roda *Lemna* reprezentativnim primjerima vaskularnih biljaka koje

su osjetljive na tvari poput toksičnih metala, organometalnih spojeva te različitih radioaktivnih (Bovet i sur. 2000) i organskih spojeva poput proizvoda farmaceutske industrije (Brain i sur. 2006, citirano u Mkandawire i sur. 2014). Biljke roda *Lemna* podnose širok raspon pH-vrijednosti, od 5 do 8 (Landolt 1986), a ako se koriste vrste koje plutaju na vodi, Lemna-test je primjenjiv za određivanje učinka obojenih i mutnih otopina (Scherr i sur. 2008).

Pokazatelji toksičnosti tvari koje se mogu pratiti Lemna-testom su preživljavanje biljaka, prirast broja biljaka, prirast mase svježe i suhe tvari, ukupna površina biljaka, odnos površine biljaka i mase svježe tvari, duljina korjenčića, koncentracija fotosintetskih pigmenata, stopa disanja, fotosintetska aktivnost i ultrastrukturne promjene (Lichtenthaler 1987, Hillman 1961, Smith i Kwan 1989, Wang 1990, Severi 1991 citirani u Vidaković–Cifrek 1999, Vidaković–Cifrek i sur. 2001, Severi 2001, ISO/CD 20079 2004).

U prirodnim uvjetima su u okolišu prisutne brojne biljne i životinjske vrste koje su često u međusobnoj interakciji. Lemna-test, kao i većina biotestova, izvodi se u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i to uglavnom na takav način da je u testu prisutna samo jedna vrsta organizama. Ukoliko je cilj provođenja biotesta procjena potencijalnog učinka testirane tvari na organizme u prirodnom okolišu, prisutnost više od jednog organizma u pojedinom biotestu mogla bi predstavljati prednost, jer bi u takvim testovima barem u određenoj mjeri bila prisutna međudjelovanja organizama, slično kao u prirodnim uvjetima. U literaturi postoje podaci o biotestovima u kojima se istražila interakcija dviju biljnih ili životinjskih vrsta. Primjer takvog testa je međudjelovanje žarnjaka *Hydra oligactis* i planktonskog račića *Daphnia magna* (Taylor i sur. 1995) te alge *Chlorella pyrenoidesa* i vodene leće *Lemna perpusila* (Rowe i sur. 1982).

1.3. Prisutnost bakra u okolišu i njegov učinak na biljke

Bakar je esencijalan mikroelement za rast i razvoj biljaka, ali u prevelikoj količini izrazito je fitotoksičan. U biljci se pojavljuje u oksidacijskim stanjima Cu^{+} i Cu^{2+}. Sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima: strukturni je element regulacijskih proteina, sudjeluje u

prijenosu elektrona u fotosintezi, staničnom disanju, metabolizmu stanične stijenke i hormonskoj regulaciji te u odgovoru na oksidacijski stres. Njegovi ioni su kofaktori brojnih enzima poput oksidaza. Također ima značajnu ulogu i u prijenosu signala u stanici te u mobilizaciji željeza (Yruela 2005).

Koncentracija bakra u otopini tla potrebna za optimalan rast biljaka kreće se u rasponu 1×10^{-3} µmol dm^{-3} do 1 µmol dm^{-3} (Welch 1995). Manjak bakra u biljnom organizmu uočava se prvo kao morfološka promjena na mladim listovima. Listovi mogu biti uvijeni ili nepravilni te pokazivati znakove kloroze ili čak nekroze (Marschner 1995). Uslijed nedostatka bakra uočena je smanjena stopa prijenosa elektrona u kloroplastima zbog smanjene sinteze plastocijanina, promjene strukture tilakoidnih membrana i PSII, smanjenje koncentracije pigmenata klorofila i karotenoida te nezasićenih C18 masnih kiselina (Baszynski i sur. 1978, Barón i sur. 1992, Yruela 2005).

Pri koncentracijama bakra koje su iznad optimalnih vrijednosti potrebnih za rast biljke, uočeno je da bakar inhibira rast i ometa važne stanične procese poput fotosinteze i disanja (Marschner 1995, Mazhoudi i sur. 1997, Prasad i Strzałka 1999). Rast biljaka u područjima s povećanom koncentracijom bakra u tlu praćen je smanjenom biomasom i klorozom listova, tj. smanjenjem koncentracije klorofila i izmijenjenom strukturom kloroplasta i sastava tilakoidnih membrana (Baszynski i sur. 1988, Quartacci i sur. 2000). Iako je zbog svojih redoks svojstava bakar esencijalan element, ona doprinose i njegovoj toksičnosti. Teški metali poput bakra uzrokuju nastanak oksidacijskog stresa u biljaka. Oksidacijski stres nastaje kao posljedica nemogućnosti održavanja ravnoteže između nastanka i uklanjanja reaktivnih oblika kisika (ROS) u organizmu (Varga 2015). ROS obuhvaćaju spojeve (npr. H_2O_2) i druge oblike (npr. superoksidni radikal i singletni kisik) s jednim ili više aktiviranih atoma kisika. U određenoj količini nastaju u stanici i u optimalnim uvjetima, tj. tijekom normalnog metabolizma. Međutim, u stresnim uvjetima ravnoteža između nastajanja i uklanjanja ROS je narušena (Apel i Hirt 2004). Promjena redoks oblika iona bakra (Cu^{2+} i Cu^{+}) uzrokuje nastajanje visoko toksičnih hidroksilnih radikala ($HO^{\cdot}$) u neenzimskoj kemijskoj reakciji između superoksida (O_2^{-}) i vodikova peroksida (H_2O_2). Hidroksilni radikali oštećuju molekulu DNA, masti, proteine i ostale biološke makromolekule (Halliwell i Gutteridge 1984) među kojima su i antioksidacijski enzimi (npr. enzim peroksidaza), te druge molekule antioksidansi čija je uloga ublažiti oksidacijski stres (Wang i

sur 2004). Oksidacijski stres regulatorni je proces, ravnoteža između oksidacijskih i antioksidacijskih kapaciteta o kojima ovisi sudbina biljke (Arora i sur. 2002). Kao čimbenik koji oštećuje stanice, oksidacijski stres pokreće signalne i obrambene reakcije (Demidchik, 2015). Pod utjecajem oksidacijskog stresa povećava se aktivnost enzima antioksidacijskog sustava (superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza, peroksidaza) te molekula antioksidansa poput askorbinske kiseline glutationa, β-karotena, vitamina E (Arora i sur. 2002, Razinger i sur. 2007). Peroksidaze su enzimi koji, osim uloge u antioksidacijskom sustavu, sudjeluju u regulaciji brojnih fizioloških procesa kao što su lignifikacija, suberinizacija, metabolizam stanične stijenke i metabolizam auksina (Mathé i sur. 2010). Peroksidaze (POX) kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije između vodikova peroksida (H_2O_2) i različitih reducensa (Varga 2015).

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{POX} H_2O + A$$

U laboratoriju, u uvjetima, *in vitro*, oksidacijom gvajakola u prisutnosti vodikova peroksida i gvajakol peroksidaze (GPOX) nastaje tetragvajakol, spoj žuto – smeđe boje. Ta reakcija se koristi za mjerenje aktivnosti peroksidaze u ekstraktima biljnih tkiva (Bradford 1976).

$$\text{Gvajakol} + H_2O_2 \xrightarrow{GPOX} \text{tetragvajakol} + H_2O$$

Osim mehanizmom antioksidacijskog odgovora, neke biljke, uključujući i vodene leće, na povišenu količinu bakra djeluju akumuliranjem bakra u vakuolu. Tim staničnim mehanizmom izbjegava se oštećenje stanica i omogućuje normalno funkcioniranje metabolizma (Yruela 2005). Vodene leće mogu akumulirati i neke druge vrste teških metala pa do određene koncentracije u hranjivom mediju ti metali nemaju štetni učinak na rast biljke (Khellaf i Zerdaoni 2010). Akumuliranje određene količine teških metala omogućuje biljci toleranciju na prisutnost istih a ona se može definirati kao sposobnost preživljavanja biljaka u tlima koja su toksična za druge biljke. Zabilježeno je da slobodnoplutajuće vrste vodenih leća (*L. gibba* i *S. polyrhiza*) primaju manje kadmija, bakra, olova i cinka od submerznih vrsta (Van der Werff i Pruyt 1982). Utjecaj bakra na vrstu *L. minor* dobro je istražen (Frankart i sur. 2002, Wiebke i sur. 2007, Cvjetko i sur. 2010, Vidaković-Cifrek i sur. 2015), a proveden je i manji broj istraživanja o njegovom utjecaju na vrstu *L. trisulca* (Prasad

i sur. 2001). Utvrđeno je da bakar u hranjivoj podlozi u vrste *L. minor* pri koncentraciji od 5 µmol dm^{-3} uzrokuje klorozu, smanjeni udio fotosintetskih pigmenata, smanjenu vrijednosti efektivnog prinosa PSII, oštećenje proteina i povećanu aktivnost antioksidacijskih enzima poput katalaze te je zabilježeno da pri koncentraciji od 12,1 µmol dm^{-3} uzrokuje redukciju rasta za čak 50 %. Vrsta *L. trisulca* mogla bi tolerirati koncentraciju od 10 µmol dm^{-3} bakra u hranjivoj podlozi bez značajnih promjena u koncentraciji fotosintetskih pigmenata, no koncentracija veća od 1 µmol dm^{-3} uzrokuje značajno smanjenje fluorescencije klorofila. Također, ima veliku sposobnost bioakumulacije i može akumulirati bakar iz hranjive podloge sve dok njegova koncentracija ne prelazi 50 µmol dm^{-3}.

1.4.Fotosinteza

Da bi se biološki procesi mogli uspješno odvijati, organizmima je potrebna energija. Sva energija koju koriste biološki sustavi potječe od Sunčeve energije „uhvaćene“ u procesu fotosinteze. Sunčeva energija pokretač je procesa u kojem se iz anorganskih tvari, ugljikova dioksida i vode, kao finalni proizvod dobivaju organski spojevi, ugljikohidrati koji su organizmima glavni izvor energije i prekursori za sintezu ostalih organskih spojeva. U procesu fotosinteze oslobađa se kisik, koji je također bitan za biološke procese.

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{svjetlosna\ energija} (CH_2O) + O_2$$

(CH_2O) - ugljikohidrat

Fotosinteza se odvija u kloroplastima. Sve stanice koje imaju kloroplaste mogu provoditi fotosintezu, no mezofil lista je zbog velikog broja kloroplasta tkivo koje ugljikohidratima kao proizvodima fotosinteze snabdijeva i druga biljna tkiva. Kloroplasti su organeli obavijeni dvostrukom membranom unutar koje se nalazi stroma i sustav tilakoida. Tilakoidne membrane odvajaju stromu od tilakoidnog prostora i sadrže molekule pigmenata potrebne za prijenos elektrona. Upravo se na njima odvijaju oksidacijsko- redukcijske reakcije u primarnim (fotokemijskim) reakcijama fotosinteze.

Pigmenti su tvari koje mogu apsorbirati svjetlosnu energiju. Fotosintetski pigmenti viših biljaka su klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi. U procesu fotosinteze sudjeluju u apsorpciji i

prijenosu energije, a klorofil *a* i u pretvorbi svjetlosne energije u kemijsku. Klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi imaju maksimume apsorpcije u crvenom i plavom dijelu svjetlosnog spektra, a reflektiraju zeleni dio spektra. Rezultat toga zelena je boja listova (Pevalek–Kozlina 2003). Maksimumi apsorpcije klorofila *a* nalaze se pri 430 i 662 nm, klorofila *b* pri 453 i 642 nm, a karotenoida između 380 i 550 nm

Molekule pigmenata dio su fotosistema u kojem razlikujemo središnji dio, tj. reakcijsko središte s klorofilom *a* te dio s antenskim molekulama (klorofil *b* i karotenoidi) smještenim oko reakcijskog središta. Antenske molekule apsorbiraju svjetlost te prenose energiju do reakcijskog središta. U tilakoidnim membranama nađena su dva fotosistema – fotosistem I (PSI) i fotosistem II (PSII) koji se razlikuju po apsorpcijskim maksimumima. Maksimum apsorpcije PSI je na 700 nm, a PSII na 680 nm.

Fotosinteza je proces sastavljen od dva stadija: svjetlosnih (primarnih) reakcija i Calvinova ciklusa (sekundarne reakcije). U primarnim reakcijama apsorpcija svjetlosne energije uzrokuje prijelaz molekule klorofila iz osnovnog u pobuđeno stanje. Izolirane molekule klorofila vrlo brzo se vraćaju u osnovno stanje, pri čemu se veliki postotak apsorbirane energije oslobađa kao toplina i svjetlost većih valnih duljina od pobudne (fluorescencija klorofila). No, u kloroplastima se na tilakoidnim membranama energija apsorbirane svjetlosti koristi za prijenos elektrona u lancu prijenosa elektrona, s molekule klorofila u reakcijskom središtu (kojoj se elektron nadoknađuje iz vode) preko nekoliko prenosioca, do $NADP^+$ koji kao konačni akceptor elektrona u lancu prijenosa elektrona prelazi u NADPH. U intaktnom kloroplastu se vrlo malo energije gubi u obliku topline i svjetlosti (fluorescencije). Tijekom prijenosa elektrona oslobađa se kisik te se uspostavlja protonski gradijent na tilakoidnoj membrani. Protonski gradijent pokreće sintezu molekule adenozin-trifosfata (ATP) iz molekule adenozin-difosfata (ADP) i anorganskog fosfata (P). Calvinov ciklus obuhvaća reakcije u kojima se, uz utrošak šest molekula NADPH (kao izvora elektrona) i devet molekula ATP–a (kao izvora energije), iz tri molekule ugljikova dioksida koje ulaze u ciklus sintetizira jedna molekula gliceraldehid-3-fosfata koji služi kao ishodišni spoj u sintezi glukoze, saharoze i drugih organskih spojeva (Pevalek–Kozlina 2003).

