

# Vodena leća (Lemna minor L.) kao modelni organizam u toksikološkoj karakterizaciji vode rijeke Save

---

Rubinić, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:579750>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno – matematički fakultet  
Biološki odsjek

Matea Rubinić

Vodena leća (*Lemna minor* L.) kao modelni organizam u  
toksikološkoj karakterizaciji vode rijeke Save

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju za Fiziologiju bilja na Botaničkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## VODENA LEĆA (*Lemna minor* L.) KAO MODELNI ORGANIZAM U TOKSIKOLOŠKOJ KARAKTERIZACIJI VODE RIJEKE SAVE

Matea Rubinić

Rooseveltov trg 6,1000 Zagreb, Hrvatska

Velike količine onečišćivača iz industrijskih otpadnih voda, kanalizacijske vode kao i ispirne vode s poljoprivrednih površina dopijevaju u vodna tijela. U ovom radu procijenjena je kvaliteta vode rijeke Save uzorkovana na četiri lokacije pomoću modelnog organizma vodene leće (*Lemna minor* L.) Kvaliteta vode ispitana je putem Lemna testa te biokemijskih parametara - sadržaja proteina, pigmenata, karbonila i malondialdehida te aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i glutathion-S-transferaze) u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja. Uzorci vode rijeke Save, neovisno o lokaciji, uzrokovali su statistički značajnu inhibiciju rasta i smanjenje sadržaja klorofila i ukupnih proteina, dok je sadržaj karotenoida bio bitno smanjen u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode rijeke Save s tri lokacije - Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Rezultati aktivnosti antioksidacijskih enzima te karbonilacije proteina pokazuju da su uzorci voda sa sve četiri lokacije izazvale oksidativni stres u vodenoj leći, posebice uzorci sakupljeni na lokacijama J i H. Zaključno, rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na prisutnost fitotoksičnih tvari u rijeci Savi. Zbog svoje osjetljivosti vodena leća predstavlja indikatorsku vrstu pogodnu za procjenu stanja vodnih tijela.

(36 stranica, 11 slika, 3 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: vodena leća, biomonitoring, antioksidacijski enzimi, onečišćenje

Voditelj: izv.prof.dr.sc. Sandra Radić Brkanac

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of science  
Division of biology

Graduation thesis

### DUCKWEED (*LEMNA MINOR* L.) AS MODEL ORGANISM IN TOXICOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SAVA RIVER

Matea Rubinić

Rooseveltovo trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

Large amounts of pollutants from industrial wastewater, secondary effluents of sewage treatment plants and run-off from agricultural fields reach water bodies. In this study the quality of Sava river collected at four locations has been evaluated using duckweed (*Lemna minor* L.) as a model organism. Lemna test and biochemical parameters – contents of pigments, proteins malondialdehyde and carbonyls as well as activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase) were evaluated after 7-day exposure period. Samples of Sava river, irrespective of location, caused growth inhibition and decrease of chlorophylls and proteins, while carotenoids decreased in duckweed exposed to water samples Jesenice (J), Hrušćica (H) and Lukavec (L). The changes in antioxidative enzyme activities and protein carbonilation show that samples of Sava river from all locations cause oxidative stress in duckweed, especially water samples J and H. In conclusion, results obtained in this study indicate the presence of phytotoxic substances in Sava river. Due to its sensitivity, duckweed represents an indicator species suitable for assessment of water bodies. (36 pages, 11 figures, 3 tables, 53 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: duckweed, biomonitoring, antioxidant enzymes, pollution

Supervisor: Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviews:

Thesis accepted:

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Testni organizam <i>Lemna minor</i> L. ....	1
1.2. Lemna test .....	2
1.3. Oksidativni stres .....	2
1.4. Antioksidacijski sustav .....	3
1.4.1. Antioksidacijski enzimi .....	4
1.5. Karbonili.....	5
1.6. Lipidna peroksidacija .....	5
1.7. Organski zagađivači u uzorcima vode rijeke Save .....	6
1.8. Cilj rada .....	9
2. Područje istraživanja .....	9
2.1. Geološka pozadina rijeke Save.....	10
2.2. Područje uzorkovanja rijeke Save .....	10
3. Materijali i metode .....	12
3.1. Kultura vodene leće ( <i>Lemna minor</i> L.) u uvjetima <i>in vitro</i> .....	12
3.2. Lemna test i biokemijski pokazatelji u vodenoj leći .....	13
3.2.1. Lemna test ISO 20079 – stopa rasta .....	13
3.2.2. Određivanje sadržaja pigmenata.....	14
3.2.3. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima .....	14
3.2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	16
3.2.5. Određivanje sadržaja karbonila .....	16
3.2.6. Statistička obrada podataka .....	17
4. Rezultati .....	18
4.1. Lemna-test ISO 20079 – stopa rasta.....	18
4.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenata.....	19
4.3. Sadržaj topivih proteina i aktivnost enzima .....	21
4.4. Sadržaj malondialdehida .....	24
4.5. Sadržaj karbonila.....	25
4.6. Pearsonov koeficijent korelacije.....	26
5. Rasprava .....	28
6. Zaključak.....	33
7. Literatura .....	34

## Popis kratica

APOD – askorbat peroksidaza

CNDB – 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

DNPH – dinitrofenilhidrazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

GST – glutation-S-trasferaza

HALMED – Agencije za lijekove i medicinske proizvode

KAT – katalaza

MDA – malondialdehid

ROS – reaktivni oblici kisika

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbiturna kiselina

# 1. Uvod

Zbog napretka industrije, kao i brzog rasta ljudske populacije pa tako i potražnje za hranom, povećava se i količina otpada koju proizvodimo. Velike količine onečišćivača iz otpada nastalog putem industrije i poljoprivrede ulaze u okoliš: zrak, tlo i površinske i podzemne vode (Ali 2016, Radić i sur. 2010). Onečišćenje voda raznim toksičnim sastojcima predstavlja jedan od najkritičnijih problema danas, posebice zbog izvora pitke vode i zaštite vodnih tijela. Površinske i otpadne vode složene su smjese koje mogu sadržavati tisuće različitih onečišćivača (Radić i sur. 2011). Čak i kada onečišćenje ne ulazi direktno u vodna tijela, indirektno može doći putem tla ili zraka. Osim iz zraka, oborine mogu ispirati onečišćivače i s tla i na kraju završiti u vodnim tijelima. Ako je tlo propusno, s vremenom onečišćivači dolaze i do podzemnih voda. Osim putem tla i zraka, vode se mogu onečistiti i preko ciklusa vode u okolišu, kada onečišćena voda isparava pa se zračnim putem u obliku oblaka prenosi na druga područja i oborinama ponovno završava na novom, dotad nezagađenom području. Okoliš je velika zaokružena cjelina i tako ga treba promatrati kada se planira ispuštanje štetnih tvari u njega (Sparling 2016).

Razni instrumenti i standardizirane metode kojima se mogu detektirati onečišćivači i zaključiti kako utječu na okoliš razvijaju se upravo zbog velikog broja onečišćivača (Sparling 2016). Kemijske i fizikalne analize same po sebi nisu dostatne kako bi se identificirali onečišćivači i utvrdili kako utječu na živi svijet, posebno kada se nalaze u subtoksičnim koncentracijama u kojima izazivaju promjene na molekularnoj i/ili staničnoj razini. Zbog toga je najbolje kemijske i fizikalne analize kombinirati s biološkim analizama (Ali 2016, Radić i sur. 2011). Biološke analize koriste modelni organizam koji je izložen zagađenom okolišu (u ovom slučaju vodi) ili onom koji bi mogao biti zagađen te se promatra kako se modelni organizam ponaša (Sparling 2016). Biološki testni sustavi na živim stanicama ili organizmima daju opći odgovor na smjesu onečišćivača prisutnih u vrlo niskim količinama u uzorku, a bez prethodnih informacija o sastavu i svojstvima smjese dobivenih kemijskom analizom (Richter i sur. 2015). U ovom radu procijenjena je kvaliteta vode rijeke Save pri čemu je kao testni sustav korištena vodena leća (*Lemna minor*).

## 1.1. Testni organizam *Lemna minor* L.

Vodena leća iz porodice *Lemnaceae* u prirodi poput plivajućeg saga prekriva velike dijelove vodene površine, prije svega stajaćica i sporih tekućica (niži tokovi rijeka). Široko je



rasprostranjena u slatkovodnim ekosustavima, a ponekad se raširi toliko da prekrije cijelu površinu vode i uzrokuje anaerobne uvjete ispod površine vode. Ima vrlo jednostavnu građu; sastoji se od listića s velikim udjelom aerenhima i korjenčićem ispod površine vode (Ali 2016, Wang 1990). Iako se može seksualno razmnožavati, češća je aseksualna reprodukcija što rezultira velikim brojem istih jedinki (klonova). Većina vrsta iz porodice *Lemnaceae* voli eutrofičke uvjete vode (s puno nutrijenata). Vodena leća je dobar modelni organizam zbog brzine razmnožavanja, vegetativnog razmnožavanja, jednostavne građe, jeftinog uzgoja i široke rasprostranjenosti (Ali 2016, Mackenzie i sur. 2003). S jedne strane vodene leće su visoko osjetljive biljne vrste, a s druge relativno tolerantni organizmi sposobni akumulirati toksične tvari (Wang 1990). Objašnjenje leži u njihovoj mogućnosti prilagodbe određenim uvjetima (Mackenzie i sur. 2003). Ako se kultura vodene leće nalazi u optimalnim uvjetima, biljka će odgovarati na dodatak toksičnih tvari promjenom brzine razmnožavanja i drugih pokazatelja. No, u prisustvu subletalnih količina toksičnih tvari tolerantne biljke mogu preživjeti takve nepovoljne uvjete zahvaljujući brzom razmnožavanju i sposobnosti pohranjivanja toksičnih tvari u vakuolu (Ali 2016).

## 1.2. Lemna test

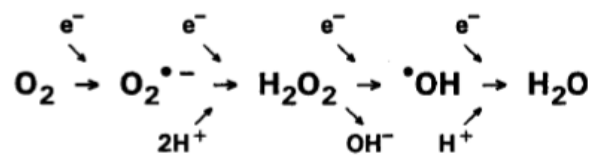
Biljke su, pa tako i vodena leća, na dnu hranidbenog lanca te na taj način mogu prenijeti onečišćivače na više trofičke razine. Zato je vrlo bitno pratiti kako na njih utječe onečišćenje okoliša. S obzirom da je vodena leća brzorastuća malena biljka s optimumom pH od 5 do 9, vrlo je pogodna kao biološki testni organizam. Jedni od najčešćih parametara mjerenih u ekotoksikološkim istraživanjima su parametri rasta. Lemna test je test sa standardiziranim protokolom (ISO/DIS 20079 (2004)) prema kojem je vodena leća izložena testnim vodama sedam dana i nakon toga procjenjuje se inhibicija rasta. Osim parametara rasta, često se mjere i biokemijski parametri kao što su sadržaj pigmenata, aktivnost antioksidacijskih enzima, sadržaj malondialdehida (koji ukazuje na stupanj oksidacijskog oštećenja lipida) i karbonila (koji ukazuje na stupanj oksidacijskog oštećenja proteina) (Radić i sur. 2010, 2011).

## 1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres neizbježan je rezultat života u okolišu bogatom kisikom. Aerobni organizmi za život trebaju kisik, no njegova potrošnja uzrokuje stvaranje potencijalno opasnih reaktivnih oblika kisika (ROS) u koje ubrajamo slobodne radikale i neradikalne molekule koje

također mogu uzrokovati oštećenja (Davies 1995). Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim elektronom i zbog toga često stupaju u kemijske reakcije (Lushchak 2011). Slobodni radikali kisika i dušika neophodni su za fiziološke funkcije u biološkim sustavima i njihova proizvodnja je stalno prisutna u živim stanicama (Halliwell i Gutteridge 2007). Biljke najviše ROS proizvode u kloroplastima u procesu fotosinteze, no oni mogu nastati u različitim dijelovima stanice npr. u mitohondrijima i peroksisomima kao produkti različitih metaboličkih puteva (Dinakar i sur. 2012). Osim u biološkim procesima, ROS u većim količinama mogu nastati pod utjecajem okolišnih čimbenika primjerice onečišćenja, nedostatka ili suviška svjetla, nutrijenata i vode te previsoke ili preniske temperature (Arora i sur. 2002). ROS su opasni jer pokreću niz lančanih reakcija koje mogu oštetiti bitne makromolekule u stanicama kao što su proteini, lipidi i DNA (Davies 1995). Oksidativni stres događa se kada je ravnoteža između ROS i antioksidacijskog sustava u stanicama narušena (Davies 1995).

Kisik redukcijom može proizvesti nekoliko različitih specija radikala i neradikalnih štetnih molekula. Prvi je superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet -}$ ), koji nastaje redukcijom kisika. Dodatnom redukcijom i dodavanjem vodikovih iona nastaju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet OH$ ), hidroksidni ion ( $OH^-$ ) i na kraju voda ( $H_2O$ ) (slika 1). Osim navedenih ROS, postoji još i singletni kisik ( $^1O_2$ ) koji ne nastaje redukcijom, već apsorpcijom elektromagnetske energije koja okrene spin jednog nesparenog elektrona kisika što ga čini nestabilnim. Kada ROS reagiraju s raznim molekulama u stanici mogu stvoriti nove radikale koji su sada reaktivni te tako nastaju oksidativna oštećenja biomolekula što može biti opasno za stanicu pa se ROS moraju ukloniti iz stanice (Davies 1995).



Slika 1. Redukcijski proces kisika (Davies, 1995)

#### 1.4. Antioksidacijski sustav

Kako bi se izbjeglo oštećenje bitnih makromolekula (proteini, lipidi, DNA), proizvedeni ROS uklanjaju se pomoću antioksidacijskog sustava (Halliwell i Gutteridge 2007). Antioksidansi razgradnjom slobodnih radikala zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje. Biljke imaju vrlo kompleksan antioksidacijski

sustav s obzirom da su sesilne i od stresora ne mogu pobjeći kao životinje (Arora i sur. 2002). Antioksidansi se mogu najjednostavnije podijeliti u dvije skupine: neenzimatski i enzimatski antioksidansi. Neenzimatski antioksidansi, kao što su askorbat, tokoferol i karotenoidi najčešće su manje molekule koje reagiraju sa oksidansima i tako ih se rješavaju (Davies 1995).

#### 1.4.1. Antioksidacijski enzimi

Postoji niz enzima koji uklanjaju ROS u stanicama ili kataliziraju ksenobiotike i njihove metabolite. U ovom radu kao biokemijski biomarkeri mjereni su aktivnost katalaze, superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze i glutation-S-transferaze.

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim koji katalizira redukciju dva superoksidna radikala u molekularni kisik i vodikov peroksid. Kako je SOD prisutan u svim aerobnim organizmima i u gotovo svim odjeljcima stanice gdje se stvara kisik pretpostavlja se da ima središnju ulogu u obrani protiv oksidacijskog stresa. Postoje tri različita oblika superoksid dismutaze koji su klasificirane na temelju metalnog kofaktora: bakar/ cink (Cu-Zn SOD), mangan (Mn SOD), i željezo (Fe SOD) i te SOD su locirane u različitim odjeljcima. Fe SOD su locirane u kloroplastima, Mn SOD u mitohondriju i peroksisomu te Cu-Zn SOD u kloroplastu, citosolu i izvanstaničnom prostoru (Alscher i sur. 2002). Vodikov peroksid, produkt SOD, sam po sebi može biti opasan za stanicu, a taj spoj u biljnim stanicama mogu razgraditi dva enzima: askorbat peroksidaza (APOD) i katalaza (KAT). Katalaza je enzim prisutan u gotovo svim aerobnim organizmima (Arora i sur. 2002), a APOD je enzim prisutan samo u biljkama (Asada 1992). Katalaza je hem-sadržavajući enzim koji katalizira dismutaciju vodikovog peroksida u vodu i kisik. Katalaza se nalazi u stanicama svih eukariota i važna je za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u peroksisomima koji nastaje djelovanjem raznih oksidaza poput acil-CoA oksidaza koja sudjeluje u  $\beta$ -oksidaciji masnih kiselina u peroksisomima vegetativnih organa te u glioksisomima tijekom klijanja sjemenki i glikolat oksidaza koja prevodi glikolat nastao u kloroplastima tijekom fotorespiracije u glioksilat (Arora i sur. 2002). Katalaza ima veliku katalitičku aktivnost, ali slabu supstratnu specifičnost jer treba dvije molekule  $H_2O_2$  u aktivnom mjestu. S druge strane, askorbat peroksidaza najvažnija je za detoksifikaciju  $H_2O_2$  u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta. Da bi se reducirala jedna molekula  $H_2O_2$  potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (Asada 1992).

Glutation-S-transferaza (GST) je enzim uključen u detoksikaciju mnogih ksenobiotika i ima važnu ulogu u zaštiti od oksidativnog stresa (Edwards i sur. 2000). Spada u veliku skupinu

enzima II. faze koji elektrofilne ksenobiotike i njihove metabolite čine topljivijim u vodi i tako ih pripremaju za izbacivanje iz organizma. Transferaze su skupina enzima koji kataliziraju pojedine ksenobiotike dodatkom reduciranog glutationa (GSH) elektrofilnim grupama označavajući na taj način spoj za izlučivanje (Edwards i sur. 2000). U biljkama, konjugat ksenobiotika s glutationom se iz citosola brzo prenosi u vakuolu na daljnju preradu. Ekspresija GST je obično povećana u odgovoru na niz ksenobiotika iako one mogu biti inducirane u odgovoru na općenito oštećenje stanica i oksidativni stres uzrokovan herbicidima i kemijskim toksikantima (Dixon i sur. 2002).

Budući da se povećanjem stresa povećava broj radikala u stanicama, povećava se i broj antioksidacijskih enzima te oni mogu služiti kao biokemijski biomarkeri. Povećana aktivnost nekog od antioksidacijskih enzima upućuje na zaključak da je promatrani organizam u oksidativnom stresu (Valavanidis i sur. 2006).

## 1.5. Karbonili

Proteini oštećeni reaktivnim oblicima kisika nakupljaju se tijekom starenja, patoloških procesa te oksidacijskog stresa. Kada ROS izbjegnu antioksidacijske enzime ili kada je njihova produkcija za antioksidacijski sustav, mogu reagirati s biomolekulama, između ostalog i s proteinima. Oksidacijski izazvane promjene proteina dovode do njihove povećane osjetljivosti na proteolizu te do brojnih posljedica u cijelom fiziološkom sustavu, kao što je na primjer inhibicija djelovanja nekih enzima. Kada su proteini oksidirani, na njihovim bočnim lancima nastaju karbonilne skupine (aldehidi i karbonili). Nastale molekule su stabilne što je korisno pri nalaženju njihove lokacije i spremanju/izbacivanju iz organizma. Osim izravnom oksidacijom proteina, karbonilne skupine mogu nastati i reakcijama proteina s drugim molekulama kao što su produkti lipidne peroksidacije. Zbog toga, ako želimo utvrditi količinu proteina koji su oštećeni isključivo direktnom oksidacijom, treba koristiti nekoliko metoda. No, mjerenje količine karbonila nastalih u stanici jedna je od najčešćih metoda za praćenje ukupnog oštećenja proteina (Dalle-Donne i sur. 2003).

## 1.6. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi kada stvaranje toksičnih oblika kisika premaši mogućnosti mehanizama za uklanjanje tih otrova (Alscher i sur. 2002). U tom procesu ROS reagiraju s lipidima, najčešće nezasićenim masnim kiselinama, koje su glavne sastavnice membranskih lipida. U tom procesu

ROS uklanja vodik i na to mjesto umeće kisik te nastaje lipidni peroksil radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Proces se sastoji od tri koraka: inicijacija, propagacija i završetak. U prvom koraku, ROS napada lipide i oduzima im vodik te ga ostavlja kao lipidni radikal ( $\text{L}^\bullet$ ). Nakon toga lipidni radikal reagira s kisikom i stvara peroksil radikal ( $\text{LOO}^\bullet$ ) koji oduzima vodik susjednoj molekuli lipida čineći novi lipidni radikal a sam postaje lipidni hidroperoksid ( $\text{LOOH}$ ). Zadnji korak je završetak, koji se događa samo ako neki antioksidans kao npr. tokoferol donira vodik lipidnom peroksil radikal i zaustavlja proces otimanja vodika susjednom lipidu. Lipidna peroksidacija može rezultirati velikim brojem različitih molekula kao sekundarnih produkata. Jedan od njih je malondialdehid (MDA) iz skupine aldehida. MDA je završni produkt procesa lipidne peroksidacije (Alaya i sur. 2014). Mjerenjem količine MDA možemo zaključiti je li u stanici došlo do lipidne peroksidacije i jesu li lipidi oštećeni (Alaya i sur. 2014, Radić i sur. 2010, 2011).

## 1.7. Organski zagađivači u uzorcima vode rijeke Save

Zadnjih par desetljeća u industriji sintetizirani su i proizvedeni razni organski spojevi koji se koriste u poljoprivredi, medicini, proizvodima za osobnu njegu i samoj industriji. S obzirom na brz rast industrije malo se zna o njihovom utjecaju na ekosustav i ljudsko zdravlje. Uz veliki broj namjerno sintetiziranih spojeva nastaju i njihovi derivati koji dodatno povećavaju broj organskih spojeva o kojima se malo zna (Li 2014, Pal 2010). Najčešće grupe organskih spojeva su pesticidi, farmaceutici i industrijske kemikalije koje se često ponašaju kao zagađivači i mogu loše utjecati na okoliš (Li 2014).

Izvori ulaska organskih zagađivača mogu se podijeliti na točkasti i difuzni izvor. Točkasti izvori mogu se točno definirati i kvantificirati. Primjer točkastih izvora su pojedini industrijski kompleksi i bolnice. S obzirom da se točkasti izvori mogu točno definirati, možemo ih bolje pratiti od difuznih, no oni ispuštaju velike količine otpada u okoliš na jednom mjestu. Difuzni izvori su više raspršeni u prostoru, a primjer su kućanstva. Oni ne ispuštaju velike količine otpada u okoliš pa predstavljaju manju opasnost za okoliš jer dolazi do razrjeđenja. Putevi ulaska otpada u okoliš mogu se podijeliti na odlagališta otpada, životinjski otpad, otpadne vode, poljoprivredni otpad, bolnički otpad, industrijski i kućanski otpad (Li 2014).

U ovom je radu istraživana kvaliteta vode rijeke Save pomoću vodene leće, a kemijskom analizom provedenom u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda utvrđeni su organski zagađivači prisutni u uzorcima vode koji su korišteni za istraživanje. Organski zagađivači u uzorcima testnih voda određeni su pomoću tekućinskog kromatografa UHPLC-

QTOF-MS (engl. liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry), a dobiveni rezultati prikazani su u *Tablici 1*.

*Tablica 1.* Koncentracija organskih zagađivača u uzorcima površinskih voda s četiri lokacije. Brojevi pored zagađivača označavaju broj detektiranih spojeva iz pojedine skupine zagađivača.

		JESENICE $\mu\text{g L}^{-1}$	HRUŠĆICA $\mu\text{g L}^{-1}$	RUGVICA $\mu\text{g L}^{-1}$	LUKAVEC $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>Pesticidi</b> <b>P – 287</b>	Herbicidi -102	0,272	0,447	0,409	0,322
	Fungicidi - 73	0,209	0,314	0,157	0,099
	Insekticidi - 112	0,793	0,533	0,630	0,588
<i>Ukupno P</i>		<i>1,274</i>	<i>1,294</i>	<i>1,196</i>	<i>1,009</i>
<b>Farmaceutici</b> <b>F – 246</b>	Antibiotici (ATB) - 72	1,715	3,377	2,455	1,368
	Analgetici (AG) -21	1,774	0,703	1,185	0,984
	Hipnotici/antikonvulzanti/ anestetici (HIP/AK/AN) - 34	0,164	1,746	1,711	1,459
	Halucinogeni/stimulansi/ nedopuštene droge (HAL/ST/ND) -25	0,979	2,670	3,684	2,164
	Antidepresivi (AD) -17	0,102	0,125	0,107	0,096
	Antiepileptici/neuroleptici (AE/NL) -18	0,179	0,244	0,239	0,221
	Opioidi (O) - 25	0,092	0,168	0,149	0,132
	Kardiovaskularni lijekovi (KV) -13	0,389	1,251	0,536	0,610
	Demencija -1	0,010	0,041	0,033	0,021
	Dodatak prehrani -1	0,086	0,385	0,191	0,213
	Kontrastno sredstvo -1	0,029	0,195	0,089	0,132
<i>Ukupno F</i>		<i>5,518</i>	<i>10,194</i>	<i>10,380</i>	<i>7,400</i>
<b>Steroidni hormoni</b> <b>SH – 18</b>		1,279	0,202	0,187	0,184
<i>Ukupno H</i>		<i>1,279</i>	<i>0,202</i>	<i>0,187</i>	<i>0,184</i>
<b>Industrijske kemikalije</b> <b>IK – 33</b>		5,193	2,573	1,808	2,342
<i>Ukupno IK</i>		<i>5,193</i>	<i>2,573</i>	<i>1,808</i>	<i>2,342</i>
<b>Ukupno P+F+IK - 566</b>		<b>13,265</b>	<b>14,974</b>	<b>13,570</b>	<b>10,935</b>

Iz *Tablice 1* je vidljivo da je određeno preko 500 spojeva koji su sortirani u četiri velike skupine – pesticidi (herbicidi, insekticidi i fungicidi), farmaceutici, hormoni (prirodni i sintetski) i industrijske kemikalije (perfluoroalkilne i polifluoroalkilne tvari, bisfenol A, alkilfenoli).