Za procjenu učinkovitosti fotosinteze koriste se metode mjerenja fluorescencije klorofila. Kao što je ranije rečeno fotosintetski pigmenti u antenama fotosistema apsorbiraju

svjetlosnu energiju te u optimalnim uvjetima čak 95% energije bude preneseno do reakcijskog središta, a ostatak se oslobađa u obliku topline i svjetlosti, tj. fluorescencije (Mohr i Schopfer 1995). Stoga svjetlost emitirana fluorescencijom, koja je crvene boje, predstavlja vrlo mali udio u zelenoj svjetlosti reflektiranoj s listova biljaka pa se može detektirati samo preciznim uređajima – fluorimetrima. Jedna od metoda kojom se mjeri fluorescencija klorofila metoda je saturacijskog pulsa u uvjetima *in vivo*. Mjerenja i analize fluorescencije klorofila postali su nezaobilazni u istraživanjima primarnih reakcija fotosinteze. Ova metoda razvijena je kako bi se zasebno mogli kvantificirati fotokemijski i nefotokemijski procesi gašenja fluorescencije u uvjetima kada je uzorak prilagođen na svjetlost. Fotokemijsko gašenje je odraz redoks stanja primarnog akceptora PSII, dok je nefotokemijsko gašenje odraz rasipanja energije u obliku topline. Fotokemijsko gašenje fluorescencije povezano je s redoks stanjem primarnog akceptora (tijekom prilagodbe na svjetlost, određeni dio reakcijskih središta može se ponovo „otvoriti“, tj. oksidirati), dok nefotokemijsko gašenje predstavlja reakcije koje nisu povezane s protokom elektrona (Toth 2006). Metoda saturacijskog pulsa ima široku primjenu u ekotoksikološkim istraživanjima te je korisna u kvantifikaciji oštećenja fotosintetskih sustava izazvanih stresom (Schreiber i sur. 1994, Rohacek 2002, Schreiber 2004, citirano u Mlinarić 2013).

Pri izvođenju metode saturacijskog pulsa list prilagođen uvjetima tame obasjava se crvenom svjetlosti niskog intenziteta, potom kratkotrajnim pulsom svjetlosti visokog intenziteta te na kraju opetovanim pulsovima aktiničnog bijelog svjetla. Iz podataka dobivenih mjerenjima izračunaju se optimalni i efektivni prinos fotosistema II, stopa prijenosa elektrona, fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje. Dobiveni podaci usporede se s uobičajenim vrijednostima na temelju kojih se procjenjuje učinak tretmana na biljku (Lichtenhaler 1987).

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinak bakra u hranjivoj podlozi na dvije vrste vodenih leća (*L. minor* i *L. trisulca*). Primijenit ću Lemna-test u kojem će te dvije vrste vodenih leća biti u miješanoj kulturi, tj. u jednoj Erlenmeyerovoj tikvici. Da bih utvrdila je li u odgovoru na učinak bakra prisutna i međusobna interakcija između dviju vrsta vodenih leća, istovremeno ću provesti i standardizirani Lemna-test kojim ću pratiti učinak bakra na svaku vrstu zasebno, u pojedinačnim kulturama.

Pokazatelji učinka bakra koje ću pratiti su stopa rasta biljaka na temelju promjene broja i mase biljaka te nekoliko fizioloških pokazatelja (koncentracija fotosintetskih pigmenata i proteina, aktivnost enzima gvajakol peroksidaze i učinkovitost fotosinteze metodom fluorescencije klorofila). Usporedbom rezultata dobivenih na vodenim lećama u pojedinačnim kulturama s rezultatom dobivenim na biljkama u miješanoj kulturi utvrdit ću je li u odgovor biljaka na učinak bakra uključena i međusobna interakcija tih dviju vrsta.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Lemna-test

Lemna-testom sam istražila učinak bakra na malu vodenu leću (*Lemna minor* L.) i na podvodnu vodenu leću (*Lemna trisulca* L.). Bakar je u hranjivu podlogu dodan u obliku bakrovog sulfata ($CuSO_4 \times 5H_2O$), a koncentracija bakra je bila 5 µmol dm^{-3}. Za istraživanje su pripremljene sljedeće kulture vodenih leća:

1. kultura vrste *Lemna minor* L.
2. kultura vrste *Lemna trisulca* L.
3. miješana kultura vrsta *Lemna minor* i *Lemna trisulca*

3.1.1. Biljni materijal

Vodene leće, *Lemna minor* L. i *Lemna trisulca* L. koje sam koristila u ovom istraživanju potječu iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 1995. godine biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnčiču i Devidéu (1980) i dalje uzgajane u sterilnim uvjetima u klima-komori.

3.1.2. Hranjive podloge

Biljke *Lemna minor* L. i *Lemna trisulca* L. održavaju se na modificiranoj hranjivoj podlozi po Piersonu i Seidlu (1950) u kontroliranim uvjetima u klima-komori (temperatura 24 ± 2 °C, osvjetljenje 50 µE m^{-2} s^{-1}, uvjeti dugog dana - 16 sati osvjetljenja, 8 sati tame). Sastav modificirane hranjive podloge po Piersonu i Seidlu prikazuje Tablica 1.

Za provođenje Lemna-testa koristila sam tekuću hranjivu podlogu po Steinbergu (1946) na koju su se biljke trebale aklimatizirati 14 dana što sam provela u dvije supkulture po 7 dana. Sastav te hranjive podloge prikazuje Tablica 2.

Tablica 1. Sastav modificirane hranjive podloge po Piersonu i Seidlu (1950)

Makroelementi	**mg dm^{-3}**
KNO_3	400,0
KH_2PO_4	200,0
$MgSO_4 \times 7\ H_20$	300,0
$CaCl_2 \times 2\ H_20$	804,0
Mikroelementi	**mg dm^{-3}**
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	0,3
H_3BO_3	0,5
Na_2-EDTA $\times 2\ H_2O$	18,6
Fe – citrat	5,0
Organski dodaci	**g dm^{-3}**
Saharoza	10,0
Asparagin	0,1

pH vrijednost: 4,55

Tablica 2. Sastav hranjive podloge po Steinbergu (1946)

Makroelementi	**mg dm^{-3}**
KNO_3	350,0
KH_2PO_4	90,0
K_2HPO_4	12,60
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	100,0
$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	295,0
Mikroelementi	**µg dm^{-3}**
H_3BO_3	120,0
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	180,0
$Na_2MoO_4 \times 4\ H_2O$	44,0
$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	180,0
$FeCl_3$	760,0
EDTA	1500,0

pH vrijednost: 5,5

Za održavanje vodene leće koristila sam tikvice volumena 300 mL koje su sadržavale 150 mL hranjive podloge. Ovisno o praćenom pokazatelju učinka u Lemna-testu, za pokuse sam koristila tikvice volumena 300 mL sa 150 mL hranjive podloge ili tikvice volumena 100 mL sa 60 mL hranjive podloge. Nakon ulijevanja hranjive podloge, tikvice sam začepila vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala autoklaviranjem na temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta.

Biljke sam presađivala u komori s horizontalnim strujanjem zraka (laminaru) te ih prenijela u klima komoru. Pokusi su trajali 7 dana u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja, uz rasvjetu fluorescentnih cijevi (50-60 µE m^{-2} s^{-1}) na temperaturi 24 ± 2 °C.

3.1.3. Izvedba Lemna-testa

Kako bih procijenila učinak bakra na vodene leće, u hranjivu podlogu dodala sam određenu količinu bakrova(II) sulfata ($CuSO_4 \times 5H_2O$) potrebnu da bi njegova koncentracija iznosila 5 µmol dm^{-3}. Kao kontrolu koristila sam Steinbergovu podlogu (Tablica 2) bez dodane

soli bakra. Bakar sam dodala u hranjivu podlogu prije autoklaviranja koje je izvršeno u već ranije spomenutim uvjetima.

Sterilizirane i ohlađene podloge inokulirala sam s određenim brojem biljaka. Kao što je ranije napomenuto, te su biljke prethodno aklimatizirane na podlogu po Steinbergu u trajanju od 14 dana. Biljke su sedam dana kultivirane u klima-komori u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja (50 - 60 µE m^{-2} s^{-1}).

Za određivanje stope rasta biljaka te za određivanje fluorescencije klorofila nasadila sam 10-ak biljaka u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL koje su sadržavale 60 mL hranjive podloge. Za određivanje koncentracije pigmenata i proteina nasadila sam 25 biljaka u Erlenmeyerove tikvice od 300 mL koje su sadržavale 150 mL hranjive podloge. U miješanim kulturama broj biljaka svake vrste, *L. minor* i *L. trisulca,* bio je jednak kao i u tikvicama sa samo jednom vrstom. Kulture tretirane bakrom, kao i njihove kontrole, za određivanje stope rasta pripremljene su u 8 replika. Za određivanje koncentracije pigmenata i proteina pripremila sam šest, a za fluorescenciju klorofila četiri replike.

3.1.4. Pokazatelji učinka bakra u Lemna-testu

Učinak bakra određivala sam na temelju sljedećih pokazatelja:

1. prirast broja biljaka
2. prirast mase svježe tvari
3. omjer mase suhe i svježe tvari
4. koncentracija fotosintetskih pigmenata
5. koncentracija proteina
6. aktivnost enzima gvajakol peroksidaze

3.1.4.1 Određivanje prirasta broja biljaka

Prirast broja biljaka (stopu rasta) odredila sam brojanjem biljaka tijekom tjedan dana, sljedećih dana: 0 (postavljanje pokusa), 3., 4., 5., 6. i 7. Pri tome je brojana svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom.

Stopu rasta izračunala sam prema preporuci u ISO standardu (ISO/CD 20079):

$$GR_n = \frac{ln(N_n) - ln(N_0)}{n}$$

N_0 – broj biljaka nultog dana pokusa

N_n– broj biljaka *n*-tog dana pokusa

n = 0, 3, 4, 5, 6 i 7

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost prirasta broja biljaka po danu ± standardna pogreška.

3.1.4.2. Određivanje prirasta mase biljaka

Masu svježih biljaka odredila sam u sterilnim uvjetima vaganjem biljaka prije samog nasađivanja na hranjivu podlogu (nulti dan) te na kraju pokusa (7. dan). Masu suhe tvari odredila sam nakon sušenja biljaka na kraju pokusa pri temperaturi od 80 °C. Iz dobivenih podataka odredila sam prirast mase biljaka te omjer masa suhe i svježe tvari prema preporuci u ISO standardu (ISO/CD 20079):

$$Prirast\ mase\ svježe\ tvari = \frac{ln(FW') - ln(FW)}{7}$$

$$Omjer\ mase\ suhe\ i\ svježe\ tvari = \frac{DW}{FW'}$$

FW – masa svježe tvari prvog dana pokusa

FW' – masa svježe tvari zadnjeg dana pokusa

DW – masa suhe tvari

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška.

3.1.4.3. Određivanje topivih proteina i mjerenje aktivnosti peroksidaze

Nakon sedmog dana pokusa, određenu količinu biljnog tkiva (≈50 mg) homogenirala sam u hladnom tarioniku uz dodatak 1 mL ohlađenog pufera - kalijeva fosfata (pH 7,0; c = 50 × 10^{-3} mol dm^{-3}) uz dodatak 1 mL EDTA (c = 0,1 × 10^{-3} mol dm^{-3}) i polivinilpolipirolidona (PVPP) te zatim centrifugirala u bezbojnim ependorf epruvetama 30 minuta pri 25000 *g* i temperaturi +4 °C u rotoru visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18). Dio dobivenog

supernatanta koristila sam za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti enzima.

a) Određivanje udjela topivih proteina

Metoda Bradforda (1976) temelji se na mjerenju apsorbancije pri 595 nm smjese proteinskog ekstrakta i reagensa čiji je glavni sastojak boja Comassie Brilliant Blue G-250. Radna otopina po Bradfordu priprema se iz matične otopine (Tablica 3).

U 1 mL radne otopine po Bradfordu u ependorf epruveti dodala sam 50 µL uzorka proteinskog ekstrakta. Uzorke sam potom promućkala na mućkalici i inkubirala 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam izmjerila apsorbanciju uzoraka pri valnoj duljini od 595 nm koristeći UV/VIS spektrofotometar Specord (Analytik Jena, Njemačka). Koncentraciju proteina u uzorcima odredila sam izračunavanjem iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopine albumina iz goveđeg seruma poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg mL). Dobivene rezultate izrazila sam kao mg proteina po gramu svježe mase biljaka.

Tablica 3. Sastav matične i radne otopine po Bradfordu (1976)

Matična otopina	**Radna otopina**
100 mL etanola (*w* = 0,96)	15 mL etanola (*w* = 0,96)
200 mL H_3PO_4 (*w* = 0,88)	30 mL H_3PO_4 (*w* = 0,88)
350 mg Comassie Brillant Blue G 250	30 mL Bradford matične otopine
450 mL H_2O	

b) Određivanje aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze

Ukupnu aktivnost gvajakol peroksidaze odredila sam spektrofotometrijski. Reakcijska smjesa koju sam koristila sadržavala je 50 mmol dm^{-3} pufera kalijeva fosfata (K_2HPO_4/KH_2PO_4), pH vrijednosti 7 te 18 mmol dm^{-3} gvajakola ($C_7H_8O_2$) i 5 mmol dm^{-3} vodikova peroksida (H_2O_2). Proteinski ekstrakt (50 µL) dodala sam u 950 µL reakcijske smjese. Porast apsorbancije mjerila sam svakih 10 sekundi tijekom 100 sekundi pri valnoj duljini od 470 nm koristeći spektrofotometar Specord (Analytik Jena, Njemačka). Za slijepu probu sam umjesto ekstrakta biljnog tkiva koristila ranije spomenuti fosfatni pufer korišten za homogeniranje biljnog tkiva u postupku ekstrakcije proteina (Chance i Maehly 1955).

Aktivnost enzima izrazila sam kao količinu nastalog tetragvajakola. Rezultate sam izrazila kao µmol u minuti po gramu svježe tvari (µmol min^{-1} g^{-1}).

$$aktivnost = \frac{\Delta A_{470} \times f \times V_{rs}}{V_{uz} \times m \times \varepsilon \times l}$$

ΔA -srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 sekundi

f -faktor kojim se množi da bi se rezultat mogao izraziti po minuti (6)

V_{rs} -ukupan volumen reakcijske smjese

V_{uz} -volumen dodanog uzorka

ε - molarni apsorpcijski koeficijent tetragvajakola (26,6 dm^3 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

l - duljina optičkog puta = 1 cm

Na temelju aktivnosti peroksidaze i koncentracije proteina, odredila sam specifičnu aktivnost peroksidaze. Rezultate sam izrazila kao µmol u minuti po miligramu proteina (µmol min^{-1} mg^{-1}).

$$spec.aktivnost\ peroksidaze = \frac{akt.peroksidaze\ (\mu mol\ min^{-1}\ g^{-1})}{konc.proteina\ (mg\ g^{-1})}$$

3.1.4.4. Određivanje udjela fotosintetskih pigmenata

Nakon sedmog dana pokusa, određenu količinu biljnog tkiva (≈25 mg) homogenirala sam u hladnom tarioniku uz dodatak hladnog acetona (*w*= 80%) i kalcijeva karbonata. Uzorke sam centrifugirala deset minuta u smeđim ependorf epruvetama pri 5000 *g* u rotoru visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) na +4 °C. Supernatant sam prelila u nove ependorf epruvete, dopunila acetonom do 1,5 mL te izmjerila apsorbanciju koristeći UV/VIS spektrofotmetar Specord (Analytik Jena, Njemačka) pri valnim duljinama apsorpcijskih maksimuma klorofila i karotenoida (470, 646, 663 nm). Udio fotosintetskih pigmenata izražen je kao mg pigmenta po gramu svježe tvari (mg g^{-1}) (Lichtenthaler1987).