Farmaceutici su nadalje prema svom djelovanju kategorizirani u veći broj podskupina: antibiotici, hipnotici/antikonvulzanti/anestetici halucinogeni/stimulansi/nedopuštene droge, analgetici, antiepileptici/neuroleptici antidepresivi, opiodi, kardiovaskularni lijekovi i dr. Najveći broj vrsta zagađivača određen kemijskom analizom pripada u skupinu pesticida, no njihova je koncentracija bila niža u odnosu na ukupnu koncentraciju farmaceutika i industrijskih kemikalija. Prema broju vrsta iza pesticida su farmaceutici, koji su ujedno bili detektirani i u najvećoj ukupnoj koncentraciji. U odnosu na pesticide i farmaceutike, najmanji broj vrsta se zasad prati u skupini industrijskih kemikalija, ali je njihova ukupna koncentracija bila veća nego ukupna koncentracija pesticida. Obzirom na lokacije, najviša ukupna koncentracija detektiranih organskih zagađivača utvrđena je u uzorku vode rijeke Save Hrušćica, zatim u uzorcima vode s lokacija Rugvica i Jesenice (slične koncentracije), a najniža u uzorku vode s lokacije Lukavec.

Ukupna koncentracija pesticida u uzorcima vode rijeke Save s različitih lokacija bila je slična. U skupini pesticida, insekticidi su na svim lokacijama rijeke Save izmjereni u većoj koncentraciji nego herbicidi i fungicidi, a najveća koncentracija insekticida zabilježena je u uzorku rijeke Save s lokacije Jesenice.

Ukupna koncentracija farmaceutika bila je znatno veća u uzorcima vode rijeke Save s lokacija Hrušćica i Rugvica u usporedbi s uzorcima vode sakupljenim na lokacijama Lukavec i Jesenice. U skupini farmaceutika najveći broj vrsta otpada na ATB koji su u visokim koncentracijama (naročito od penicilina amoksicilin, kloksacilin i nafcilin, od tetraciklina doksiciklin i tetraciklin, te od sulfonamida sulfapiridin) detektirani u svim uzorcima, a u najvećoj koncentraciji u uzorku vode rijeke Save s lokacije Hrušćica. Farmaceutici iz podskupina HAL/ST/ND su u najvećoj koncentraciji detektirani u uzorku vode rijeke Save s lokacije Rugvica. HIP/AK/AN i AG su također utvrđeni u relativno visokim koncentracijama u uzorcima vode rijeke Save, prva podskupina u najvećoj koncentraciji u uzoru vode s lokacije Hrušćica, a druga podskupina u uzorku vode s lokacije Jesenice. Najveća koncentracija KV izmjerena je u uzorku vode s lokacije Hrušćica. Ostale podskupine farmaceutika zabilježen su u bitno nižoj koncentraciji u uzorcima vode rijeke Save. Od farmaceutika iz skupine HAL/ST/ND najveći udio otpada na kofein, nikotin i kotinin, iz skupine HIP/AK/AN u najvećoj koncentraciji bio je prisutan fenobarbital, iz skupine analgetici u većoj su koncentraciji bili utvrđeni ibuprofen, etodolak i naproksen, a od kardiovaskularnih metoprolol (nije prikazano).

Najveća koncentracija SH, posebice kortikosteroida fludrokortizona te progesterona utvrđena je u uzorku vode s lokacije Jesenice. Od IK, u višim koncentracijama detektirani su nonilfenol, terc-oktilfenol, bisfenol A (najveća koncentracija u uzorku vode s lokacije Jesenice), te terc-oktilfenol etoksilat (najveća koncentracija u uzorku vode s lokacije Hrušćica).

## 1.8. Cilj rada

Cilj predloženog rada je procjena sigurnosti vode i stupnja onečišćenja rijeke Save uzorkovane na četiri lokacije (Jesenice, Rugvica, Hrušćica i Lukavec) putem Lemna testa i pouzdanih biokemijskih pokazatelja toksičnosti – sadržaja pigmenata (klorofila *a* i *b* i karotenoida), sadržaja malondialdehida i karbonila te aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, katalaza, glutation-S-transferaza i askorbat peroksidaza).

## 2. Područje istraživanja

Rijeka Sava izvire u Alpama u Sloveniji te otječe općenito na jugoistok i istok kroz četiri države: Sloveniju, Hrvatsku, Bosnu i Hercegovinu te Srbiju, gdje se, kod Beograda ulijeva u Dunav (Källquist 2008, Orešić 2004). Smještena je na sjeverozapadnom dijelu Panonskog bazena (Brkić 2017). Duljina rijeke Save je 945,5 km, a čak 562 km protječe kroz Hrvatsku. Sava je najbogatiji dunavski pritok. Za opskrbu vodom Save u gornjem toku važne su obilne oborine u planinsko - brdskom gornjem dijelu porječja u Sloveniji. U gornjem dijelu toka rijeka Sava ima snježno-kišni režim, a u srednjem i donjem dijelu toka režim prelazi u kišno-snježni (Orešić 2004). Kroz države koje prolazi, Sava je najbitniji izvor pitke vode te više od 80 % dostupne pitke vode potječe iz akvifera na rijeci Savi (Källquist 2008).

U Savu se ispušta mnogo organskih i anorganskih supstanci iz domaćinskih i industrijskih djelatnosti direktno ili njezinim pritocima. Dokazano je da ispuštanje nutrijenata, metala i ksenobiotika te izmjene u prirodnom toku rijeke utječe na kvalitetu vode pa tako i na zdravlje ljudi i okoliša (Källquist 2008). Zbog smanjenja industrije i izgradnjom pročišćivača vode (Orešić 2004), onečišćenje rijeke Save se smanjilo. Provedbu monitoringa površinskih voda (uključujući i rijeku Savu), koja uključuje uzorkovanje vode, te provedbu fizikalno-kemijskih, bioloških i mikrobioloških analiza popraćeno kontrolom kvalitete obavlja Glavni vodnogospodarski laboratorij Hrvatskih voda. S članstvom RH u EU, prihvaćene su i implementirane Okvirna direktiva o vodama kao i njen dodatak koji sadrži listu prioriternih tvari u vodi o kojima je potrebno podnijeti podatke za kemijski izvještaj u svakoj zemlji članici EU (kako bi se utvrdio napredak u smanjenju zagađenja). Monitoring pri tome treba pokriti brojne elemente kvalitete voda uključujući fizikalno-kemijske, hidromorfološke, biološke i



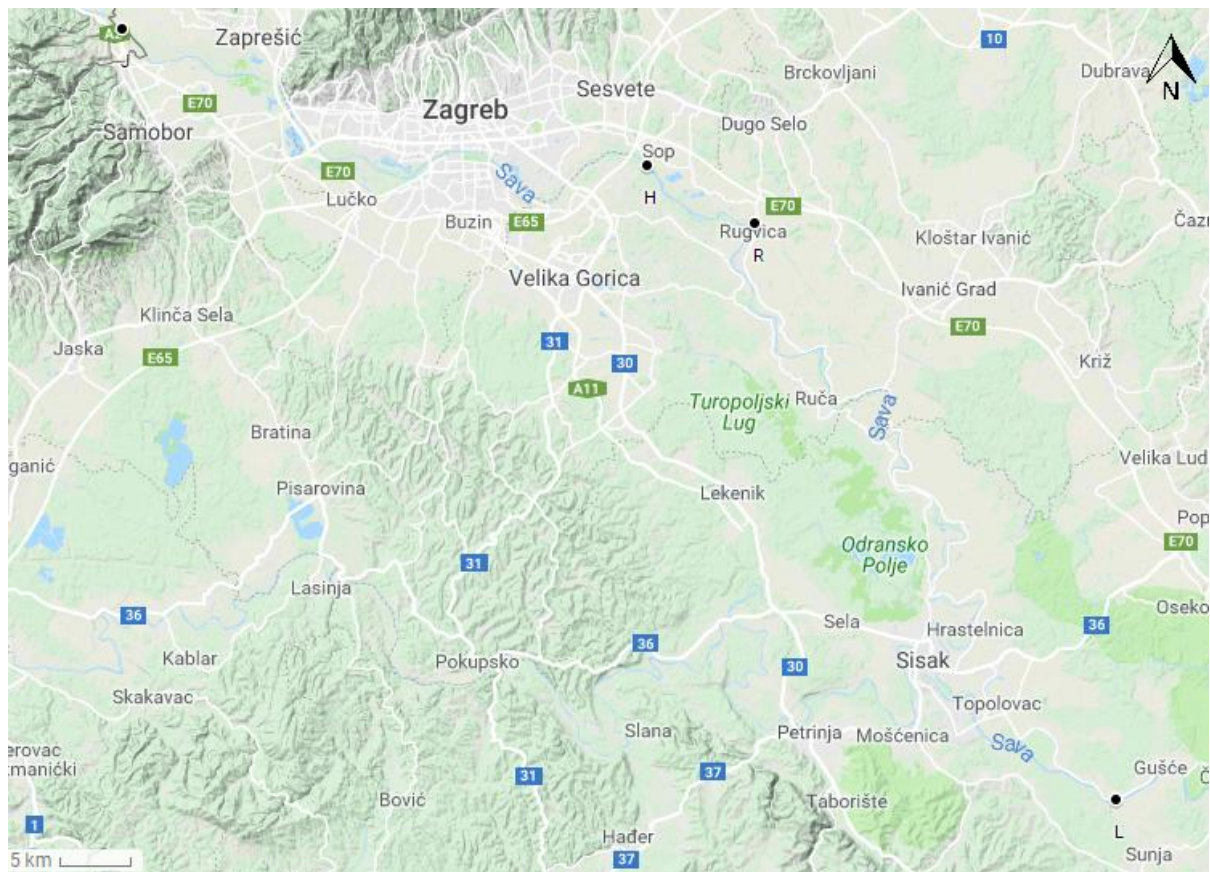
kemijske parametre kako bi se osigurao dobar kemijski i ekološki status vode (Stipaničev, 2011).

## 2.1. Geološka pozadina rijeke Save

Na širem području dva su glavna topografska obilježja koja predstavljaju ekspresiju geološkog okvira: planinski lanci i doline među planinama. Planine Medvednica i Moslavačka gora kao i slavonske planine (Papuk, Krndija, Psunj, Požeška planina i planina Dilj) nalaze se na sjevernom kraju doline rijeke Save. Na južnom kraju dolina je omeđena planinom Žumberak-Samoborsko gorje u Hrvatskoj. U Bosni i Hercegovini to su planine Prosara, Motajica i Majevisa. Ove su planine podignute tijekom razdoblja pliocena i kvartarnog razdoblja. Dolina rijeke Save ispunjena je neogenskim i kvartarnim sedimentima. Uz južnu obalu maksimalna dubina do pre-miocenskih naslaga doseže do 4000 metara. Starija granica kvartara (Donji pleistocen-Srednji pleistocen) predstavlja najzanimljiviju litostratigrafsku granicu i može se pratiti kao regionalni diskontinuitet za vrijeme taloženja. Iznad njega su grubo zrnati sedimenti šljunka i pijeska dok su ispod njega silt i glina. Ta granica nalazi se na maksimalnoj dubini od 300 metara. Podzemne vode koje se akumuliraju iznad ovog sloja u pješćane i šljunčane vodonosnike predstavljaju glavni izvor opskrbe vodom (Brkić 2017).