Formule korištene za izračunavanje koncentracije fotosintetskih pigmenata u ekstraktima:

koncentracija klorofila *a* $c_a = 12.25A_{662} - 2.04A_{645} \frac{[\mu g]}{[mL]}$

koncentracija klorofila *b* $c_b = 21.50A_{645} - 5.10A_{662} \frac{[\mu g]}{[mL]}$

koncentracija karotenoida $c_k = \frac{1000A_{470} - 1.82c_a - 85.02c_b}{198} \frac{[\mu g]}{[mL]}$

Dobivene koncentracije pigmenata uvrstila sam u sljedeću formulu da bih rezultate izrazila kao mg pigmenta po gramu svježe tvari (mg/$g_{sv.t.}$).

$$udio\ pigmenata = \frac{c_{pig} \times V_{uk}}{1000 \times m} \frac{[mg]}{[g_{sv.t.}]}$$

c_x – koncentracija pigmenata

A_x – apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V – volumen uzorka (mL)

l – duljina optičkog puta = 1 cm

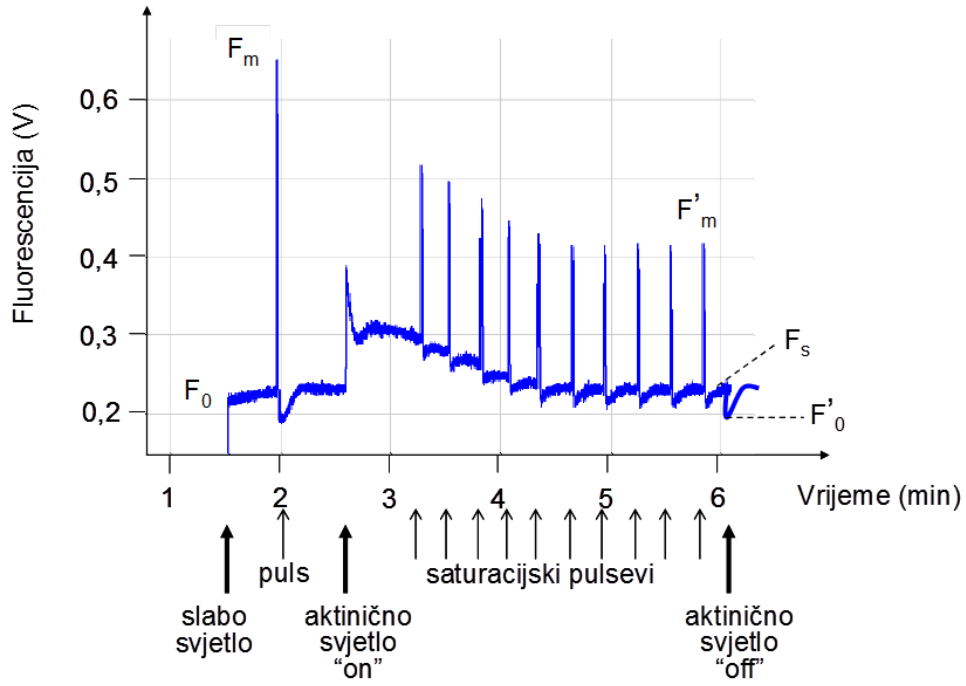
m – masa uzorka

3.1.5.Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa u uvjetima *in vivo*

Fluorescenciju klorofila metodom saturacijskog pulsa (Maxwell i Johnson 2000) mjerila sam Quibit sustavom (Kingston, Canada). Rezultati mjerenja (Slika 2) se bilježe i obrađuju u programu Logger Pro 3.2. Prije samog mjerenja biljke sam stavila 30 minuta u tamu.

Šest biljaka *L. trisulca* ili 10 do 12 biljaka *L. minor* stavila sam na nosač uzorka na navlaženi filter papir. Biljke sam obasjala crvenom svjetlošću niskog intenziteta (1-3 µmol m^{-2} s^{-1}), nedovoljnog intenziteta za pokretanje fotokemijske reakcije. U tim uvjetima mjerila sam minimalnu razinu fluorescencije klorofila (F_0). Nakon toga sam primijenila jednokratni saturacijski puls, tj. kratkotrajnu svjetlost visokog intenziteta (≈ 3600 µmol m^{-2} s^{-1}) koja uzrokuje redukciju svih akceptora elektrona u fotosistemu II (PSII) i rezultira maksimalnom vrijednošću fluorescencije (F_m).

Zatim sam uključila kontinuiranu bijelu svjetlost (aktiničko svjetlo) dovoljne jakosti za pokretanje procesa fotosinteze. Intenzitet svjetla kod vrste *L. minor* bio je između 52 i 55 µmol m^{-2} s^{-1}, dok je kod vrste *L. trisulca* bio između 42 i 43 µmol m^{-2} s^{-1}. Nakon što se signal ustalio, uključila sam automatsku kontrolu saturacijskih pulseva (≈ 3600 µmol m^{-2} s^{-1}, υ ≈ 40 s^{-1}) pri čemu se bilježe vrijednosti maksimalne fluorescencije (F'_m) te fluorescencije ravnotežnog stanja (F_s) u listu prilagođenome na uvjete svjetla. Kada su se vrijednosti ponovno ustalile, ugasila sam aktiničko svjetlo. Biljka je na taj način kratko vrijeme ostala osvjetljena crvenom svjetlošću niskog intenziteta iz čega sam očitala minimalnu vrijednost fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete svjetla (F'_0). Iz podataka dobivenih mjerenjima izračunala sam pokazatelje učinkovitosti PSII: optimalni i efektivni prinos PSII, stopu prijenosa elektrona te fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje.



Slika 2. Mjerenje fluorescencije klorofila metodom saturacijskog pulsa

a) Optimalni prinos PSII (maksimalna učinkovitost PSII)

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

F_0 - minimalna fluorescencija

F_m - maksimalna fluorescencija

F_v - varijabilna fluorescencija

Varijabilna fluorescencija (F_v) razlika je maksimalne i minimalne fluorescencije. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete tame mjera je optimalnog prinosa PSII, tj. njegove učinkovitosti kada su svi reakcijski centri oksidirani.

b) Efektivni prinos PSII *($\Delta F / F'_m$)*

$$\Delta F/F'_m = (F'_m - F_s)/F'_m$$

$\Delta F / F'_m$ – efektivni prinos PSII
F'_m - maksimalna fluorescencija biljke prilagođene na svjetlo
F_s - fluorescencija ravnotežnog stanja

Efektivni prinos PSII mjera je udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama.

c) Stopa prijenosa elektrona *(„electron transport rate“, ETR)*

$$ETR = (\Delta F/F'_m) \times PFD \times 0.5$$

ETR - stopa prijenosa elektrona
PFD - intenzitet svjetlosti

Budući da *$\Delta F / F'_m$* predstavlja efektivni prinos fotokemijske reakcije na PSII, ta se vrijednost može koristiti za izračun stope necikličkog prijenosa elektrona. PFD („photon flux density”) je intenzitet apsorbirane svjetlosti (µmol fotona m^{-2} s^{-1}). Faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o podjednakoj ekscitaciji PSI i PSII.

d) Fotokemijsko gašenje (*qP*)

$$qP = (F'_m - F_s)/(F'_m - F'_0)$$

qP - fotokemijsko gašenje

F'_0 - minimalna fluorescencija biljke prilagođene na svjetlost

Fotokemijsko gašenje (*qP*) je mjera koja govori o redoks-stanju primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona). Pokazatelj je udjela oksidiranih reakcijskih centara na PSII.

e) Nefotokemijsko gašenje *(NPQ)*

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

Nefotokemijsko gašenje *(NPQ)* je mjera koja govori koliko se energije gubi u obliku topline, a povezano je s promjenom pH vrijednosti lumena tilakoida.

3.2. Usporedba rezultata i korištene oznake

Kao što je ranije navedeno, učinak bakra pratila sam u pojedinačnim kulturama, tj. u kulturama sa samo jednom vrstom vodene leće (*L. minor* ili *L. trisulca*), te u miješanoj kulturi u kojoj su se obje vrste vodenih leća (*Lemna minor* i *L. trisulca*) nalazile zajedno. Rezultate mjerenja svakog pojedinog pokazatelja učinka bakra izrazila sam tako da sam rezultate dobivene na kontrolnim i bakru izloženim biljkama posebno uspoređivala za vrstu *L. minor*, a posebno za vrstu *L. trisulca*. Oznake Cu-M za vrstu *L. minor* i Cu-T za vrstu *L. trisulca* označavaju pojedinačne kulture vodenih leća koje su bile izložene djelovanju bakra. Njihove kontrole (kulture bez dodane soli bakra u hranjivu podlogu) označene su oznakama 0-M za vrstu *L. minor* i 0-T za vrstu *L. trisulca*. U miješanoj kulturi pokazatelje učinka bakra posebno sam određivala na vrsti *L. minor* i posebno na vrsti *L. trisulca*. U prikazu rezultata oznaka Cu - M-(M+T) označava rezultate dobivene analizom vrste *L. minor*, a Cu-T-(M+T) rezultate

dobivene na vrsti *L. trisulca* iz miješane kulture koja je bila izložena djelovanju bakra. Njihove kontrole označene su oznakom 0-M-(M+T) za vrstu *L. minor* i 0-T-(M+T) za vrstu *L. trisulca*.

3.3. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u računalnom programu STATISTICA 13.1 (Stat Soft Inc., SAD). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Dobivene rezultate usporedila sam analizom varijance (one-way ANOVA) i Newman-Keuls testom. Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

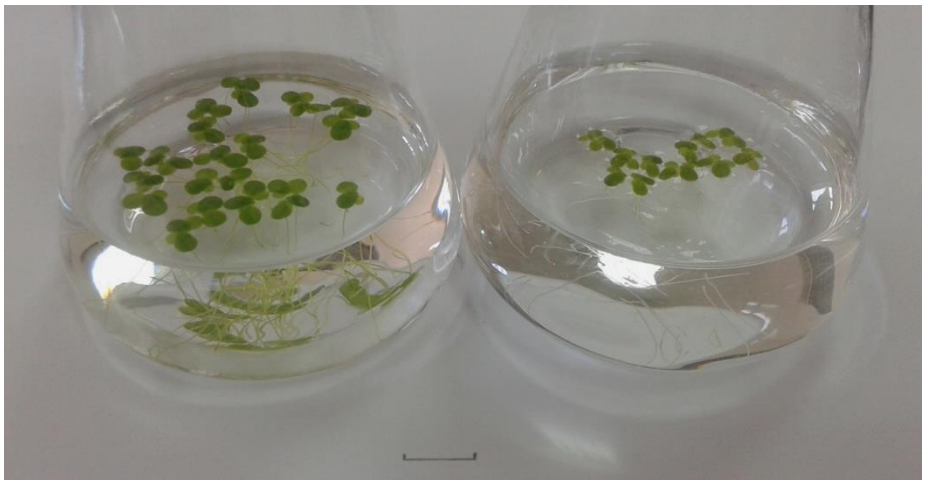
4.1. Učinak bakra na pojedinačne i miješane kulture vodenih leća *Lemna minor* L. i *L. trisulca* L.

Učinak bakra, koji se u hranjivoj podlozi po Steinbergu nalazio u koncentraciji 5 µmol dm^{-3}, a dodan je u obliku bakrova(II) sulfata ($CuSO_4 \times 5\ H_2O$), istražila sam primjenom statičkog Lemna–testa. Pratila sam rast i razvoj biljaka na temelju broja i mase biljaka, koncentracije fotosintetskih pigmenata i proteina, aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze te učinkovitosti fotosinteze.

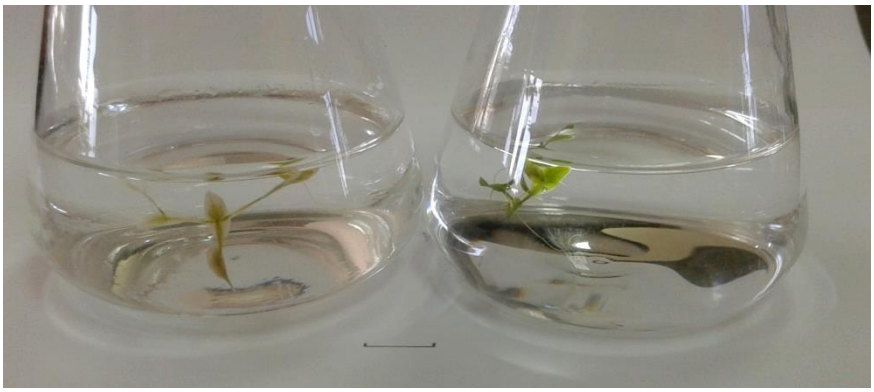
4.1.1. Izgled biljaka

Biljke koje su bile izložene djelovanju bakra morfološki su se razlikovale od kontrolnih biljaka. Kolonije biljaka vrste *L. minor* sadržavale su manji broj biljaka, biljke su bile manje, a korjenčići kraći i blještavi (Slika 3). Kod vrste *L. trisulca* uočila sam klorozu biljaka, biljke su bile gotovo prozirne i korjenčići blještavi (Slika 4). U miješanoj kulturi vrsta *L. minor* i *L. trisulca* koja je sadržavala bakar broj biljaka koji je činio koloniju u vrste *L. minor* bio je manji, biljke su bile manje i korjenčići kraći, a kod vrste *L. trisulca* bila je izražena kloroza (Slika 5).

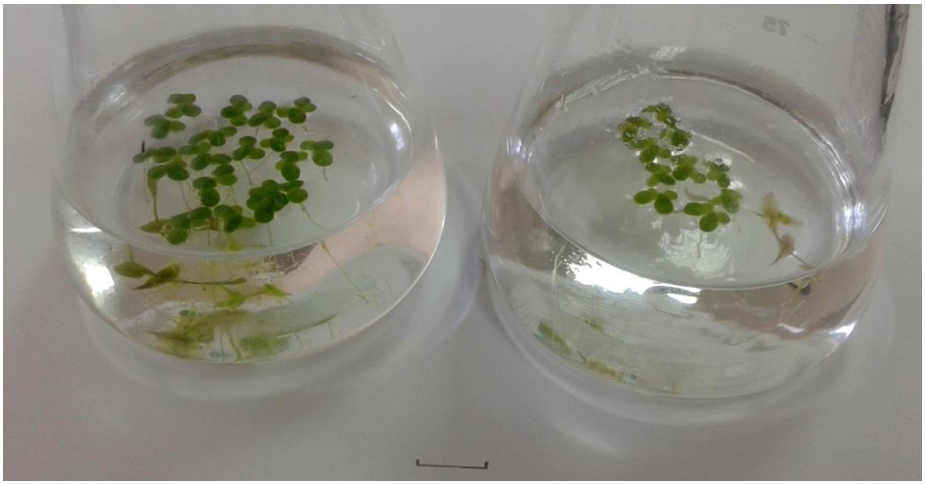
Usporedbom morfološkog izgleda biljaka u pojedinačnim i miješanim kulturama, nisam primijetila da su se biljke koje su uzgajane u pojedinačnim kulturama razlikovale od biljaka u miješanoj kulturi.