## 2.2. Područje uzorkovanja rijeke Save

Uzorci vode sakupljeni su na rijeci Savi 14. svibnja 2018. godine na četiri lokacije: Jesenice (J), Hrušćica (H), Rugvica (R) i Lukavec (L) (*slika 2*). Kod planiranja datuma uzimanja uzoraka gledano je da se uzorci sakupe za vrijeme prosječnog vodostaja rijeke Save, a lokacije su odabrane prema dostupnim podacima o stupnju onečišćenja rijeke Save (Babić et al., 2018). Lokacija Jesenice je otprilike 13 km uzvodno od Zagreba i predstavlja slabo do umjereno onečišćenu lokaciju. Lokacija Hrušćice je smještena oko 100 m nizvodno od glavnog kanala Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu, a lokacija Rugvica je smještena otprilike 10 km nizvodno od ispusta postrojenja za obradu otpadnih voda i stoga prima komunalne i industrijske otpadne vode iz Zagreba. Lokacija Lukavec je otprilike 10 km nizvodno od grada Siska, i prima vode nastale proizvodnjom pesticida, iz željezare, rafinerije nafte i komulane vode grada Siska (Babić et al., 2018)



Slika 2. Karta sa lokacijama uzetih uzoraka: J – Jesenice, H – Hrušćica, R – Rugvica, L – Lukavec (izrađeno u Google Maps)

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Kultura vodene leće (*Lemna minor L.*) u uvjetima *in vitro*

*Lemna minor* sakupljena je u Botaničkom vrtu Prirodoslovno–matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 1995. godine, biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnčiću i Devidéu (1980) te dalje uzgajane u akseničnim uvjetima. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je modificirana Pirson-Seidel (PS) hranjiva podloga (Pirson i Seidel 1950), a za predkultivacijsku eksperimentalnu analizu hranjiva podloga po Steinbergu (1946) koja je sterilizirana autoklaviranjem pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta. Sastav hranjivih podloga prikazan je u *Tablici 2*. Tikvice s hranjivim podlogama sterilizirane su autoklaviranjem pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta. Biljke su na modificiranoj Pirson-Seidel podlozi uzgajane u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) na temperaturi  $24 \pm 1$  °C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Em-2s-1}$ ) u klima–komori.

Prije izvođenja samog pokusa, biljke su presađene na Steinbergovu podlogu te uzgajane na njoj tijekom sedam dana radi bolje adaptacije (predkultivacija).

Prije nasadivanja biljaka, uzorcima sakupljenih površinskih voda – Jesenice (J), Rugvica (R), Lukavec (L) i Hrušćica (H) – dodani su makro- i mikroelementi po Steinbergu nakon čega su sterilizirani hladnom filtracijom korištenjem celuloza-nitratnih membrana "Whatman" (veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , promjera 47 mm). Nakon dvotjedne prilagodbe na sterilnoj Steinbergovoj podlozi, pojedinačne zdrave kolonije s 10-11 listića nasadene su u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL koje su sadržavale po 60 mL uzorka filtriranih testnih voda (praćenje rasta), a po desetak kolonija u tikvice od 300 mL (određivanje količine pigmenata, malondialdehida, karbonila, ukupnih proteina, aktivnosti enzima) koje su sadržavale po 130 mL uzoraka testnih voda.

Tijekom predkultivacije i jednotjedne kultivacije za Lemna-test, biljke su uzgajane u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja na temperaturi  $24 \pm 1$  °C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ( $90 \mu\text{Em-2s-1}$ ) u klima–komori.

pH vrijednost kontrolne podloge bio je namješten na 5,50, dok je pH vrijednost podloga s uzorcima vode rijeke Save bila međusobno slična. pH vrijednost uzorka vode rijeke Save s lokacije Jesenice iznosio je 6,88, pH vrijednost uzorka vode s lokacije Rugvice 6,89, pH vrijednost uzorka vode s lokacije Hrušćice 6,85 i pH vrijednost uzorka vode s lokacije Lukavca 6,89.

Svi parametri mjereni su nakon tjedan dana izloženosti testnih biljaka površinskim vodama. Prije mjerenja, biljni materijal je liofiliziran tijekom 24h na -60 °C, uz tlak od 0,01 mbar (liofilizator Alpha 1-2, Christ).

Tablica 2. Sastav hranjivih podloga po Pirsonu i Seidlu (1950) i Steinbergu (1946).

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

## 3.2. Lemna test i biokemijski pokazatelji u vodenoj leći

### 3.2.1. Lemna test ISO 20079 – stopa rasta

Rast biljaka praćen je određivanjem broja frondova tj. listića, mase svježe tvari i mase suhe tvari nakon tjedan dana izlaganja uzorcima površinskih voda. Pri tome je brojana svaka pa i najmanja biljka vidljiva golim okom. Dobiveni podaci uvrštavani su u slijedeći izraz:

$$\text{Stopa rasta} = \frac{\ln x t2 - \ln x t1}{t2 - t1}$$

x t1 – vrijednost promatranog parametra u vremenu t1 (dani)

x t2 – vrijednost promatranog parametra u vremenu t2 (dani)

t2-t1 – vremenski period između dana uzimanja uzorka i početnog dana

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost stope rasta u pet Erlenmeyerovih tikvica  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.2. Određivanje sadržaja pigmenata

Sadržaj pigmenata određen je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena). Liofilizirani biljni materijal izvagan je (10 mg) te su uzorci homogenizirani u mlinu (IST 400) 1 min na 30 000 Hz, zatim je dodan 1,5 mL 80%-tnog hladnog acetona te homogenirano još 1 min na 30 000 Hz. Uzorci su zatim centrifugirani u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 °C 10 minuta na 5 000  $\times$  g. Supernatanti su preliveni u graduirane epruvete. Na preostale taloge dodano je još po 1 mL 80%-tnog hladnog acetona te su uzorci promiješani na tresilici (Vortex) kako bi se eluirao ostatak pigmenata. Nakon ponovnog centrifugiranja, dobiveni supernatanti su dodani odgovarajućem ekstraktu u graduiranim epruvetama. Mjeren je cijeli spektar apsorbancije za svaki uzorak te su zatim očitavani podaci na tri valne duljine: 663, 645 i 470 nm. Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema Lichtenthaleru (1987).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet replika  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

### 3.2.3. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima

Uzorci liofilizacijom osušenog biljnog materijala (20 mg) homogenizirani su u mlinu (IST 400) 1 min na 30 000 Hz, zatim je dodan 1 mL kalij fosfatnog pufera (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH vrijednosti 7,0 s dodatkom 0,5 mM EDTA) te homogenirano još 1 min na 30 000 Hz. Zatim je dodan još 1 mL kalij fosfatnog pufera te netopivi polivinilpolipirrolidon (PVPP). Tako pripremljen homogenat je centrifugiran u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 °C 30 minuta na 30 000  $\times$  g. Dobiveni supernatant iskorišten je za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda (1976), za određivanje aktivnosti enzima te za određivanje sadržaja malondialdehida i karbonila.

Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa Coomassie Brilliant Blue G-250 pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracija proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg/mL).

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitisa i Riesa (1977). Reakcijska otopina je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH

7,8), 13 mM metionin, 75  $\mu$ M kloridne soli nitrotetrazolijevog plavila, 0,1 mM EDTA, 2  $\mu$ M riboflavina te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu. Na 890  $\mu$ l reakcijske otopine dodano je 100  $\mu$ l ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimske otopine koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (15, 30 i 60  $\mu$ L). Riboflavin (10  $\mu$ L) je dodan u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Uzorci su promiješani i stavljeni ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti (superoksidni radikali stvaraju se u prisutnosti fotoreaktivnog riboflavina) te se nakon 10 min mjerenja svjetlost ugasi. NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm. Postotak inhibicije mjeri se prema sljedećoj formuli: % inhibicije = (kontrola A560 – uzorak A560) / kontrola A560. Jedna jedinica aktivnosti SOD-a izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina. Reakcijska otopina za KAT sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aebi 1984) i uzorak (30  $\mu$ L) i mjereno je pad apsorpcije (zbog razgradnje vodikovog peroksida) svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost KAT izražena je kao količina potrošenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u  $\mu$ mol / minuti (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina, a izračunata je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti APOD sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH7), 0,2 mM askorbinske kiseline, 0,1 mM EDTA, 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nakano i Asada 1981) i supernatant (120  $\mu$ L). Vodikov peroksid (10  $\mu$ L) dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja te je praćen pad apsorpcije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi. Aktivnost APOD izražena je kao količina potrošenog askorbata u  $\mu$ mol / minuti (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina, uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST) sadržavala je 100 mM kalij fosfatni pufer (pH6,5), 10 mM reducirani glutation, 1 mM EDTA, 100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) i supernatant (10  $\mu$ L) (Habig i Jacoby 1981). Praćen je porast apsorpcije zbog redukcije supstrata CDBN pomoću SH-grupe od glutationa svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 340 nm. Aktivnost GST izražena je kao količina nastalog produkta u  $\mu$ mol / minuti (jedna jedinica, 1 U) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet replika  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida

Kako bi se odredio sadržaj malondialdehida (MDA) krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješano je 400  $\mu\text{L}$  supernatanta s 600  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina (TBA) otopljena u 10%-tnoj trikloroocenoj kiselini). Kao slijepa proba korištena je reakcijska smjesa. Uzorci i slijepa proba prelivevi su u staklene semimikroeprovete te zagrijavani u sušioniku 30 min na 95 °C. Nakon toga uzorci su naglo ohlađeni na ledu te centrifugirani 10 min na 10 000  $\times$  g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol/g<sub>su.tv.</sub> uz ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet replika  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.5. Određivanje sadržaja karbonila

Određeni volumen supernatanta (200  $\mu\text{L}$ ) koji sadrži najmanje 0,5 mg/mL proteina pomiješan je s 300  $\mu\text{L}$  dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepa proba korišten je alikvot istog uzorka (200  $\mu\text{L}$ ) pomiješan samo s 2 M HCl-om (300  $\mu\text{L}$ ). Pripremljeni uzorci inkubirani su 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije je slijedila precipitacija proteina s 500  $\mu\text{l}$  10% trikloroocetne kiseline, hlađenje uzoraka par minuta na -20 °C te centrifugiranje 10 minuta na 12 000  $\times$  g. Dobiveni talog je ispiran u smjesi etanol/etilacetata u omjeru 1:1 (3  $\times$  500  $\mu\text{l}$ ) kako bi se uklonio nevezani reagens. Zatim je na talog dodano 1 ml 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) te su uzorci radi bržeg otapanja taloga stavljeni u ultrazvučnu kupelj oko 30 min. Sadržaj karbonila koji se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH određen je spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur. 1990). Količina nastalih karbonila izražena je nmol po miligramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet replika  $\pm$  standardna devijacija.

### 3.2.6. Statistička obrada podataka

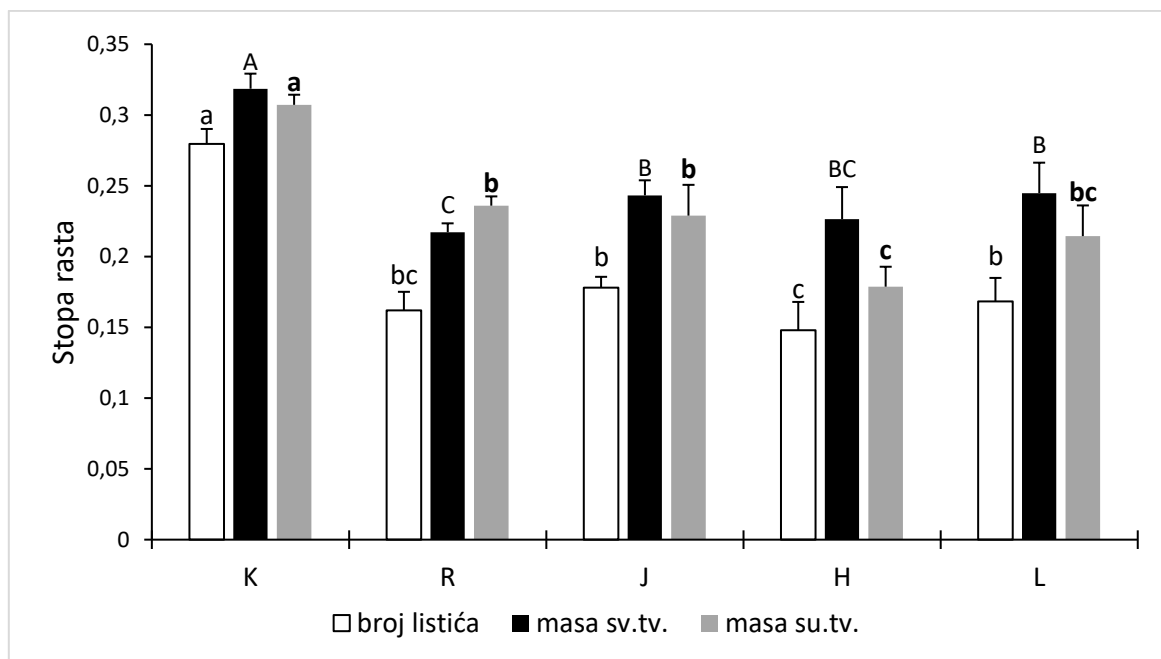
Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz provedeni su korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa. Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom aritmetička je sredina pet replika. Razlike između eksperimentalnih grupa testirane su jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrani su rezultati koji su se razlikovali na razini  $p \leq 0,05$ . Također, izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije za promatrane parametre.