Slika 3. Vodena leća *Lemna minor* L. – kontrolne biljke (lijevo) i biljke tretirane bakrom (desno).



Slika 4. Vodena leća *Lemna trisulca* L. - biljke tretirane bakrom (lijevo) i kontrolne biljke (desno).



Slika 5. Miješana kultura vrsta *L. minor* i *L. trisulca* - kontrolne biljke (lijevo) i biljke tretirane bakrom (desno).

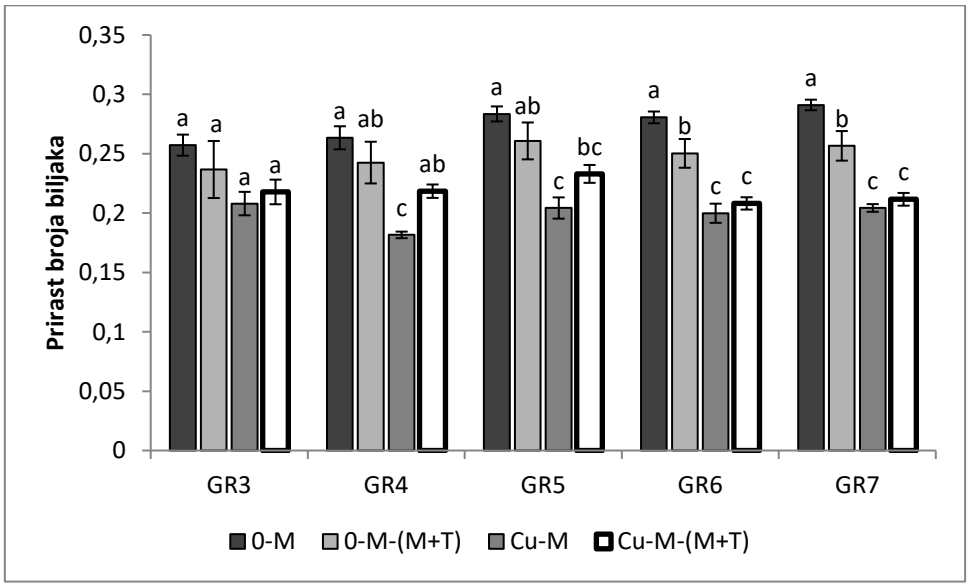
4.1.2. Prirast broja biljaka

Prirast broja biljaka (stopu rasta) određivala sam brojanjem biljaka svakog dana pokusa koji je trajao 7 dana. Broj biljaka se tijekom pokusa povećavao kod obje biljne vrste. Kod vrste *L. minor* prirast broja biljka bio je veći nego kod vrste *L. trisulca*.

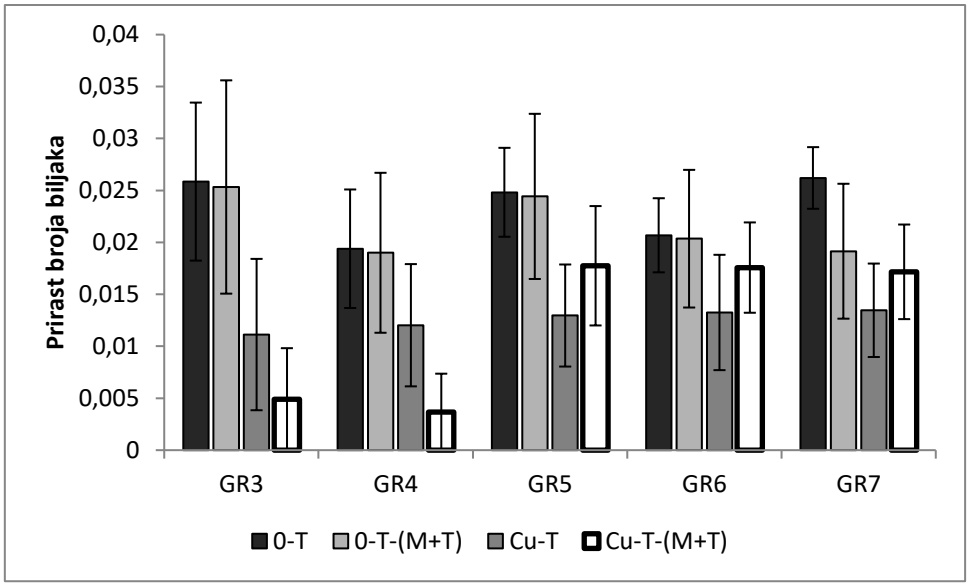
Prirast broja biljaka vrste *L. minor* trećeg dana nije se značajno razlikovao ni u jednoj kulturi. Četvrti dan prirast biljaka pojedinačne kulture koja je bila izložena bakru (Cu-M) značajno se razlikovao od prirasta u ostalim kulturama, dok se petog dana prirast u toj kulturi značajno razlikovao samo od kontrolnih biljaka. Petog dana pokusa nije bilo značajne

razlike u prirastu između kontrolnih biljaka u pojedinačnoj i miješanoj kulturi. Šestog i sedmog dana prirast broja biljaka bio je najveći u kontrolnih biljaka koje su se nalazile u pojedinačnoj kulturi (0-M), a kod kontrolnih biljaka u miješanoj kulturi (0-M-(M+T)) bio je nešto manji. U kulturama u kojima su biljke bile izložene bakru prirast je bio najmanji. Šestog i sedmog dana prirasti biljaka u kontrolnim kulturama međusobno su se značajno razlikovali, a značajno su se razlikovali i od prirasta u kulturama izloženim bakru. Razlika prirasta broja biljaka vrste *L. minor* u pojedinačnoj i miješanoj kulturi uočena je četvrtog, šestog i sedmog dana pokusa. Četvrtog dana prirast biljaka razlikovao se u kulturama koje su sadržavale bakar dok je šestog i sedmog dana razlika bila u kontrolnim kulturama (Slika 6).

Kod usporedbe prirasta broja biljaka po danima za vrstu *L. trisulca*, nisam uočila značajne razlike u prirastu broja biljaka između kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene djelovanju bakra (Slika 7). Uočila sam da je prirast broja biljaka vrste *L. trisulca* tokom pokusa bio manji u odnosu na prirast vrste *L. minor*.



Slika 6. Prirast broja biljaka (stopa rasta) od trećeg do sedmog dana pokusa (GR3 – GR7) u vrste *L. minor*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 8 replika ± standardna pogreška. Vrijednosti dobivene u kontrolnih i tretiranih biljaka međusobno su uspoređivane za pojedini dan pokusa. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno su se razlikovale ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*.



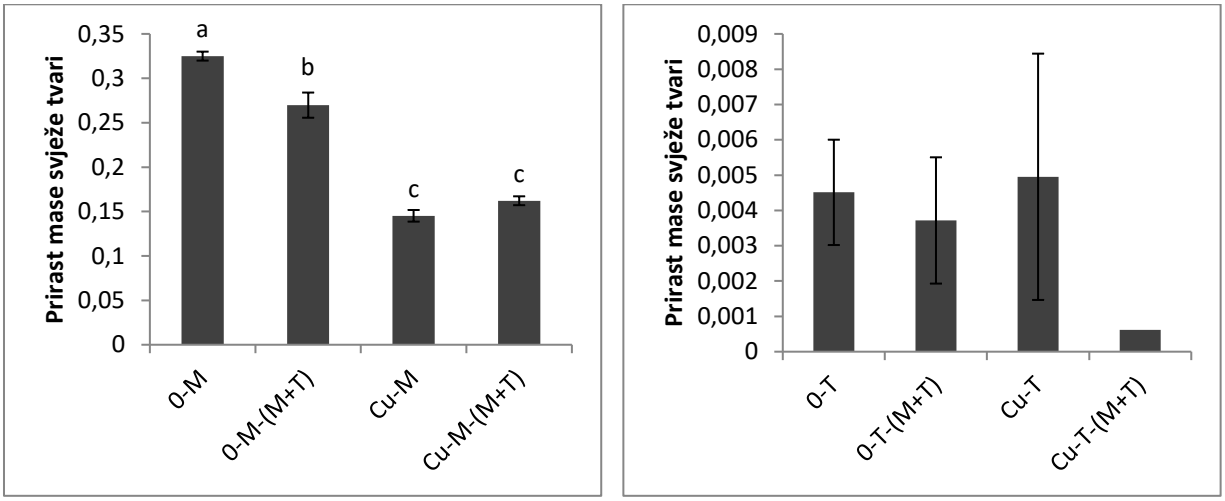
Slika 7. Prirast broja biljaka (stopa rasta) od trećeg do sedmog dana pokusa (GR3 – GR7) u vrste *L. trisulca*. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 8 replika ± standardna pogreška. Vrijednosti dobivene u kontrolnih i tretiranih biljaka međusobno su uspoređivane za pojedini dan pokusa. Nije bilo statistički značajne razlike u prirastu broja biljaka. Rezultati srednjih vrijednosti kontrola i tretmana uspoređeni su Newman–Keuls testom. Oznake: 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.1.3. Prirast mase svježe tvari biljaka

Masu svježe tvari biljaka odredila sam prije samog nasađivanja na hranjivu podlogu (nulti dan) te na kraju pokusa (7. dan). Kod nekih replika u pojedinim tretmanima (0-M-(M+T), 0-T, 0-T-(M+T), Cu-T, Cu-T-(M+T)) nije bilo prirasta mase svježe tvari za pojedinu biljnu vrstu, najčešće vrstu *L. trisulca*. Bilo je primjera kada je pri izračunu prirasta dobivena negativna vrijednost. Takav rezultat može biti posljedica ugibanja biljaka tijekom pokusa. Replike s negativnom vrijednošću prirasta svježe tvari nisam koristila za izračun srednje vrijednosti prirasta unutar pojedinog tretmana, već sam srednju vrijednost računala samo na temelju replika koje su imale pozitivnu vrijednost prirasta. U kulturi 0-M-(M+T) pozitivnu vrijednost je imalo sedam replika, u 0-T šest, u 0-T-(M+T) i Cu-T četiri, a u kulturi Cu-T-(M+T) svega tri replike.

Usporedbom prirasta mase svježe tvari kod vodenih leća *L. minor* i *L. trisulca* utvrdila sam da je prirast bio izraženiji kod vrste *L. minor*. Kod te sam vrste uočila veći prirast mase svježe tvari kod kontrolnih biljaka čije su se vrijednosti u pojedinačnoj (0-M) i miješanoj (0-M-(M+T) kulturi međusobno značajno razlikovale. Značajno su se razlikovale i vrijednosti prirasta masa kontrolnih i bakru izloženih biljka, no vrijednosti u pojedinačnih i miješanih kultura koje su bile izložene bakru značajno se nisu razlikovale (Slika 8 a).

Kod vrste *L. trisulca* dobivene vrijednosti prirasta mase svježe tvari biljaka nisu se značajno razlikovale (Slika 8 b).



(a) (b)

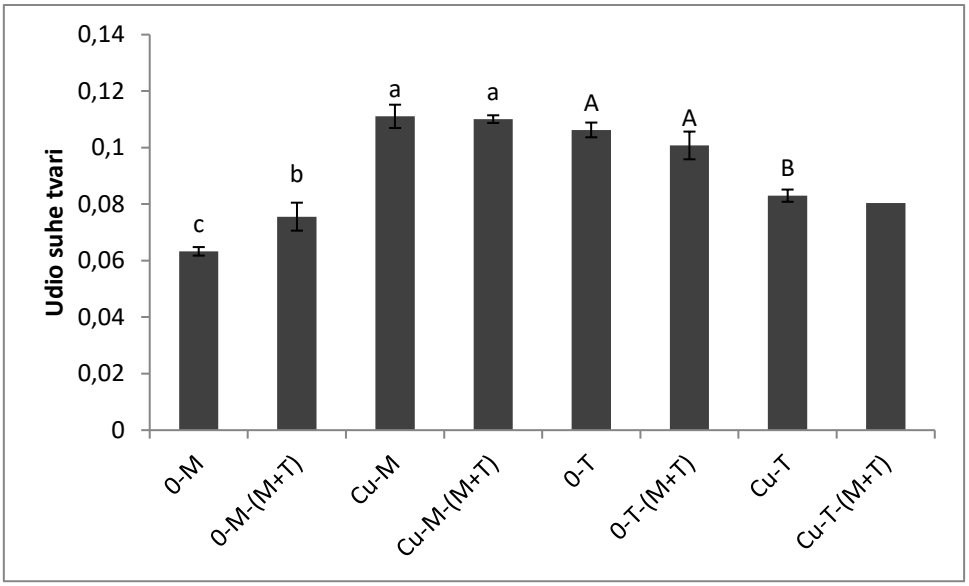
Slika 8. Prirast mase svježe tvari biljaka vrste *L. minor* (**a**) i *L. trisulca* (**b**) sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost određenog broja replika (3-8) ± standardna pogreška. Zbog malog broja replika za kulturu Cu-T-(M+T) nije navedena standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno su se razlikovale ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). U vrste *L. trisulca* nije bilo statistički značajne razlike u prirastu svježe mase među biljkama iz različitih kultura. Oznake: **a)** 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; **b)** 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.1.4. Udio suhe tvari

Masu suhe tvari biljaka odredila sam nakon sušenja biljaka pri temperaturi od 80 °C na kraju pokusa (7. dan). Kao što sam spomenula kod opisa rezultata određivanja mase svježe tvari biljaka, kod nekih je replika u pojedinih tretmana (0-M-(M+T), 0-T, 0-T-(M+T), Cu -T, Cu-T-(M+T)) utvrđeno da nije bilo prirasta svježe tvari, čak je dobivena negativna vrijednost. Budući da sam za izračun omjera mase suhe i svježe tvari koristila te iste podatke o masi svježe tvari biljaka, replike s negativnom vrijednošću prirasta nisu bile korištene za izračun srednje vrijednosti omjera suhe i svježe tvari.

Udio suhe tvari kod vrste *L. minor* bio je veći u kulturama tretiranim bakrom. Značajno se nisu razlikovale vrijednosti dobivene u biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura izloženih bakru, ali te su vrijednosti bile značajno više od vrijednosti dobivenih u kontrolnih biljaka. Statistički je bila značajna razlika dobivena usporedbom biljaka iz kultura kontrolnih biljaka - veći udio suhe tvari bio je u biljaka iz miješane kulture (0-M-(M+T)).

Kod vrste *L. trisulca* vrijednosti udjela suhe tvari bile su više kod kontrolnih biljaka. Rezultati dobiveni na kontrolnim biljkama statistički su se značajno razlikovali od rezultata dobivenih na biljkama koje su bile izložene djelovanju bakra. Prema rezultatima nije bilo razlike u udjelu suhe tvari kod biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura niti u kontrolnim kulturama, niti u kulturama koje su sadržavale bakar (Slika 9).