## 4. Rezultati

### 4.1. Lemna-test ISO 20079 – stopa rasta

Stopa rasta izražena putem nekoliko parametara (broj listića, masa suhe tvari i masa svježe tvari) nakon sedam dana izlaganja vodene leće uzorcima vode sakupljene na rijeci Savi i kontrolne podloge prikazana je na slici 3. Stopa rasta vodene leće, neovisno o parametru, bila je statistički značajno smanjena pod utjecajem uzoraka vode rijeke Save u odnosu na kontrolu. No, broj listića se pokazao kao najosjetljiviji parametar rasta jer je inhibicija rasta u vodenoj leći izloženoj uzorcima voda izražena preko tog parametra bila najveća - 37-47% u odnosu na kontrolu. Stopa rasta izražena preko mase svježe tvari u vodenoj leći nakon izlaganja bila je smanjena 24-32%, a stopa rasta izražena preko mase suhe tvari bila je smanjena 24-42% u odnosu na kontrolu.



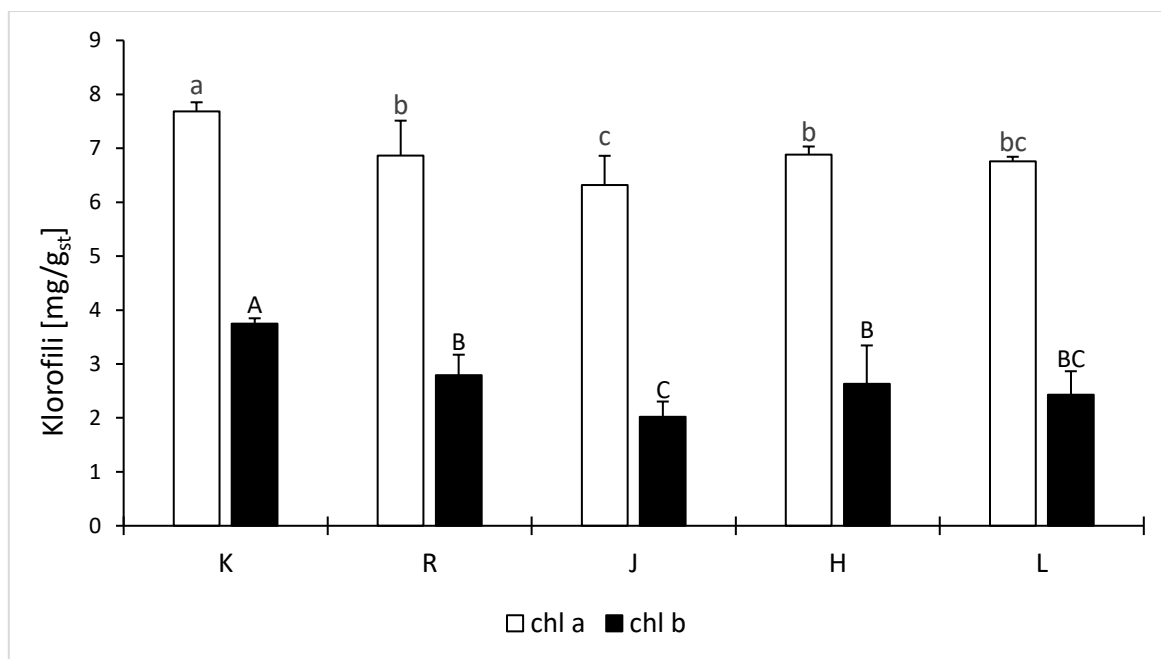
Slika 3. Stopa rasta izražena prema broju listića, masi svježe tvari i masi suhe tvari u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Što se tiče vizualnih simptoma, svi uzorci rijeke Save uzrokovali su klorozu mladih listića, posebno uzorak vode s lokacije Jesenice. Drugi simptomi toksičnosti primjerice nekrotičke promjene, razdvajanje kolonija na pojedinačne listiće ili odbacivanje korijena nisu bili vidljivi.

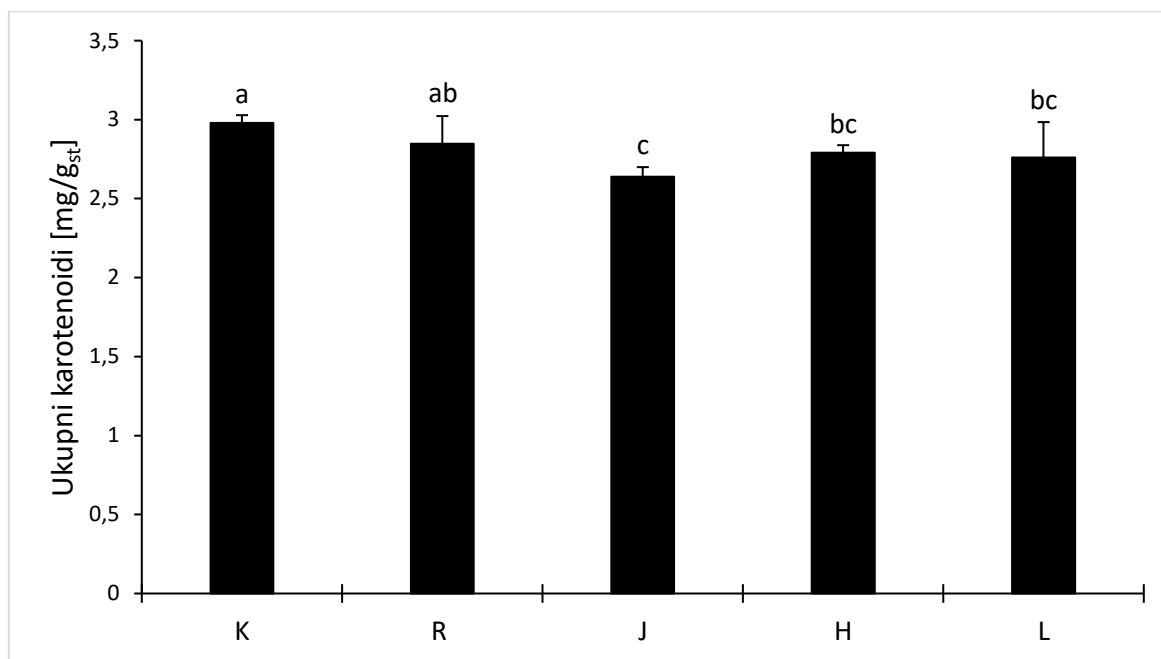
Na slici 4. prikazana je količina klorofila *a* i *b* mjerena u uzorcima vodene leće nakon sedam dana izlaganja vodene leće uzorcima vode sakupljene na rijeci Savi. Svi uzorci vode rijeke Save, naročito uzorak vode s lokacije Jesenice, uzrokovali su statistički značajno smanjenje sadržaja klorofila *a* i *b* vodene leće nakon tjedan dana pokusa.

Slično kao i kod klorofila *a*, količina klorofila *b* u vodenoj leći izloženoj svim uzorcima vode rijeke Save, posebice uzorku vode s lokacije Jesenice, bila je značajno je smanjena u odnosu na kontrolu.



Slika 4. Sadržaj klorofila *a* i *b* (mg/g suhe tvari) u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

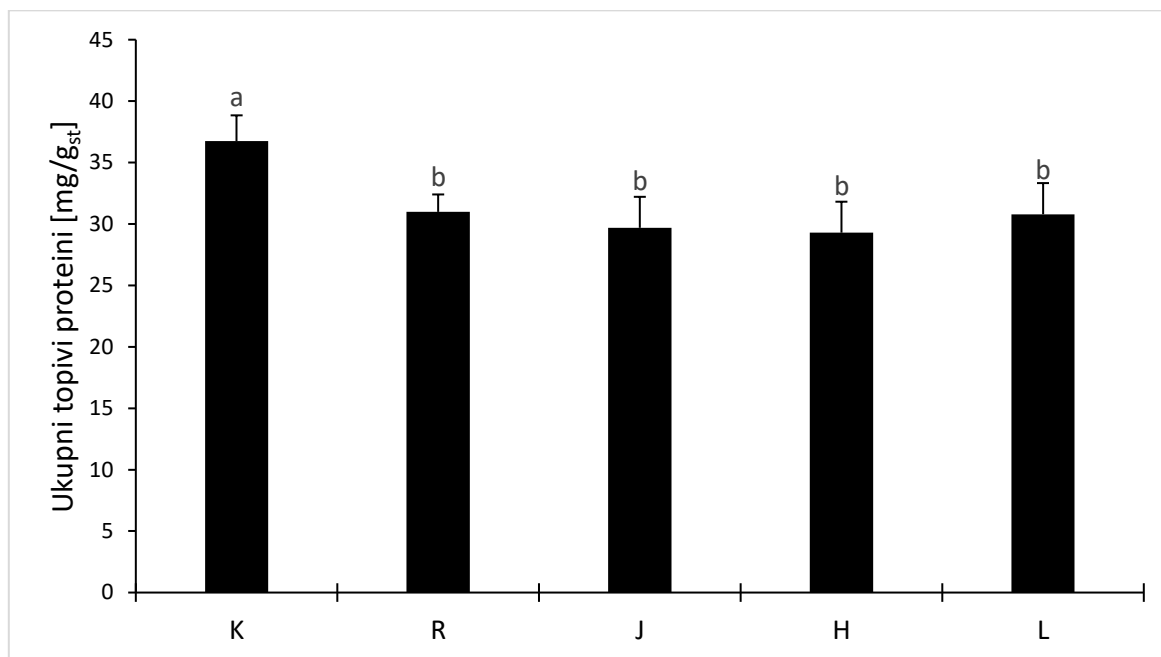
Na slici 5. prikazana je količina karotenoida mjerena u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Sadržaj karotenoida u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode s lokacije Lukavec, Hrušćica i posebno Jesenice, bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu, dok uzorak vode s lokacije Rugvica nije uzrokovao statistički značajno odstupanje od kontrole.