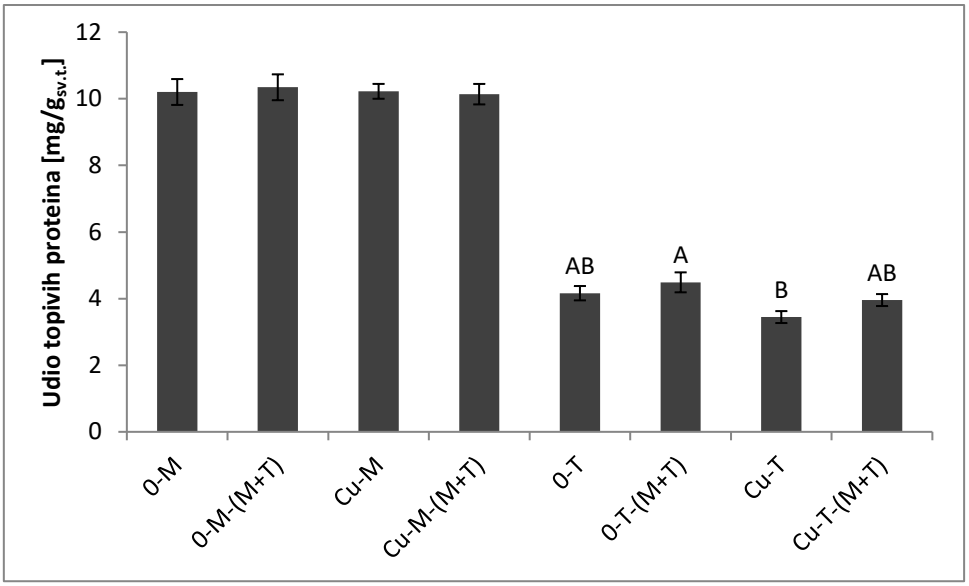


Slika 9. Udio suhe tvari u biljaka nakon sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost određenog broja replika (3-8) ± standardna pogreška. Zbog malog broja replika za kulturu Cu-T-(M+T) nije navedena standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno su se razlikovale ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). Mala slova su korištena za usporedbu rezultata dobivenih za vrstu *L. minor*, a velika slova za vrstu *L. trisulca*. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.1.5. Udio topivih proteina

Udio topivih proteina (u masi svježe tvari biljaka) bio je veći kod vrste *L. minor* nego kod vrste *L. trisulca*. Usporedbom dobivenih rezultata za vrstu *L. minor*, utvrdila sam da među biljkama u četiri različite kulture nije bilo značajne razlike.

Kod vrste *L. trisulca* značajno su se razlikovali udjeli proteina u miješanoj kontrolnoj kulturi (0-T-(M+T)) i u pojedinačnoj kulturi koja je bila izložena bakru (Cu-T). Usporedbom rezultata nisam primijetila da se udio topivih proteina u biljaka uzgajanih u pojedinačnim kulturama značajno razlikovao od udjela u biljaka iz miješanih kultura (Slika 10).

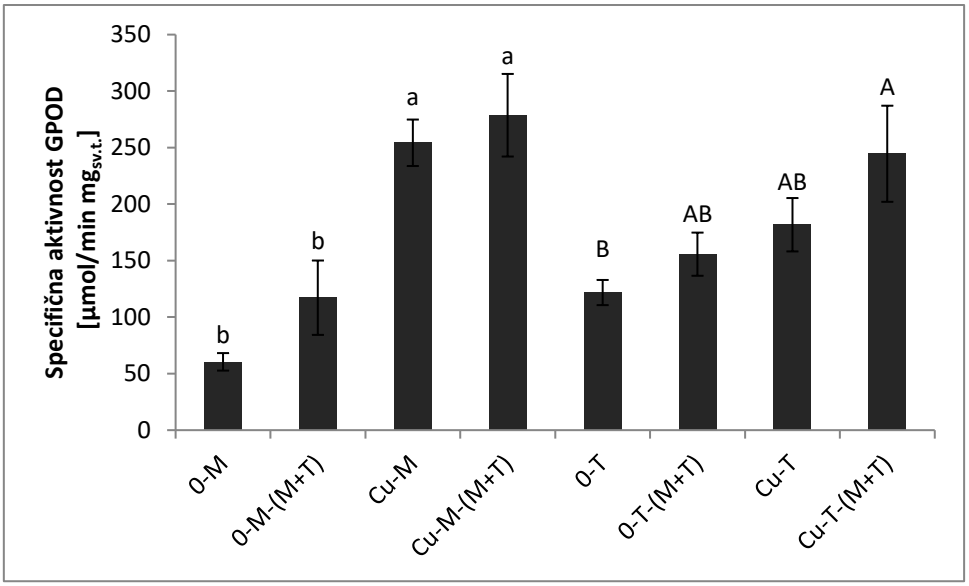


Slika 10. Udio topivih proteina u svježoj tvari biljaka sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno su se razlikovale ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). U vrste *L. minor* nije bilo statistički značajne razlike u udjelu topivih proteina među biljkama iz različitih kultura. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.1.6. Specifična aktivnost gvajakol peroksidaze

Specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze značajno je bila veća u biljaka tretiranih bakrom. U vrste *L. minor* aktivnost enzima kod biljaka izloženih bakru značajno su bile više od vrijednosti koje su dobivene u biljaka na kontrolnim podlogama. Aktivnosti enzima u biljaka u pojedinačnim kulturama nisu bile značajno različite od vrijednosti u biljaka u mješovitim kulturama.

Kod vrste *L. trisulca* statistički su se značajno razlikovale vrijednosti pojedinačne kontrolne kulture (0-T) od vrijednosti dobivene u miješanoj kulturi koja je bila izložena bakru (Cu-T-(M+T)). Prema rezultatima nije bilo razlike u specifičnoj aktivnosti enzima gvajakol peroksidaze kod biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura, niti u kontrolnih biljaka niti u biljaka u kulturama koje su sadržavale bakar (Slika 11).



Slika 11. Specifična aktivnost gvajakol peroksidaze sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). Mala slova su korištena za usporedbu rezultata dobivenih za vrstu *L. minor*, a velika slova za vrstu *L. trisulca*. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.1.7. Udio fotosintetskih pigmenata

Udio fotosintetskih pigmenata u ovom pokusu bio je izražen kao masa pigmenta (mg) po gramu svježe tvari. Dvije biljne vrste, *L. minor* i *L. trisulca*, nisu se značajno razlikovale po udjelu pigmenata (Slika 12).

4.1.7.1. Udio klorofila *a*

Udio klorofila *a* u biljaka vrste *L. minor* u pojedinačnoj kontrolnoj kulturi (0-M) te u miješanoj kulturi izloženoj djelovanju bakra (Cu-M-(M+T)) značajno je bio veći od udjela klorofila *a* u miješanoj kontrolnoj (0-M-(M+T)) i pojedinačnoj kulturi izloženoj bakru (Cu-M). Značajna razlika uočena je između biljaka pojedinačne i miješane kontrolne kulture te između biljaka pojedinačne i miješane kulture izložene bakru.

Usporedbom udjela klorofila *a* u vrste *L. trisulca* nisam utvrdila statistički značajnu razliku među biljkama iz četiri kulture.

4.1.7.2. Udio klorofila *b*

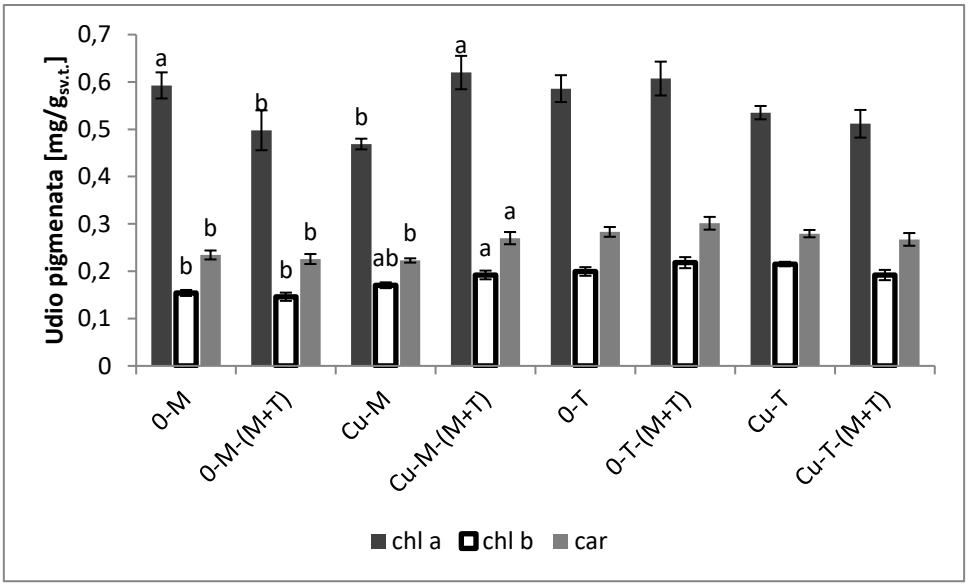
Udio klorofila *b* kod vrste *L. minor* u miješanoj kulturi koja je bila izložena djelovanju bakra (Cu-M-(M+T)) značajno je bio veći od udjela klorofila *b* u kontrolnim kulturama. Usporedbom rezultata nisam primijetila da se udio klorofila *b* u biljaka uzgajanih u pojedinačnim kulturama značajno razlikovao od udjela u biljaka iz miješanih kultura.

Usporedbom udjela klorofila *b* u vrste *L. trisulca* nisam utvrdila statistički značajnu razliku među biljkama iz četiri kulture.

4.1.7.3. Udio karotenoida

Udio karotenoida kod vrste *L. minor* u miješanoj kulturi koja je bila izložena djelovanju bakra (Cu-M-(M+T)) značajno je bio veći od udjela karotenoida u kulturama kontrolnih biljaka i od udjela u pojedinačnoj kulturi koja je bila izložena bakru (Cu-M). Usporedbom rezultata nisam primijetila da se udio karotenoida u biljaka uzgajanih u pojedinačnim kontrolnim kulturama značajno razlikovao od udjela u biljaka iz miješanih kultura, no ta razlika bila je značajna u kultura tretiranih bakrom.

Usporedbom udjela karotenoida u vrste *L. trisulca* nisam utvrdila statistički značajnu razliku među biljkama iz četiri kulture.



Slika 12. Udjeli fotosintetskih pigmenata u biljaka sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). U vrste *L. trisulca* nema statistički značajne razlike u udjelu fotosintetskih pigmenata među biljkama iz različitih kultura. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.2. Učinkovitost fotosinteze

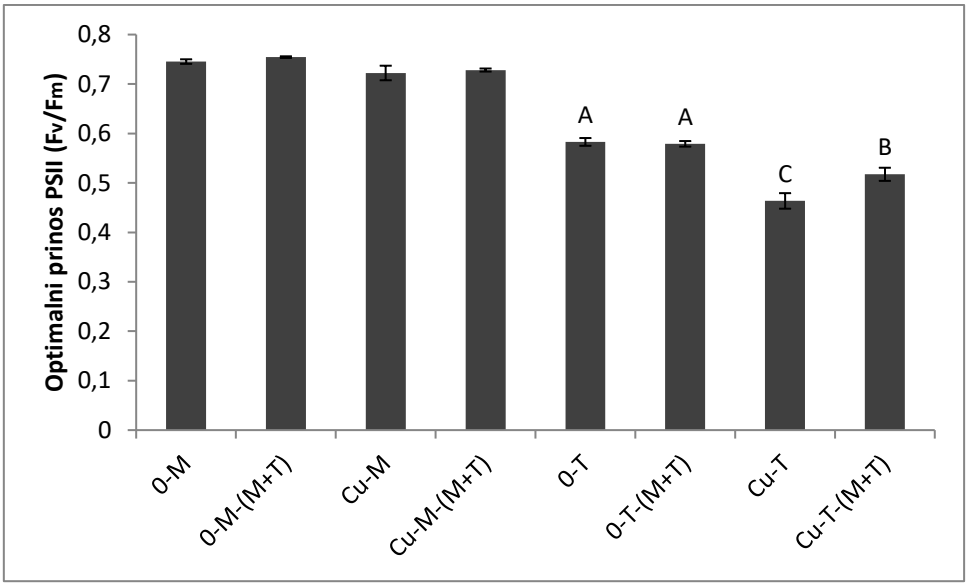
Kako bih istražila učinkovitost fotosinteze biljaka koje su bile izložene djelovanju bakra te kontrolnih biljaka, izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a* u uvjetima *in vivo*, metodom saturacijskog pulsa. Iz izmjerenih podataka odredila sam optimalni i efektivni prinos PSII, stopu prijenosa elektrona te fotokemijsko i nefotokemijsko gašenje fluorescencije.

4.2.1. Optimalni prinos PSII

Vrijednosti optimalnog prinosa PSII (F_v/F_m) kod vrste *L. minor* u prosjeku su iznosile od 0,72 do 0,75. Za vrstu *L. trisulca* te su se vrijednosti kretale u rasponu od 0,46 do 0,58.

Usporedbom dobivenih rezultata za vrstu *L. minor*, utvrdila sam da među biljkama u četiri različite kulture nije bilo značajne razlike.

Kod vrste *L. trisulca* kontrolne biljke imale su značajno veći optimalni prinos PSII od biljaka koje su bile izložene djelovanju bakra. Najniža vrijednost F_v/F_m bila je izmjerena u biljaka vrste *L*. *trisulca* (Cu-T) u pojedinačnoj kulturi koja je bila izložena bakru. Ta se vrijednost statistički značajno razlikovala od vrijednosti koja je dobivena u biljaka u miješanoj kulturi izloženoj bakru (Cu-T-(M+T)) (Slika 13).