Slika 5. Sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g suhe tvari) u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

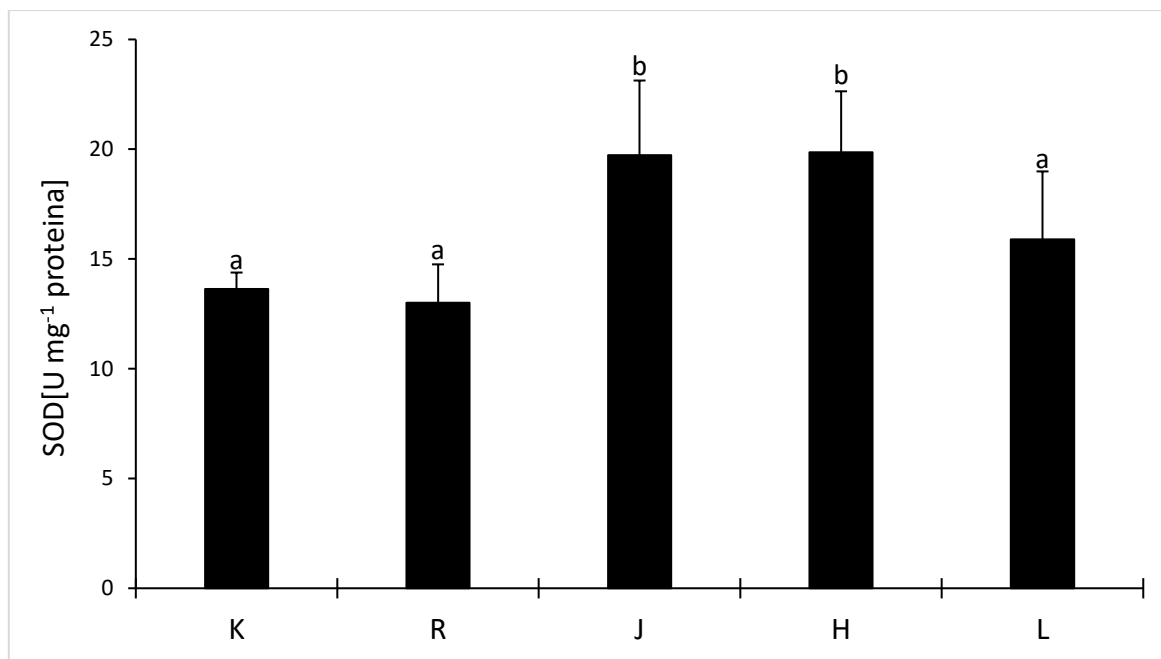
### 4.3. Sadržaj topivih proteina i aktivnost enzima

Na slici 6. prikazana je količina ukupnih topivih proteina mjerena u uzorcima vodene leće nakon sedam dana izlaganja vodene leće. Svi uzorci rijeke Save izazvali su statistički značajno i međusobno podjednako smanjenje količine proteina u odnosu na kontrolu.



Slika 6. Sadržaj proteina (mg/g suhe tvari) u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

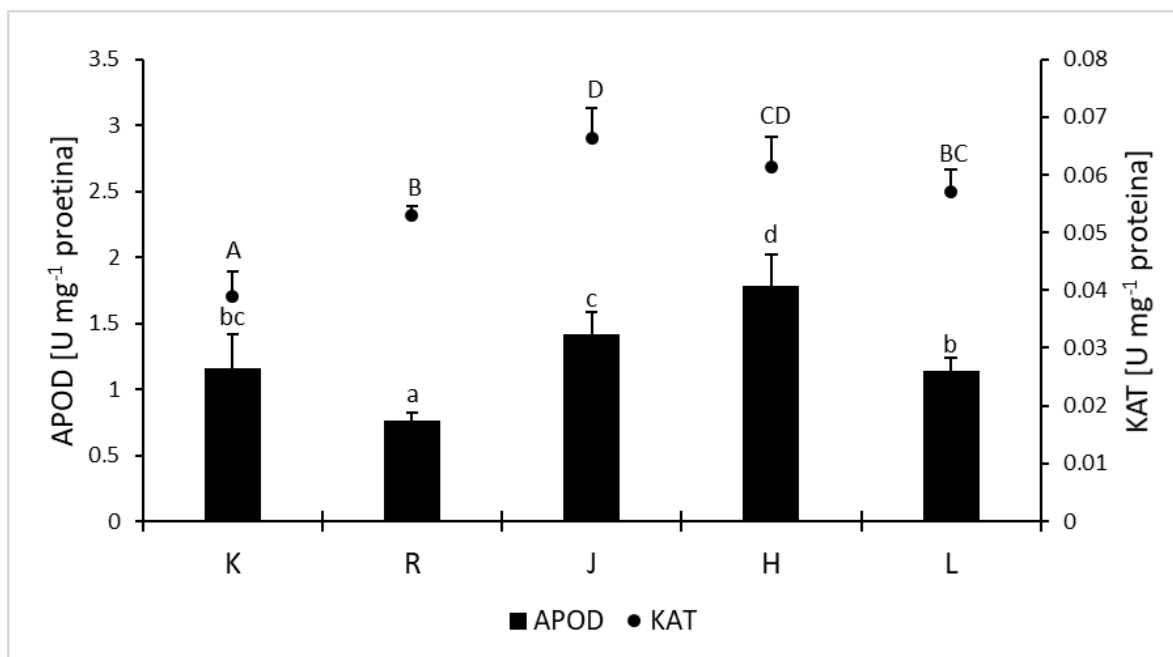
*Slika 7.* prikazuje aktivnost superoksid dismutaze mjerene u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Značajan porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu zabilježen je u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode s lokacija Jesenice i Hrušćica dok uzorci vode s lokacija Rugvica i Lukavec nisu utjecali na aktivnost tog enzima.



*Slika 7.* Aktivnost superoksid dismutaze (SOD, U/mg proteina) mjerena u uzorcima vodene leće nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

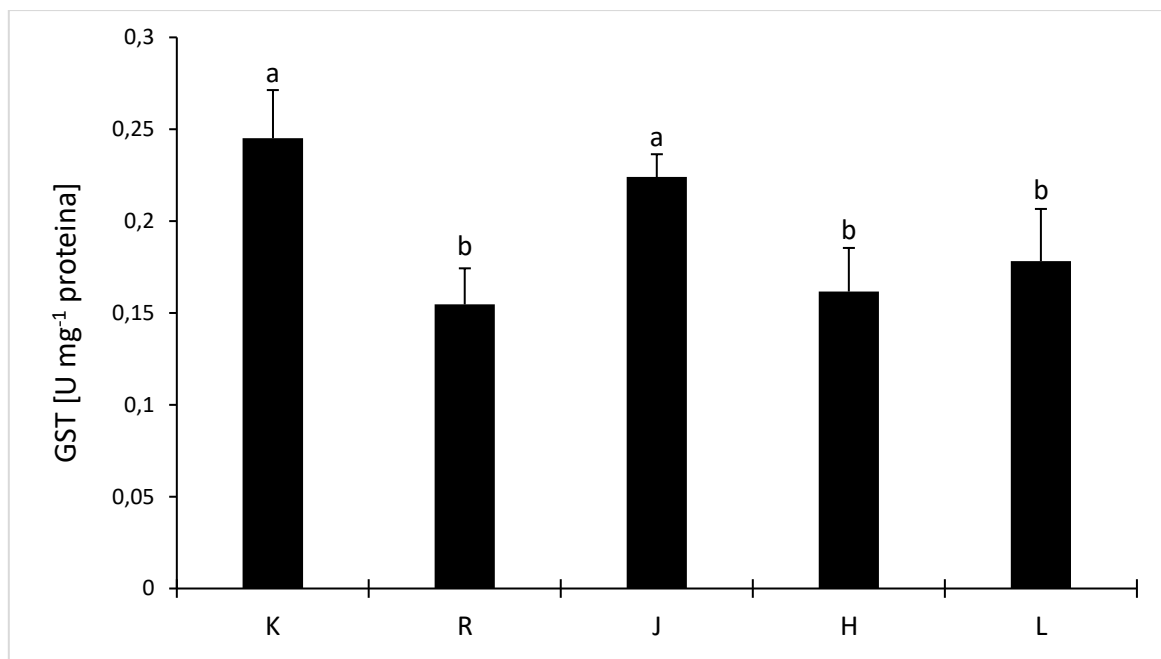
Na *slici 8.* prikazana je aktivnost katalaze i askorbat peroksidaze mjerena u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save. Aktivnost katalaze u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode rijeke Save bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu i to u slijedu od najveće prema najmanjoj vrijednosti aktivnosti:  $J > H > L > R$ .

Uzorci vode s lokacije Lukavec uzrokovali su bitno povećanje aktivnosti APOD, a uzorci vode s lokacije Rugvica značajno smanjenje tog enzima u odnosu na kontrolu. značajno je povećana za Lukavec, a značajno smanjena za Rugvicu. Aktivnost APOD u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode s lokacija Jesenice i Hrušćica bila je slična kontrolnim vrijednostima.



Slika 8. Aktivnost katalaze (KAT, U/mg proteina) i askorbat peroksidaze (APOD, U/ mg proteina) mjereni u uzorcima vodene leće nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

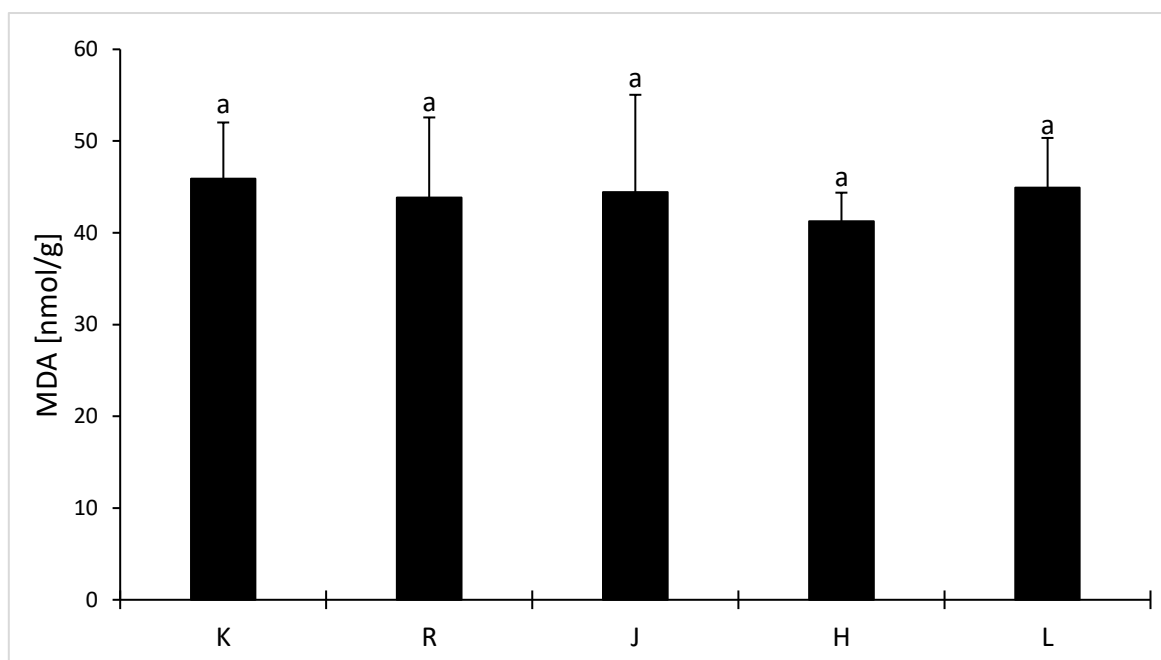
Aktivnost glutation-S-transferaze mjerena u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save prikazana je na *slici 9*. Aktivnost GST u vodenoj leći izloženoj uzorcima vode s lokacija Rugvica, Hrušćica i Lukavec bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu dok uzorak vode s lokacije Jesenice nije izazvao promjenu u aktivnosti tog enzima u usporedbi s kontrolnim vrijednostima.



*Slika 9.* Aktivnost glutation-S-transferaze (GST, U/mg proteina) mjerena u uzorcima vodene leće nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Sadržaj malondialdehida

Jedan od pokazatelja stresa u biljkama je stupanj lipidne peroksidacije, koji se određuje mjerenjem malondialdehida, jednim od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. Sadržaj malondiladehida mjeren u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save bio je sličan kontrolnim vrijednostima (*Slika 10*).