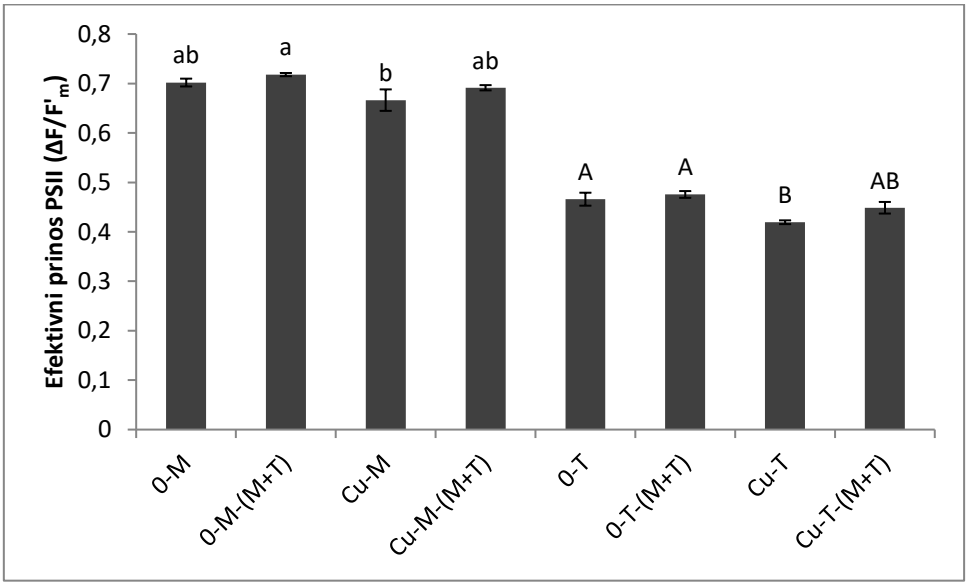


Slika 13. Optimalni prinos PSII sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri replike ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). U vrste *L. minor* nema statistički značajne razlike u optimalnom prinosu PSII među biljkama iz različitih kultura. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.2.2. Efektivni prinos PSII

Vrijednosti efektivnog prinosa PSII kod vrste *L. minor* u prosjeku su iznosile od 0,66 do 0,71. Za vrstu *L. trisulca* te su se vrijednosti kretale u rasponu od 0,41 do 0,47. Kod vrste *L. minor* značajno se razlikovala vrijednost efektivnog prinosa PSII u miješanoj kontrolnoj kulturi (0-M(M+T)) od vrijednosti dobivene u pojedinačnoj kulturi koja je bila izložena bakru (Cu-M). Usporedbom rezultata nisam utvrdila da se udio efektivnog prinosa PSII u biljaka uzgajanih u pojedinačnim kulturama značajno razlikovao od udjela u biljaka iz miješanih kultura.

Kod vrste *L. trisulca* značajno se razlikovala vrijednost u biljaka iz pojedinačne kulture koja je bila izložena bakru (Cu-T) od vrijednosti dobivene u kontrolnih biljaka. Usporedbom rezultata utvrdila sam da se efektivni prinos PSII u biljaka uzgajanih u pojedinačnim kulturama nije značajno razlikovao od vrijednosti u biljaka iz miješanih kultura (Slika 14).



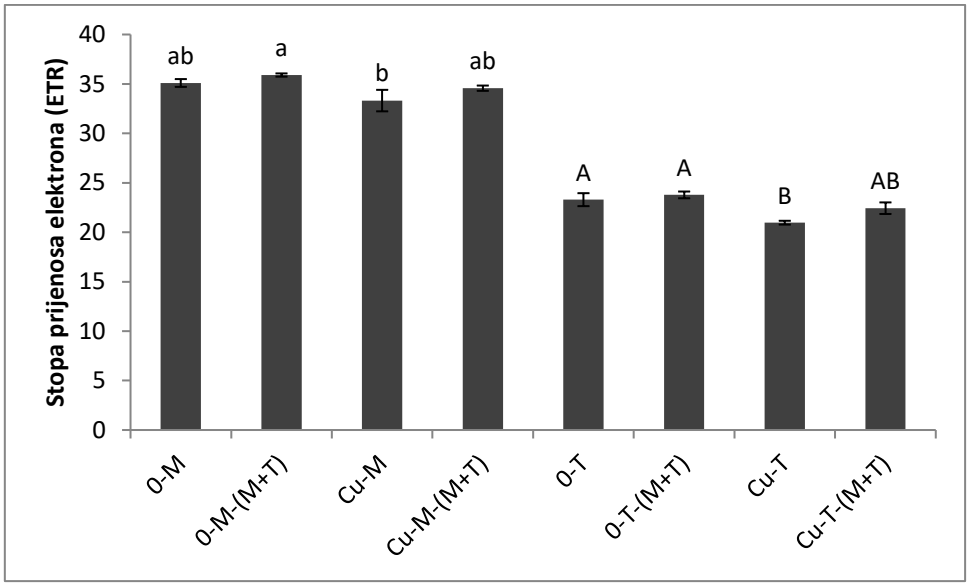
Slika 14. Efektivni prinos PSII sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri replike ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). Mala slova su korištena za usporedbu rezultata dobivenih za vrstu *L. minor*, a velika slova za vrstu *L. trisulca*. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.2.3. Stopa prijenosa elektrona

Stopa prijenosa elektrona kod vrste *L. minor* u prosjeku je iznosila od 0,33 do 0,36. Za vrstu *L. trisulca* ta se vrijednost kretala u rasponu od 0,20 do 0,23. Kod vrste *L. minor* stopa prijenosa elektrona u miješanoj kontrolnoj kulturi (0-M-(M+T)) značajno je bila viša od stope prijenosa elektrona u pojedinačnoj kulturi koja je bila izložena bakru(Cu-M).

Kod vrste *L. trisulca* stopa prijenosa elektrona pojedinačne tretirane kulture (Cu-T) značajno se razlikovala od vrijednosti kultura kontrolnih biljaka (Slika 15).

Prema dobivenim rezultatima u obje biljne vrste, nije bilo razlike u stopi prijenosa elektrona u biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura, niti u kontrolnim kulturama niti u kulturama koje su sadržavale bakar.

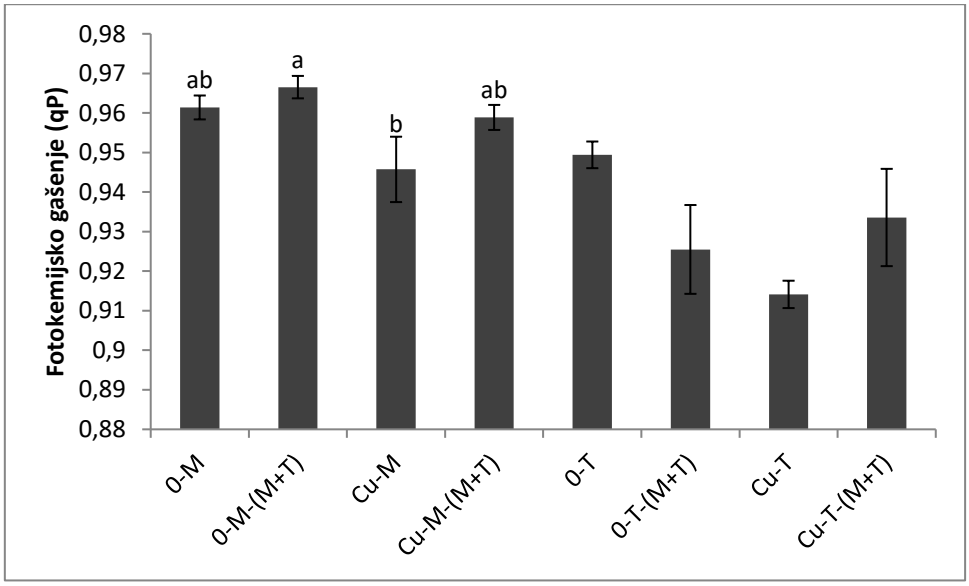


Slika 15. Stopa prijenosa elektrona sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri replike ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). Mala slova su korištena za usporedbu rezultata dobivenih za vrstu *L. minor*, a velika slova za vrstu *L. trisulca*. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.2.4. Fotokemijsko gašenje fluorescencije

Vrijednosti fotokemijskog gašenja kod vrste *L. minor* u prosjeku su iznosile od 0,94 do 0,96. Za vrstu *L. trisulca* ta se vrijednost kretala u rasponu od 0,91 do 0,94. Kod vrste *L. minor* vrijednost fotokemijskog gašenja biljaka u miješanoj kontrolnoj kulturi (0-M-(M+T)) značajno se razlikovala od vrijednosti fotokemijskog gašenja biljaka koje su se nalazile u pojedinačnoj kulturi izloženoj bakru (Cu-M). Prema dobivenim rezultatima nije bilo razlike u vrijednosti fotokemijskog gašenja u biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura, niti u kontrolnim kulturama niti u kulturama koje su sadržavale bakar.

Usporedbom dobivenih rezultata za vrstu *L. trisulca*, utvrdila sam da među biljkama u četiri različite kulture nije bilo značajne razlike (Slika 16).



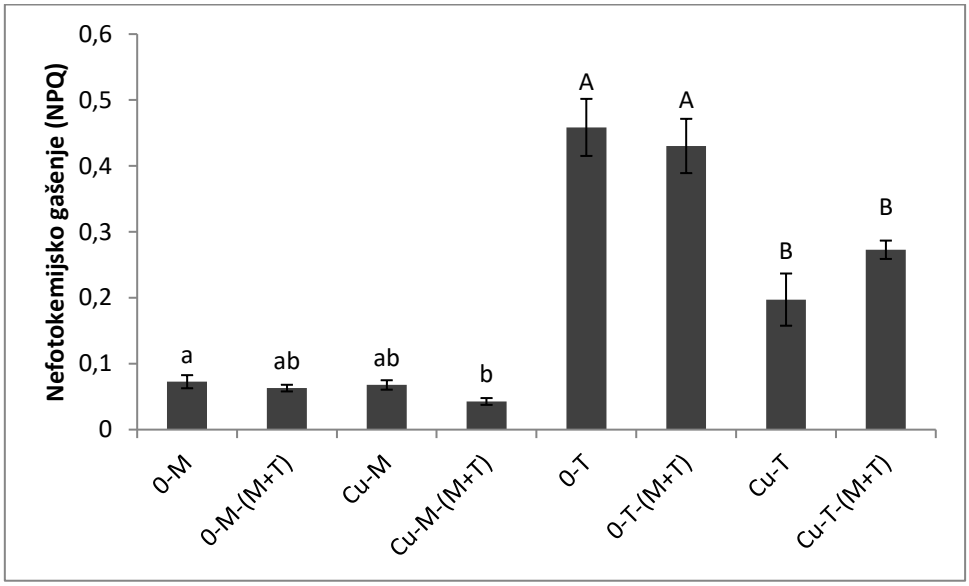
Slika 16. Fotokemijsko gašenje fluorescencije sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri replike ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). U vrste *L. trisulca* nema statistički značajne razlike vrijednosti fotokemijskog gašenja među biljkama iz različitih kultura. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

4.2.5. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije

Vrijednosti nefotokemijskog gašenja kod vrste *L. minor* u prosjeku su iznosile od 0,04 do 0,07. Za vrstu *Lemna trisulca* ta se vrijednost kretala u rasponu od 0,19 do 0,45. Kod vrste *L. minor* vrijednost nefotokemijskog gašenja u biljaka koje su se nalazile u pojedinačnoj kontrolnoj kulturi (0-M) značajno se razlikovala od vrijednosti nefotokemijskog gašenja u biljaka koje su se nalazile u miješanoj kulturi izloženoj bakru (Cu-M-(M+T)).

Kod vrste *L. trisulca* vrijednosti nefotokemijskog gašenja kontrolnih biljaka značajno se razlikovala od vrijednosti u biljaka koje su bile izložene bakru (Slika 17).

Prema dobivenim rezultatima u obje biljne vrste nije bilo razlike u vrijednosti nefotokemijskog gašenja u biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura, niti u kontrolnim kulturama niti u kulturama koje su sadržavale bakar.



Slika 17. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije sedmog dana pokusa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost četiri replike ± standardna pogreška. Vrijednosti obilježene različitim slovima značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$ prema Newman-Keuls testu). Mala slova su korištena za usporedbu rezultata dobivenih za vrstu *L. minor*, a velika slova za vrstu *L. trisulca*. Oznake: 0-M – *L. minor* u kontrolnoj kulturi; 0-M-(M+T) – *L. minor* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. trisulca*; Cu-M – *L. minor* izložena djelovanju bakra; Cu-M-(M+T) – *L. minor* izložena djelovanju bakra u miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L trisulca*; 0-T – *L. trisulca* u kontrolnoj kulturi; 0-T-(M+T) – *L. trisulca* u kontrolnoj miješanoj kulturi, u kojoj se nalazi i *L. minor*; Cu-T – *L. trisulca* izložena djelovanju bakra; Cu-T-(M+T) – *L. trisulca* izložena bakru u miješanoj kulturi u kojoj se nalazi i *L. minor*.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju, koristeći Lemna-test, pratila sam utjecaj bakra na dvije vrste vodenih leća, *Lemna minor i L. trisulca*, koje su se nalazile u kulturi svaka pojedinačno te u zajedničkoj miješanoj kulturi. Biljke sam izlagala djelovanju bakra. Kao kontrola služila mi je kultura bez bakra u hranjivoj podlozi. Osnovni cilj bio je utvrditi utječe li prisutnost obiju vrsta vodenih leća u ostvarivanju odgovora na utjecaj bakra. Stoga sam istovremeno provela i standardizirani Lemna-test za svaku vrstu posebno kako bih mogla usporediti učinak bakra na pojedinačne kulture s učinkom na miješane kulture.

Koncentracija bakra korištena u ovom pokusu bila je 5 µmol dm^{-3}. Bakar, iako esencijalan element u biljnom organizmu, pri toj je koncentraciji utjecao na niz fizioloških procesa kod obje vrste vodenih leća. Učinak bakra na vodene leće dobro je istražen, posebice za vrstu *L. minor*. Khellaf i Zerdaoni (2010) utvrdili su da bakar stimulira rast vrste *L. minor* u rasponu masenih koncentracija od 0,003 do 0,3 mg dm^{-3}, no pri koncentracijama od 0,3 do 1,0 mg dm^{-3} uzrokuje značajnu inhibiciju rasta. Vidaković-Cifrek i suradnici (2015) utvrdili su da bakar pri koncentraciji od 5 µmol dm^{-3} u vrste *L. minor* reducira rast, smanjuje udio fotosintetskih pigmenata te smanjuje optimalan i efektivan prinos PSII što za posljedicu ima smanjenu fotosintetsku učinkovitost biljke. Slično su uočili Prasad i suradnici (2001) na vrsti *L. trisulca* kod koje se značajno smanjuje ukupna fotosinteza pri koncentracijama bakra 2-50 µmol dm^{-3}. U istraživanju koje je provela Gračanac (2012) na vrsti *L. gibba* kloroza i smanjen prirast biljaka uočeni su pri koncentracijama bakra od 3 i 5 mg dm^{-3}. U mojem istraživanju masena koncentracija bakra bila je veća od stimulirajuće pa je i prirast broja biljaka koje su bile izložene djelovanju bakra također bio manji u odnosu na prirast kontrolnih biljaka. Već nakon trećeg dana pokusa uočila sam klorozu kod obje biljne vrste i u pojedinačnim i u miješanim kulturama. Nakon sedmog dana pokusa kod vrste *L. minor* i u pojedinačnoj i u miješanoj kulturi pod utjecajem bakra uočila sam manje biljke i u manjem broju te kraće i bljeđe korjenčiće u odnosu na kontrolne biljke. Uočila sam čak i izostanak odvajanja biljaka kćeri od majčinske biljke. Kloroza je bila očitija u vrste *L. trisulca* čije su biljke u obje tretirane kulture bile gotovo prozirne. Obje biljne vrste koje su rasle pod utjecajem bakra u miješanoj kulturi nisu pokazale razliku u prirastu broja biljaka od biljaka koje su rasle u pojedinačnim kulturama. Izuzetak je bila pojedinačna kultura *L. minor* u kojoj je četvrtog dana pokusa utvrđena manja stopa rasta u odnosu na rast vrste *L. minor* u

miješanoj kulturi. Moguće objašnjenje ove pojave je raspoloživost bakrovih iona u kulturama. Naime, sve kulture (miješane i pojedinačne), sadržavale su jednaki volumen hranjive podloge, a time i jednaku količinu hranjivih tvari te bakra. Kod biljaka u miješanih kultura količina bakrovih iona raspoloživih biljkama „podijeljena“ je između više biljaka (tj. veće ukupne biomase) nego u kultura sa samo jednom biljnom vrstom. Stoga je utjecaj bakra na prirast broja biljaka u spomenutoj pojedinačnoj kulturi bio veći u odnosu na miješanu kulturu upravo zbog izloženosti jedne biljne vrste većoj količini bakrovih iona. Nadalje, u vezi prirasta broja biljaka u vrste *L. minor* treba istaknuti da u nastavku pokusa (5., 6., i 7. dana) više nije bilo razlike u broju biljaka između pojedinačne i miješane kulture. Ta se pojava može objasniti adaptacijom biljke na prisutnost bakra. Neki od mogućih mehanizama adaptacije mogli bi biti akumulacija bakra u biljku te aktivnost antioksidacijskog sustava koji neutralizira oksidacijski stres uslijed djelovanja iona bakra (Radić i sur. 2010, Varga 2015.).