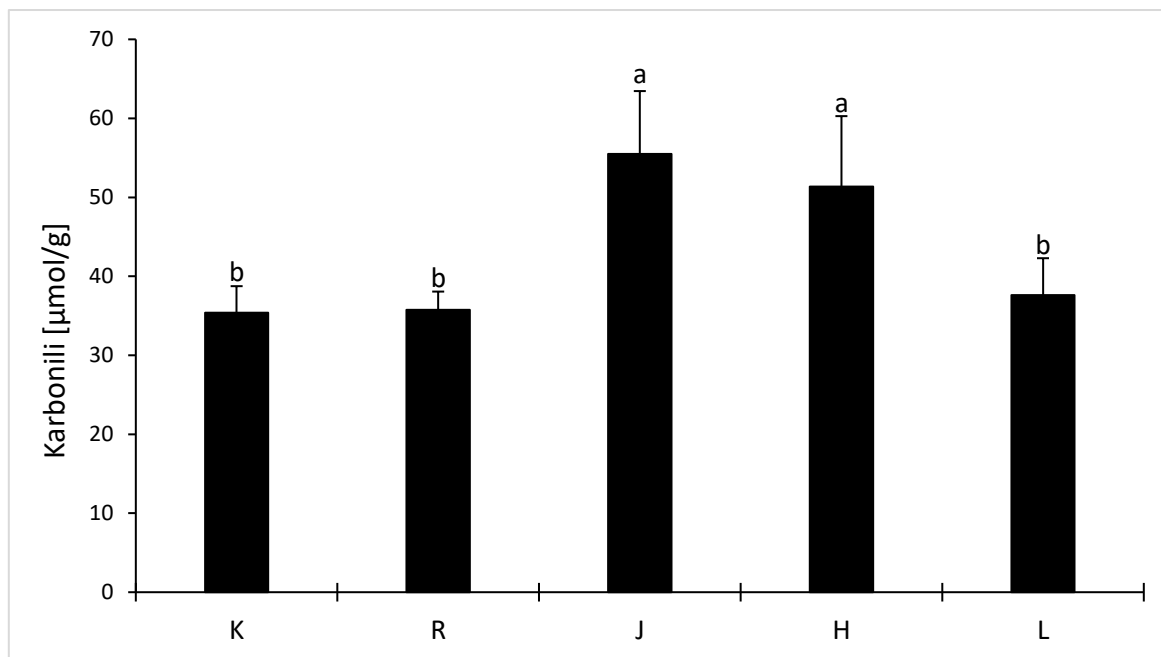


Slika 10. Sadržaj malondialdehida (MDA, nmol/g suhe tvari) u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Sadržaj karbonila

Karbonili nastaju pri oksidaciji proteina pa su prema tome dobri pokazatelji prisutnosti oksidacijskog stresa. Sadržaj karbonila mjereno u vodenoj leći nakon sedam dana izlaganja uzorcima vode rijeke Save prikazan je na slici 11. Značajno povišenje sadržaja karbonila u odnosu na kontrolu utvrđeno je u biljkama izloženim uzorcima voda s lokacija Jesenice i Hrušćica, dok uzorci voda s lokacija Rugvica i Lukavec nisu uzrokovali oksidacijsko oštećenje proteina.





Slika 11. Sadržaj karbonila ( $\mu\text{mol/g}$  suhe tvari) u vodenoj leći nakon sedam dana rasta na kontrolnoj podlozi (K) te na podlozi koja je sadržavala uzorke vode rijeke Save sakupljene na lokacijama Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) i Lukavec (L). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. Pearsonov koeficijent korelacije

Za sve varijable mjerene u uzorcima vodene leće izračunat je Pearsonov koeficijent korelacije koji je prikazan u *Tablici 3*. Sve tri varijable rasta (broj listića, masa svježe i suhe tvari) pokazuju vrlo jaku međusobnu korelaciju. Klorofil *a* i karotenoidi pokazuju umjerenu korelaciju s rastom dok je jaka korelacija utvrđena između rasta i klorofila *b*. Proteini pokazuju jaku korelaciju s parametrima rasta i s pigmentima. Parametri rasta također pokazuju jaku korelaciju sa aktivnosti GST. Aktivnost SOD je u umjerenoj korelaciji sa klorofilom *a* i *b* i proteinima, a s karotenoidima u jakoj korelaciji. Korelacija između navedenih metoda je obrnuto proporcionalna te stoga ima negativni predznak. Vrlo jaka korelacija s negativnim predznakom utvrđena je između aktivnosti katalaze i pigmenata, a jaka negativna korelacija između aktivnosti KAT i rasta i proteina. Sadržaj karbonila pokazuje jaku negativnu korelaciju s pigmentima, a vrlo jaku korelaciju sa enzimom SOD.

Tablica 3. Pearsonov koeficijent korelacije za varijable mjerene u uzorcima vodene leće

Varijabla	Fronđ	Fw	dw	kl a	kl b	karot	prot	Sod	apx	cat	Gst	mda	co
Fronđ	1,000												
fw	0,913	1,000											
dw	0,881	0,787	1,000										
kl a	0,627	0,567	0,566	1,000									
kl b	0,739	0,674	0,688	0,906	1,000								
karot	0,524	0,456	0,508	0,967	0,881	1,000							
prot	0,737	0,745	0,677	0,703	0,710	0,696	1,000						
sod	-0,374	-0,139	-0,426	-0,681	-0,565	-0,769	-0,528	1,000					
apx	-0,234	-0,078	-0,441	-0,396	-0,228	-0,440	-0,269	0,509	1,000				
cat	-0,785	-0,745	-0,741	-0,844	-0,861	-0,811	-0,687	0,515	0,480	1,000			
gst	0,793	0,786	0,724	0,212	0,397	0,112	0,588	-0,033	0,066	-0,388	1,000		
mda	0,140	0,275	0,168	0,352	0,154	0,318	0,421	-0,230	-0,187	-0,269	0,148	1,000	
co	-0,273	-0,174	-0,293	-0,708	-0,574	-0,786	-0,485	0,804	0,465	0,476	0,139	-0,190	1,000

## 5. Rasprava

U ovom radu procijenjena je kvaliteta vode rijeke Save (uzorkovane na četiri lokacije) putem Lemna testa u kombinaciji s biokemijskim pokazateljima (sadržaj klorofila *a* i *b* i karotenoida, sadržaj proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima – superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i glutation-S-transferaze te sadržaj malondialdehida i karbonila). U uzorkovanoj vodi rijeke Save određeno je niz organskih zagađivača pomoću tekućinskog kromatografa UHPLC-QTOF-MS (engl. liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry) u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda te su ti podaci korišteni u ovom radu.

Dokazano je da farmaceutici uzrokuju povećan mortalitet riba, smanjuju raznolikost planktona, inhibiraju rast cijanobakterija i mnogih vodenih biljaka (Reinhold i sur. 2010). Generalno, ukupna koncentracija mjerenih farmaceutika u uzorcima vode rijeke Save bila je bitno viša u odnosu na ostale skupine organskih zagađivača (*tablica 1*). Najviša i gotovo podjednaka koncentracija farmaceutika izmjerena je u uzorcima vode s lokacija Hrušćica i Rugvica, zatim nešto niža u uzorku s lokacije Lukavec te najniža u uzorku s lokacije Jesenice. Prema godišnjim izvješćima Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) o korištenju lijekova od 2005. do 2016. u prošlom stoljeću je došlo do 60% povećanja korištenja farmaceutika (HALMED 2018).

Parametri rasta osnova su svakog toksikološkog istraživanja. U ovom radu korištena su tri parametra rasta: broj listića, masa svježe i masa suhe tvari. Neka su istraživanja pokazala da je broj listića kao parametar najmanje pouzdan u usporedbi s drugim parametrima rasta (Mohan i Hosetti 1999, Wang 1990). No, u uzorcima vode rijeke Save svi su parametri rasta nakon sedam dana izlaganja vodene leće uzorcima vode bili značajno smanjeni u odnosu na kontrolu. Dapače, najveći postotak inhibicije rasta utvrđen je kada se kao parametar rasta koristio broj listića. Također, svi parametri rasta pokazuju vrlo jaku međusobnu korelaciju. Stoga možemo zaključiti da je broj listića bio osjetljiviji parametar rasta u usporedbi s masom suhe odnosno svježe tvari. Stopa rasta izražena po broju listića i masi suhe tvari bila je najniža u vodenoj leći izloženoj vodi s lokacije Hrušćica u kojoj je utvrđena i najviša koncentracija antibiotika i to poglavito iz skupine sulfonamida, tetraciklina i penicilina. No, koncentracija te podskupine farmaceutika bila je relativno visoka i u drugim uzorcima vode. U istraživanju Brain i sur. (2004) u kojem je *L.gibba* izložena antibioticima (22 ATB) tijekom sedam dana također je utvrđena inhibicija rasta te kloroza listića, pogotovo u odgovoru na antibiotike iz skupine sulfonamida i tetraciklina. U tom je istraživanju broj listića kao parametar rasta bio osjetljiviji

od mase svježeh tvari, a parametri pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b*, karotenoidi) su bili manje osjetljiviji od parametra rasta što je sukladno rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu. Naime, sadržaj klorofila *a* bio je smanjen 11-18%, sadržaj klorofila *b* 25-44%, a sadržaj karotenoida 5-11% u odnosu na kontrolu. Također, kao i u istraživanju Brain i sur. (2004), klorofil *b* je bio najosjetljiviji parametar pigmenata. Iako su parametri pigmenata u usporedbi s parametrima rasta bili manje osjetljivi, pigmenti su dobra dopuna Lemna testu zato što ukazuju na oštećenja u procesima različitim od diobe stanica (Greenberg i sur. 1992). U ovom su diplomskom radu parametri rasta pokazali dobru korelaciju s količinom klorofila. Smanjena koncentracija klorofila može utjecati na rast, s obzirom da je fotosinteza glavni izvor energije za biljke. Pad u sadržaju klorofila i karotenoida može biti odgovor na toksičnost raznih onečišćivača, uključujući i metale (Radić i sur. 2011).

Od drugih podskupina farmaceutika detektiranih u uzorcima vode rijeke Save, u visokim koncentracijama su također izmjereni HAL/ST/ND (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Rugvica, pa zatim Hrušćica i Lukavec), zatim HIP/AK/AN (visoke u uzorcima vode s lokacije Hrušćica, Rugvica i Lukavec), analgetici (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Jesenice, Rugvica i Lukavec) i kardiovaskularni lijekovi (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Hrušćica). Od farmaceutika iz skupine HAL/ST/ND najveći udio otpada na kofein, nikotin i kotinin, iz skupine HIP/AK/AN u najvećoj koncentraciji bio je prisutan fenobarbital, iz skupine analgetici u većoj su koncentraciji bili utvrđeni ibuprofen, etodolak i naproksen, a od kardiovaskularnih metoprolol. Brain i sur. (2004) su utvrdili da nikotin, kofein i kotinin nisu pokazali fitotoksično djelovanje na *L. gibbu* tako da ti spojevi vjerojatno nisu pridonijeli inhibiciji rasta vodene leće izložene uzorcima voda s lokacija Hrušćica, Rugvica i Lukavec. S druge strane, utvrđeno je da su ibuprofen i naproksen (analgetici iz skupine nesteroidnih antiupalnih lijekova) uzrokovali snažnu inhibiciju rasta *L. minor* nakon sedam dana izlaganja, dok metoprolol nije (Cleuvers 2003). Rezultati tog istraživanja navode na zaključak da su analgetici vjerojatno utjecali na inhibiciju rasta vodene leće, naročito biljaka izloženih uzorku vode s lokacija Jesenice i Rugvica. Što se tiče industrijskih kemikalija, koncentracija alkil fenola i bisfenola A u svim uzorcima voda, posebice uzorku vode s lokacije Jesenice, bila je višestruko viša u odnosu na perfluoroalkilne i polifluoroalkilne tvari. Nonilfenol i oktilfenol su glavni metaboliti koji nastaju razgradnjom alkilfenol etoksilata, a koriste se kao neionski surfaktanti u kemijskim agensima za čišćenje i sredstvima za dezinfekciju, a bisfenol A se koristi u proizvodnji polikarbonata i epoksi smola. Svi su ti spojevi široko zastupljeni jer se koriste u proizvodnji deterđentata i PET ambalaže. Bisfenol A pokazuje estrogensku aktivnost, a alkilfenol etoksilati djeluju kao endokrini

disruptori (Amiridou i Voutsas 2011). U istraživanju Mihaich i sur. (2009) utvrđeno je da bisfenol A uzrokuje inhibiciju rasta u vodenoj leći *L. gibba* ali pri visokoj ( $EC_{50}$  20 mg/L), okolišno nerelevantnoj koncentraciji te su se osjetljivijim pokazali za taj spoj zelena alga *Selenastrum capricornutum* i morska dijatomeja *Skeletonema costatum*. Slično je utvrđeno za učinak industrijskih otpadnih voda s visokom koncentracijom surfaktanata (0,6 mg/L) na *L. minor* nakon sedam dana izlaganja (Basiglioni i sur. 2018). U tom je radu zamijećena inhibicija rasta i smanjenje koncentracije klorofila u vodenoj leći koja je mogla biti posljedica ne samo djelovanja surfaktanata nego i teških metala (Basiglioni i sur. 2018). U uzorcima vode rijeke Save nije bila mjerena koncentracija teških metala, no oni su također mogli pridonijeti primijećenom fitotoksičnom učinku. Dokazano je da prisutnost teških metala u vodenoj leći može utjecati na inhibiciju rasta (Horvat i sur. 2007) i da zamjena  $Mg^{2+}$  u molekuli klorofila sa nekim drugim ionima metala kao što su Cu, Zn, Cd, Hg, Pb i Ni mogu izazvati poremećaj u fotosintezi. Teški metali negativno utječu na fiziološke procese u biljkama, a njihov učinak se vidi uglavnom kao smanjen rast i masa, kloroze i nekroze, ali i mogućnost biljke da primi neophodne hranjive tvari iz vode (Das i sur. 1997).