Prirast mase svježe tvari biljaka u vrste *L. minor* imao je veće vrijednosti u kontrolnih biljaka u usporedbi s biljkama tretiranim bakrom. U vrste *L. trisulca* uočila sam veći prirast mase svježe tvari kod tretirane pojedinačne kulture (Cu-T), ali ta razlika nije bila statistički značajna u odnosu na ostale kulture. Međutim, određeni broj replika u kultura tretiranih bakrom imao je negativan prirast mase. To je najčešće posljedica ugibanja biljke što je povezano sa osjetljivošću biljke na uvjete rasta. Prema dobivenim rezultatima bakar je više utjecao na vrstu *L. trisulca*. U svakom tretmanu nekoliko je replika imalo negativan prirast mase, u miješanoj tretiranoj kulturi svega tri replike imale su pozitivan prirast. Gračanac (2012) je slično uočila kod vrste *L. gibba* čije su biljke pri koncentraciji bakra do 1 mg dm^{-3} imale zabilježen prirast mase svježe tvari, pri koncentraciji od 3 mg dm^{-3} uočen je nagli pad mase, a podaci za tretman s 5 mg dm^{-3} bakra nisu ni prikazani zbog nedostatne mase, tj. velikog broja uginulih biljaka. U mojem istraživanju je kod vrste *L. minor* udio suhe tvari u kulturama tretiranim bakrom bio je veći u odnosu na kontrolne biljke. Kod vrste *L. trisulca* veći udio suhe tvari uočila sam kod kontrolnih biljaka. Biljke vrste *L. minor* poznate su po akumulaciji nekih vrsta teških metala. Prilikom njihove akumulacije biljka u svrhu svoje zaštite dodatno stvara obrambene tvari koje su često proteini ili peptidi (antioksidacijski enzimi, fitohelatini i sl.). Stoga veći udio suhe tvari u vrste *L. minor* tretirane bakrom može biti rezultat odgovora biljke na stres uzrokovan previsokom koncentracijom bakra. U biljaka vrste *L. trisulca* tretiranih bakrom bio je manji udio suhe tvari u odnosu na kontrolne biljke.

Promjena omjera suhe i svježe mase u kulturama *L. trisulca* s dodatkom bakra može biti posljedica akumulacije bakra, nakon čega je u biljku mogla ući povećana količina vode. Iako je primanje bakra u određenoj mjeri bilo prisutno i u vrste *L. minor*, postoji mogućnost da je vrsta *L. trisulca* u određenom vremenskom periodu primila veću količinu bakra i vode što je rezultiralo promjenom omjera suhe i svježe tvari. Naime, *L. trisulca* je submerzna vrsta, tj. cijelim tijelom je uronjena u hranjivu podlogu i time pod većim djelovanjem bakra. Vrsta *L. minor* samo je donjom površinom tijela u kontaktu s hranjivom podlogom. No, za potvrdu ove pretpostavke o promjeni omjera suhe i svježe tvari u obje vrste vodenih leća potrebna su dodatna istraživanja. Prasad i suradnici (2001) uočili su da biljke vrste *L. trisulca* mogu akumulirati bakar bez značajnih posljedica sve dok njegova koncentracija u hranjivoj podlozi ne prelazi 50 μmol dm^{-3}. Rezultati dobiveni u njihovom istraživanju ukazuju na to da se povećanjem koncentracije bakra u hranjivoj podlozi povećava i akumulacija bakra koja iznosi 5,5 mg(Cu)/g suhe mase. Za koncentraciju bakra u hranjivoj podlozi od 5 μmol dm^{-3} zabilježena vrijednost akumuliranog bakra iznosi 0,6 mg/g suhe tvari. Akumulacija bakra kod vrste *L. minor* čak je dvostruko manja u odnosu na *L. trisulca* (Zayed i sur. 1998). Miješana kultura biljaka tretiranih bakrom u kojoj su se nalazile obje biljne vrste imala je bolji prirast broja biljaka četvrtog dana pokusa te veći udio suhe tvari na kraju pokusa za vrstu *L. minor*. Udio suhe tvari bio je povećan i u biljaka vrste *L. minor* koje su se samostalno nalazile u kulturi. Biljke u stresnim uvjetima (npr. povećana koncentracija soli u hranjivoj podlozi, prisutnost teških metala i sl.) sintetiziraju zaštitne tvari i dodatne proteine koje ih kratkotrajno mogu zaštititi od stresa. To opravdava i povećani udio suhe tvari tretiranih biljaka vrste *L. minor*.

Koncentracija ukupnih topivih proteina u biljci također može biti pokazatelj uvjeta rasta jer je utvrđeno da se mijenja kao odgovor na veliki broj stresnih čimbenika (Piotrowska i sur. 2010, Doganlar i Atmaca 2011, citirano u Varga 2015). Koncentracija topivih proteina u vrste *L. minor* bila je veća nego u *L. trisulca* i dobivene vrijednosti nisu se značajno razlikovale između kontrolnih biljaka i biljaka koje su bile izložene djelovanju bakra. Smanjenje koncentracije proteina u određenim fazama odgovora biljke na stresne uvjete može biti posljedica povišene aktivnosti proteaza i drugih kataboličkih enzima aktiviranih različitim metalima (Sinha i sur. 1996). Utjecaj povišenih koncentracija bakra, kadmija, željeza te srebra na smanjenje koncentracije proteina zabilježen je kod vrste *L. minor* (Razinger i sur.

2007, Kanoun-Boulé i sur. 2009) i *E. nuttallii* (Xing i sur. 2010, citirano u Varga). Razinger i sur. (2007) uočili su kako povišene koncentracije bakrova(II) sulfata smanjuju koncentraciju reduciranog glutationa te je to signal koji pokreće aktivnost antioksidacijskih enzima. Prema istraživanju koje su proveli Prasad i suradnici (2001) bakar kod vrste *L. trisulca* nije inducirao povećanje količine specifičnih proteina. Za održavanje koncentracije superoksidnog aniona i vodikova peroksida u fiziološkim granicama u biljnim stanicama važna je ravnoteža između sustava za stvaranje i uklanjanje reaktivnih oblika kisika (Mittler 2002). U ostvarivanju antioksidacijskog odgovora na tretman bakrom sudjeluje enzim peroksidaza, stoga ne čudi povećana aktivnost gvajakol peroksidaze koja je u ovom istraživanju uočena u kulturama koje su bile tretirane bakrom. Najviša specifična aktivnost enzima gvajakol peroksidaze zabilježena je u kulturama u kojima su se nalazile obje vrste, ali nije zabilježena statistički značajna razlika između miješanih i pojedinačnih kultura tretiranih bakrom. U radu Razinger i sur. (2007) utvrđena je povišena aktivnost enzima gvajakol peroksidaze u tkivu *L.minor* nakon kratkotrajnog tretmana biljke s Cu i Cd. Khellaf i Zirdeoni (2010) u svom su istraživanju na vrsti *L. minor* uočili najizraženiju aktivnost upravo ovog enzima pri koncentracijama bakrova(II) sulfata iznad 0,5 μmol dm^{-3}. Povećane aktivnosti peroksidaze mogu doprinositi promjenama mehaničkih svojstava staničnih stijenki uslijed sinteze elemenata stanične stijenke koji u određenoj mjeri mogu djelovati kao fizička barijera za ulazak teških metala u stanice (Hegedüs i sur. 2001, citirano u Varga 2015). Prisutnost dviju vrsta biljaka vjerojatno uključuje određenu interakciju što može uzrokovati određeni stresni učinak. Na temelju dosadašnjih istraživanja teško je precizno reći o kakvoj se interakciji i kakvom stresu radi, no alelopatske interakcije često su prisutne u vodenim staništima, posebice u submerznih biljaka (Gross 2003). Alelopatija se temelji na inhibiciji rasta i razvoja susjednih biljaka ispuštanjem kemijskih spojeva, često fenola. Time si biljka osigurava prostor, a u vodenih staništa prisutna je i kako bi se spriječilo preveliko širenje biljaka koje bi mogle zasjeniti ostale organizme. U istraživanju koje je proveo Landolt (1986) o kompeticiji između vodenih leća *L. minor* i *L. trisulca*, uočio je veću dominaciju *L. minor* u miješanim kulturama. Uočio je i da u zajedničkoj kulturi *L. trisulca* ima manji udio suhe tvari i manju proizvodnju bjelančevina te veći omjer ugljikohidrata i proteina. Moji rezultati također su pokazali manje udjele suhe tvari i topivih proteina kod vrste *L. trisula* u usporedbi s rezultatima dobivenima za vrstu *L. minor* u miješanoj kulturi. Vrsta *L. minor* brže se razmnožava i može zasjeniti biljke *L. trisulca* u zajedničkim kulturama. Kada su zasjenjene, biljke *L. trisulca* imaju 30% manju

reprodukciju u odnosu na uvjete kada nisu zasjenjene, dok se biljke *L. minor* u uvjetima zasjenjenja uopće ne reproduciraju (Keddy 1976). Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo postoji li alelopatska interakcija između biljaka vrste *L. minor* i *L. trisulca*.

Udjeli fotosintetskih pigmenata nisu pokazali velike razlike među dvjema vrstama vodenih leća. Najniže vrijednosti klorofila *a* dobivene za vrstu *L. minor* izmjerene su u biljaka iz pojedinačnih kultura koje su sadržavale bakar, a za vrstu *L. trisulca* u biljaka iz miješane kulture tretirane bakrom. Kao posljedica prisutstva bakra pojavila se kloroza listova koja je upravo u tim kulturama bila najizraženija. Smanjeni udio klorofila može biti uzrokovan oksidacijskim stresom u kloroplastima u prisutnosti bakra (Baszyński i sur. 1988). Udjeli klorofila *b*, kao i udjeli karotenoida bili su u svim kulturama veći u vrste *L. trisulca* što može biti posljedica submerznog načina života. Naime, kod submerznog načina života biljka nije direktno izložena svjetlosti. Svjetlost koju prima slabijeg je intenziteta prema svjetlosti koju primaju plutajuće biljke. To je mogući uzrok zašto *L. trisulca* stvara povećanu količinu pomoćnih pigmenata (karotenoida i klorofila *b*).

Mjerenjem fluorescencije metodom saturacijskog pulsa u uvjetima *in vivo* odredila sam učinkovitost fotokemijskih reakcija fotosinteze. U lancu prijenosa elektrona u tilakoidnim membranama kloroplasta elektroni se s PSII prenose na molekule plastokinona. Intenzitet fluorescencije u velikoj mjeri ovisi o tome koliki je udio plastokinona u reduciranom stanju. Pri niskom intenzitetu svjetlosti, nisu sve molekule plastokinona u reduciranom obliku pa one koje su preostale u oksidiranom obliku mogu primiti elektrone. Pri jačem intenzitetu osvjetljenja zbog malog udjela oksidiranih molekula plastokinona ne može se iskoristiti sva apsorbirana svjetlosna energija pa se u takvim uvjetima veći dio apsorbirane svjetlosne energije oslobađa u obliku fluorescencije (Maxwell i Johnson 2000). Intenzitet svijetla korišten za obasjavanje biljaka u ovom mjerenju iznosio je 52-55 µmol m^{-2} s^{-1} za vrstu *L. minor* , a za vrstu *L. trisulca* 42-43 µmol m^{-2} s^{-1}. Zbog submerznog načina života u mjerenjima kod vrste *L. trisulca* koristila sam slabije osvjetljenje jer se u takvim uvjetima biljka nalazila tijekom uzgoja, a i zato što je pri većem intenzitetu osvjetljenja pokazivala jako male vrijednosti učinkovitosti fotosinteze. Maksimalna učinkovitost PSII za većinu biljaka iznosi 0,7-0,8. Vrijednosti koje sam dobila za vrstu *L. minor* kreću se u tim granicama. Za vrstu *L. trisulca* dobivena vrijednost je bila niža što je, pretpostavljam, posljedica submerznog načina života. Efektivna učinkovitost PSII mjera je

udjela svjetlosti apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i energije iskorištene u fotokemijskim reakcijama. Vrijednosti dobivene u ovom istraživanju također su više u vrste *L. minor*, kao i vrijednosti stope prijenosa elektrona. Fotokemijsko gašenje definira se kao pojava smanjenja intenziteta fluorescencije kada je većina akceptora elektrona u lancu prijenosa elektrona oksidirana, tj. raspoloživa za primanje elektrona. Vrijednost gašenja fluorescencije smanjuje se ukoliko okolišni čimbenici ometaju stopu prijenosa elektrona. Kulture koje su uzgajane na hranjivoj podlozi s bakrom pokazuju nižu vrijednost fotokemijskog gašenja. Zanimljivo je kako su u ovom, a i ostalim, prije navedenim parametrima za određivanje učinkovitosti fotosinteze, izmjerene vrijednosti najniže u kulturama u kojima se nalazi samo *L. trisulca*. To me navelo na pretpostavku da na učinkovitost fotosinteze u miješanoj kulturi utječe međusobna interakcija biljnih vrsta. U ovom je pokusu izmjereno i nefotokemijsko gašenje fluorescencije, parametar koji ima značenje u uvjetima visokih intenziteta svjetlosti, kada se sva apsorbirana energija ne može upotrijebiti za fotokemijske reakcije pa se oslobađa u obliku topline. Vrijednosti nefotokemijskog gašenja u ovom su istraživanju bile mnogo više za vrstu *L. trisulca*, posebno u kulturama bez bakra. Prema istraživanju koje su proveli Prasad i sur. (2001) povišene koncentracije bakra (2-50 $\mu mol\ dm^{-3}$) negativno utječu na proces fotosinteze. Rezultati istraživanja Olette i suradnika (2008) također su pokazala da bakar, u ovom istraživanju korišten u obliku $CuSO_4$ (spoj koji se koristi kao pesticid) inhibira fotosintetsku aktivnost vrste *L. minor* pri koncentracijama od 12, 24, 40 i 100 $\mu g\ dm^{-3}$.

Uzevši u obzir sve parametre mjerene u ovom pokusu, mogu zaključiti da međusobna interakcija biljaka nije značajno utjecala u ostvarivanju odgovora na učinak bakra. Međutim, pri usporedbi rezultata kontrolnih biljaka vrste *L. minor* uočila sam statistički značajno veći prirast broja biljaka u pojedinačnim kulturama. Usporedbom rezultata dobivenih za prirast mase svježe tvari primijetila sam da su biljke *L. trisulca* bile osjetljivije na prisutnost bakra u hranjivoj podlozi jer sam u nekim kulturama tijekom sedmodnevnog pokusa primijetila promjene koje ukazuju na ugibanje biljaka.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju promatranih parametara rasta te fizioloških parametara mogu zaključiti da je bakar djelovao na obje vrste vodenih leća – *Lemna minor* L. i *L. trisulca* L.
Pojava kloroze, izostanak prirasta biomase te smanjeni optimalni prinos PSII ukazuju da je vrsta *L. trisulca* bila osjetljivija na prisutnost bakra od vrste *L. minor*.

Na temelju mjerenih parametara u biljaka iz pojedinačnih i miješanih kultura, mogu zaključiti da na dobivene rezultate kod većine mjerenih pokazatelja nije utjecala međusobna interakcija biljnih vrsta jer odgovor dviju vrsta vodenih leća na bakar u pojedinačnim kulturama nije bio značajno drugačiji od odgovora u miješanoj kulturi. Međutim, u kontrolnim kulturama rast vrste *L. minor* bio je veći u pojedinačnoj kulturi u usporedbi s rastom te biljne vrste u miješanoj kulturi.

7. LITERATURA

1. Appenroth K. J., Borisjuk N., Lam E. (2013): Telling duckweed apart: genotyping technologies for the *Lemnaceae*. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology 19 (1): 1-10

2. Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science India 82: 1227-1238

3. Babić M., Radić S., Cvjetko P., Roje V., Pevalek-Kozlina B., Pavlica, M. (2009): Antioxidative response of *Lemna minor* plants exposed to thallium(I)-acetate. Aquatic Botany 91: 166–172

4. Barón M., López-Gorgé J., Lachica M., Sadmann G. (1992): Changes in carotenoids and fatty acids in photosystem II of Cu-deficient pea plants. Physiologia Plantarum 84: 1-5

5. Baszynski T., Ruszkowska M, Król M., Tukendorf A., Wolinska D. (1978): The effect of cooper deficiency on the photosynthetic apparatus of higher plants. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 89: 207-216

6. Baszynski T., Tukendorf A, Ruszkowska M, Skórzynska E., Maksymiee W. (1988): Characteristics of the photosynthetic apparatus of cooper non-tolerant spinach exsposed to excess cooper. Journal of Plant Physiology 132: 708-713

7. Bovet L., Kammer P. M., Suter M., Brunold C. (2000): Effect of mannitol and cold treatments on phosphate uptake and protein phosphorylation in *Lemna minor* L. plants. Journal of Plant Physiology 157: 375–382

8. Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the priciple of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254

9. Brain R. A., Reitsma T. S., Lissemore L. I., Bestari K., Sibley P. K., Solomon K. R. (2006): Herbicidal effects of statin pharmaceuticals in Lemna gibba. Environmental Science & Technology 40: 5116–5123

10. Chance B., Maehly A. C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. U: Methods in Enzymology. Colowick SP, Kaplan NO, (ur.). Academic Press, New York, NY, str 764-775

11. Cvjetko P., Tolić S., Šikić S., Balen B., Tkalec M., Vidaković-Cifrek Ž., Pavlica M. (2010): Effect of cooper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju 61: 287-296

12. Demidchik V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. Environmental and Experimental Botany 109: 212-228

13. Doganlar Z.B., Atmaca M. (2011): Influence of airborne pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). Water, Air and Soil Pollution 214: 509-523

14. Frankart C., Eullaffroy P., Vernet G. (2002): Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations. Ecotoxicology and Environmental Safety 53: 439-445

15. Gračanac I. (2012): Usporedba osjetljivosti dvije kulture vrste *Lemna gibba* L. (laboratorijske i kulture iz ribnjaka Narta) na bakar. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

16. Gross E. M. (2003): Allelopathy of aquatic autotrophs. Critical Reviews in Plant Science 22: 313-339

17. Hans R. K., Farooq M., Babu G. S., Srivastava S. P., Joshi P. C., Viswanathan P. N. (1999): Agricultural produce in the dry bed of the River Ganga in Kanpur, India—a new source of pesticide contamination in human diets. Food and Chemical Toxicology 37: 847–852

18. Hegedüs A., Erdei S., Horváth G. (2001): Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science 160: 1085-1093

19. Hillman W. S. (1961): The Lemnaceae, or duckweeds. The Botanical Review 27:221-287

20. Holt M. S. (2000): Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. Food and chemical toxicology 38: 21–27

21. Huebert D. B., Shay J. M. (1993): The response of *Lemna trisulca* L. to cadmium. Environmental Pollution 80(3): 247-253

22. ISO 20079:2005 Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) – duckweed growth inhibition test

23. Kanoun-Boulé M., Vicente J. A. F., Nabais C., Prasad M. N. V., Freitas H. (2009): Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. Aquatic Toxicology 91: 1-9

24. Keddy P. A. (1976): Lakes as Islands: The distributional ecology of two aquatic plants, *Lemna minor* L. and *Lemna trisulca* L. Ecology 57: 353-359

25. Khellaf N., Zerdaóui M. (2010): Growth, photosynthesis and respiratory response to cooper in Lemna minor: a potential use of duckweed in biomonitoring. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering 7: 299-306

26. Krajnčić B., Devidé Z. (1980): Report on photoperiodic responses in *Lemnaceaceae* from Slovenia. Berichte des Geobotanisches Institut ETH, Stiftung Rübel, Zürich, 47: 75-86

27. Landolt E. (1986): The family of *Lemnaceae* – monographic study. vol. 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes ETH, Stiftung Rübel, Zürich

28. Landolt E., Kandeler R. (1987): Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae), vol. 4. The family of Lemnaceae – a monographic study, vol. 2 Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Zürich

29. Lichtenhaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. Methods in Enzymology 148: 350-382

30. Maluszynska J. Juchimiuk J. (2005): Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju 56: 177-184

31. Marschner H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London

32. Mathé C., Barre A., Jourda C., Dunand C. (2010): Evolution and expression of class III peroxidases. Archives of Biochemistry and Biophysics 500: 58-65

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

34. Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M. H., Ferjani E. E. (1977): Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Science 127: 129-137

35. Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405 410

36. Mkandawire M., Teixeira da Silva J. A., Dudel E. G. (2014): The Lemna bioassay: contemporary issues as the most standardized plant bioassay for aquatic ecotoxicology. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 44: 154–197

37. Mkandawire M., Dudel E. G. (2005): Assignment of *Lemna gibba* L. (duckweed) bioassay for *in situ* ecotoxicity assessment. Aquatic Ecology 39: 151–165

38. Mlinarić S. (2012): Fotosintetska učinkovitost i antioksidativni odgovor mladih i razvijenih listova smokve (*Ficus carica* L.) u uvjetima svjetlosnog stresa. Doktrorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

39. Mohr H., Schopfer P. (1995): Plant physiology. Springer-Verlag, Berlin

40. Naumann B., Eberius M., Appenroth K.-J. (2006): Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. Journal of Plant Physiology 164: 1656-1664

41. Nikolić T. (2013): Sistematska botanika. Alfa d.d., Zagreb

42. Olette R., Couderchet M., Biagianti S., Eullaffroy P. (2008):. Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants. Chemosphere 70: 1414-1421

43. Petelet-Giraud E., Klaver G., Negrel P. (2009): Natural versus anthropogenic sources in the surface- and groundwater dissolved load of the Dommel river (Meuse basin): Constraints by boron and strontium isotopes and gadolinium anomaly. Journal of Hydrology 369: 336–349

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

45. Piotrowska A., Bajguz A., Godlewska-Zyłkiewicz B., Zambrzycka E. (2010): Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58: 594-604

46. Pirson A., Seidel F. (1950): Cell metabolism and physiology in *Lemna minor* root deprived of potassium and calcium, in German. Planta 38: 431-473

47. Prasad M. N. V. i Strzałka K. (1999): Impact of heavy metals on photosynthesis. U: Prasad M. N. V., Hagemeyer J. (ur..), Heavy metal stress in plants. Springer Publishers, Berlin, str. 117-138

48. Prasad M. N. V., Malec P., Waloszek A., Bojko M., Strzałka K. (2001): Physiological responses of Lemna trisulca L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. Plant Science 161: 881-889

49. Quartacci M. F., Pinzino C., Sgherri C. L. M., Dalla Vecchia F., Navari-Izzo F. (2000): Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. Physiologia Plantarum 108: 87-93

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

51. Rahman M. A., Hesegawa H., Ueda K., Maki T., Okumura C., Rahman M. M. (2007): Arsenic accumulation in duckweed (Spirodela polyrhiza L.): A good option for phytoremediation. Chemosphere 69: 493-499

52. Razinger J., Dermastia M., Drinovec L., Drobne D., Zrimec A., Dolenec Koce J. (2007): Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. Environmental Science and Pollution Research International 14: 194-201

53. Rohacek K. (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. Photosynthetica 40(1): 13-29

54. Rowe E. L., Ziobro R. J., Wang C. J. K., Dence C. W. (1982): The use of an alga *Chlorella pyrenoidosa* and a duckweed *Lemna perpusilla* as test organisms for toxicity bioassays of spent bleaching liquors and their components. Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological 27: 289-296

55. Sazsmaz A., Obek E. (2009): The accumulation of arsenic, uranium, and boron in *Lemna gibba* L. exposed to secondary effluents. Ecological Engineering 35: 1564-1567

56. Scherr C., Simon M., Spranger J., Baumgartner S. (2008): Test system stability and natural variability of a *Lemna gibba* L. bioassay. PLoS ONE 3: e3133

57. Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. (1994): Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator of rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. Berlin, Germany: Springer Verlag.

58. Schreiber U. (2004): Plse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: An overview. U: Papageorgiou G. C., Govindjee. (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer. Str. 279-319

59. Severi A. (1991): Effects of aluminium on some morphophysiological aspects on *Lemna minor* L. Atti della Società dei Naturalisti e Matematici di Modena 122: 95-108

60. Sinha S., Gupta M., Chandra P. (1996): Bioaccumulation and biochemical effects of mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L). Environmental Toxicology and Water Quality 11: 105-112

61. Smith S. i Kwan K. H. (1989): Use of aquatic macrophytes as a bioassay nethod to assess relative toxicity, uptake kintetics and accumulated forms of trace metals. Hydrobiologia 188/189: 345-351

62. Sowjanya S., Bog M., Appenroth K.-J. (2016): Taxonomy of duckweeds (Lemnaceae), potential new crop plants. Emirates Journal of Food and Agriculture 28(5): 291-302

63. Steinberg R. (1946): Mineral requirenment of *Lemna minor*. Plant Physiology 21: 42-48

64. Taylor E. J., Morrison J. E., Blockwell S. J., Tarr A., Pascoe D. (1995): Effects of lindane on the predator-prey interaction between *Hydra oligactis* Pallas and *Daphnia magna* Strauss. Archives of Environmenatl Contamination and Toxicology 29: 291-296

65. Toth S. Z. (2006): Analysis and application of the fast Chl *a* fluorescence (OJIP) transient complemented with simultaneous 820 nm transmission measurements. Doktorska disertacija. Université de Genève, Genève

66. Varga M. (2015): Fiziološki odgovor vrste *Lemna gibba* na djelovanje ionskog koloidnog srebra. Doktorska disertacija. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

67. Van der Werff M. i Pruyt M. J. (1982): Long-term effects of heavy metals on aquatic plants. Chemosphere 11: 727-739

68. Vidaković-Cifrek Ž. (1999): Učinak kalcij(II) klorida i kalcij(II) bromida na fiziološke procese u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) i korijenu luka (*Allium ascalonicum* auct.). Doktorska disertacija. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

69. Vidaković-Cifrek Ž., Tkalec M., Šikić S., Tolić S., Lepeduš H.,Pevalek-Kozlina B. (2015): Growth and photosynthetic respones of Lemna minor L. exposed to cadmium in combination with zin or cooper. Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju 66: 141-152

70. Wang W. (1986): Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical 11: 1-14

71. Wang W. (1987a): Chromate ion as a reference toxicant in aquatic phytotoxicity tests. Environmental Toxicology and Chemistry 6: 409-414

72. Wang W. (1990): Literature Review on duckweed toxicity testing. Environmental Research 52: 7-22

73. Welch R. M.(1995): Micronutrient nutrition of plants. Critical Reviews in Plant Science 14: 49-82

74. Wiebke D., Matzke M., Backhaus T. (2006): Heavy metal toxicity of *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. Chemosphere 67: 36-43

75. Xing W., Li D., Liu G. (2010): Antioxidative response of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. Plant Physiology and Biochemistry 48: 873-878

76. Yruela I.(2005): Cooper in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology 17 (1): 145-156

77. Zayed A. M., Gowthaman S., Terry N.(1998): Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants. I. Duckweed. Journal of Environmental Quality 27: 715-721

78. *Lemna minor* L., http://www.fungoceva.it/erbe_ceb/lemma_minor.htm

79. *Lemna trisulca* L., http://www.atlas-roslin.pl/htm/bg/bg-Lemna_trisulca.htm

8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Nina Puhelek. Rođena sam 09. veljače 1993. godine u Zagrebu. U razdoblju od 1999. do 2007. pohađala sam Osnovnu školu Dragutina Domjanića u Svetom Ivanu Zelini. Srednju školu upisala sam 2007. u Sesvetama, smjer opća gimnazija, te pohađala do 2011.

Prvi izbor pri upisu studija bio mi je Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu kojeg sam i upisala 2011. godine. U sklopu stručnih metodičkih praksi održala sam određeni broj predavanja u OŠ Lovre pl. Matačića (biologija) i u Zdravstvenom učilištu (kemija).

Fiziologija bilja biološka je disciplina koja uključuje i velik broj kemijskih procesa. Zbog te integracije biologije i kemije odlučila sam raditi diplomski rad u Laboratoriju za fiziologiju bilja.