Iako je brojnost vrsta pesticida iz *tablice 1.* najveća, koncentracija je bila niža u usporedbi s farmaceuticima i industrijskim kemikalijama, a to se može objasniti vremenom uzorkovanja vode rijeke Save. Uzorci su uzeti u rano proljeće, a za vrijeme zime korištenje pesticida je smanjeno te ponovna upotreba kreće kasnije u proljeće (Babić i sur. 2018). U toj su skupini bili najbrojniji insekticidi pa herbicidi od kojih su u nešto višim koncentracijama zabilježeni terbutilazin, glifosat, nikosulfuron i rimsulfuron, Ti su herbicidi u najvećoj koncentraciji bili utvrđeni u uzorcima vode s lokacije Hrušćica, zatim Rugvica i Lukavec. Ti herbicidi negativno djeluju na fotosintezu ili sintezu aminokiselina u biljaka (Cedergreen i sur. 2007). Autori tog rada su izlagali nekoliko poljoprivrednih kopnenih biljnih vrsta, alge i vodenu leću pojedinačnim i kombinaciji herbicida te su utvrdili puno veću osjetljivost kopnenih biljaka u odnosu na alge i vodenu leću. Stoga su herbicidi prisutni u uzorcima vode rijeke Save vjerojatno imali slabiji učinak na parametre rasta i pigmenta, naročito zato jer su bili prisutni u puno nižim koncentracijama u usporedbi s onima korištenim u istraživanju Cedergreen i sur. (2007).

Funkcija antioksidacijskih enzima u svim živim organizmima je uklanjanje ROS i stranih molekula iz organizma. Povećana aktivnost antioksidacijskih enzima može ukazivati na oksidacijski stres i prisutnost onečišćivača u uzorcima vode (Valavanidis i sur. 2006). I organski i anorganski zagađivači mogu utjecati na stvaranje ROS i time povećavati oksidacijski stres

(Arora 2002). No, prisutnost metala može inhibirati neke enzime i smanjiti njihovu aktivnost (Van Assche i Clijsters 1990).

Aktivnost SOD bila je povećana u vodenoj leći izloženoj uzorcima voda s lokacija Jesenice i Hrušćica. Taj enzim katalizira razgradnju superoksidnog iona (Arora i sur. 2002, Davies 1995) što navodi na zaključak da mikropolutanti prisutni u vodi s tih lokacija uzrokuju povećanu produkciju superoksidnog iona. U tim je uzorcima voda utvrđen i povećan sadržaj karbonila, koji ukazuju na povećanu oksidaciju proteina. Ta dva parametra, SOD i karbonili, pokazuju jaku međusobnu korelaciju pa bi se moglo zaključiti da su superoksidni ioni primarno odgovorni za oksidacijsko oštećenje proteina. Izuzev superoksidnog iona, hidroksilni ion (koji može nastati od superoksidnog iona) i singletni kisik mogu izazvati oksidacijski izazvane promjene proteina (Dalle-Donne 2003).

Povećana aktivnost katalaze u uzorcima vode rijeke Save sa svih lokacija, posebice s lokacija Hrušćica i Jesenice ukazuje na stvaranje vodikovog peroksida u vodenoj leći, budući da taj enzim razgrađuje vodikov peroksid. Sukladno tome, utvrđena je umjerena korelacija između aktivnosti katalaze i SOD. Povećana aktivnost katalaze te istovremeno nepromijenjena aktivnost SOD u vodenoj leći izloženoj uzorcima voda s lokacija Rugvica i Lukavec ukazuju na povećanu produkciju vodikovog peroksida iz nekog drugog izvora. Dokazano je da vodikov peroksid može nastati direktno iz kisika u peroksisomima aktivnošću glikolat oksidaze koja sudjeluje u fotorespiraciji ili u staničnoj stijenci aktivnošću peroksidaza i oksidaza (Mhamdi i sur. 2010).

APOD koristi askorbat kao elektron donor kako bi razgradila vodikov peroksid do vode i vrlo je učinkovit pri niskim koncentracijama vodikovog peroksida. KAT je važan u uklanjanju vodikovog peroksida produciranom u peroksisomima te je efikasan pri puno višim koncentracijama supstrata (Bartha i sur. 2014). Aktivnost APOD bila je bitno povećana povišena samo u biljkama izloženim uzorku vode s lokacije Hrušćica, dok je u biljkama izloženim uzorcima vode s lokacije Lukavec i Jesenice bila nepromijenjena u odnosu na kontrolu. Ti rezultati ukazuju da je u vodenoj leći nakon tjedan dana izlaganja vodi rijeke Save u razgradnji vodikovog peroksida dominantna KAT. Također, inhibicija APOD u biljkama izloženim uzorku vode s lokacije Rugvica mogla bi se objasniti prisutnošću nekih onečišćivača, moguće i onih koji nisu obuhvaćeni kemijskom analizom primjerice metala.

Glavna funkcija glutathion-S-transferaze (GST) je konjugacija glutathiona s nepolarnom molekulom, čime ona postaje polarnija te se lakše izlučuje iz organizma (Patra i sur. 2008). Aktivnost GST bila je značajno snižena u biljkama izloženim uzorcima voda s lokacija Rugvica, Hrušćica i Lukavec. Glutathion je antioksidans koji može sudjelovati u direktnom uklanjanju

ROS ili regeneraciji enzima npr. dehidroaskorbat reduktaze, a troši se i u reakciji GST. Stoga je do inhibicije GST moguće došlo zbog neravnoteže u omjeru reduciranog i oksidiranog glutaciona zbog učinka mikropolutanata prisutnih u vodi rijeke Save (Mathew i sur. 2006, Patra i sur. 2008).

Povećan sadržaj malondialdehida pouzdan je biomarker za lipidnu peroksidaciju i oštećenje stanične membrane jer je jedan od završnih produkata oksidacije lipida (Ayala i sur. 2014, Radić i sur. 2010, 2011). S obzirom da sadržaj MDA nije bio povećan u vodenoj leći izloženoj vodi rijeke Save, može se zaključiti da prisutni onečišćivači ne uzrokuju lipidnu peroksidaciju, odnosno oštećenja lipidne komponente stanične membrane.

Zaključno rezultati pokazuju da mikropolutanti prisutni u vodi rijeke Save mogu izazvati oksidacijski stres i posljedično tome oštećenja biomolekula, u ovom slučaju, proteina. Također, ova je rad pokazao da je vodena leća pogodan i osjetljiv modelni organizam za biomonitoring i ispitivanje toksičnosti slatkih voda.

## 6. Zaključak

Održavanje kvalitete vode rijeke Save izrazito je bitno s obzirom da se iz njezinih akvifera crpi pitka voda za veliki dio Zagreba i ostalih gradova kroz koje prolazi. Zbog široke upotrebe lijekova, pesticida i industrijskih kemikalija sve je veće i opterećenje rijeke Save tim onečišćivačima, pa je stoga neophodno pročišćavanje otpadnih voda prije ispuštanja u rijeku Savu te redoviti monitoring na svim njezinim postajama.

Rezultati Lemna testa i biokemijskih parametara pokazuju da su u vodi rijeke Save prisutne fitotoksične tvari koje su uzrokovale povećanu produkciju reaktivnih oblika kisika u vodenoj leći što je utvrđeno temeljem povećane karbonilacije proteina i promjenom aktivnosti anioksidacijskih enzima.

Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju može se zaključiti da je vodena leća dovoljno osjetljiv i time pogodan biološki organizam za testiranje prisutnosti mikro onečišćenja u vodenim tijelima rijeke Save.



## 7. Literatura

Aebi, H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods of enzymology* 105: 121 – 126

Alaya, A., Muñoz, M. F., Argüelos, S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1 – 31

Ali, Z., Waheed, H., Kazi, A. G., Hayat, A., Ahmed, M. (2016): Duckweed: An efficient hyperaccumulator of heavy metals in water bodies. U: Ahmed, P. (ur) *Plant metal interaction: Emerging remediation Techniques*. Oxford, Elsevier, str 412 – 429

Alscher, R. G., Erturk. N., Heath, L.S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331–1341

Amiridou D., Voutsas D. (2011): Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials* 185: 281 – 286

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

Asada, K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *An International Journal for Plant Biology* 85: 235 – 241

Babić, S., Barišić, J., Stipaničev, D., Repec, S., Lovrić, M., Malev, O., Martinović – Weigel, D., Čož – Rakovac, R., Klobučar, G. (2018): Assessment of river sediment toxicity: Combining empirical zebrafish embryotoxicity testing with *in silico* toxicity characterization. *Science of the Total Environment* 643: 435 – 450

Basiglini, E., Pintore, M., Forni, C. (2018): Effects of treated industrial wastewaters and temperatures on growth and enzymatic activities of duckweed (*Lemna minor* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 153: 54 – 59

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

Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R. (2004): Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 371 – 82

Brkić, Ž. (2017): The relationship of the geological framework to the Quaternary aquifer system in the Sava River valley (Croatia). *Journal of the Croatian Geological Survey and the Croatian Geological Society* 70/3: 201 – 213

Cleuvers, M. (2003): Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters* 142: 185 – 194

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23 – 38
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G. R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* 98: 29 – 36
- Davies, K. J. A. (1995): Oxidative stress, the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1 – 31
- Dinakar, C., Djilianov, D., Bartels, D. (2012): Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* 182: 29 – 41
- Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002): Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3: reviews3004.3001–3004.3010
- Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193 – 198
- Evans, J.D. (1996): *Straightforward statistics for the behavioural sciences*. Brooks/Cole Publishing, Pacific Grove.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977): Superoxide Dismutases: Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiology* 59: 315 – 318
- Greenberg, B.M., Huang, X.-D., Dixon, D.G. (1992): Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological risk assessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Health* 1:147–155
- Habig, W. H., Jacoby, W. B. (1981): Assays for differentiation of glutathione-s-transferases. *Methods of enzymology* 77: 398 – 405
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007): *Free radicals in biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Oxford University Press, New York, str 704.
- HALMED (2018): <http://halmed.hr/en/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjescaopotrosnji-lijekova>
- Heath R. L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189 – 198
- Horvat, T., Vidaković-Cifrek, Ž., Oreščanin, V., Tkalec, M., Pevalek-Kozlina, B. (2007): Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. *Science of the Total Environment* 384: 229 – 238
- ISO/DIS 20079 (2004) Water quality—determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*)—duckweed growth inhibition test. ISO TC 147/SC 5/WG 5

- Källquist, T., Milačić, R., Smital, T., Thomas, K. V., Vranes, S., Tolefsen K. (2008): Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water research* 42: 2146 – 2156
- Krajnčič, B., Devidé, Z., 1980. Report on photoperiodic responses in Lemnaceae from Slovenia. *Ber. Geobot. Inst.* 47: 75 – 86
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods of enzymology* 186: 464 – 478
- Li, W. C. (2014): Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution* 187: 193 – 201
- Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in enzymology* 148: 350–382
- Lushchak, V. I. (2011): Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101: 13 – 30
- Mackenzie, S. M., Waite, S., Metcalfe, D. J., Joyce, C. B. (2003): Landfill Leachate Ecotoxicity Experiments using *Lemna minor*. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 3: 171-179
- Mathew, N., Kalyanasundaram, M., Balaraman, K. (2006): Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert opinions on therapeutic patterns* 16: 431 – 444
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197 – 4220
- Mihaich, E.M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A.T., Klecka, G.M., Dimond, S.S., Staples, C.A., Ortego, L.S., Hentges, S.G. (2009): Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1392 – 1399
- Mohan, B. S., Hosetti, B. B. (1999): Aquatic plants for toxicity assessment. *Environmental Research* 81: 259 – 274
- Nakano, Y., Asada, K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867 – 880
- Orešić, D. (2004): Zagreb – grad na Savi? URL: <http://www.geografija.hr/hrvatska/zagreb-grad-na-savi/>, pristupljeno: 9. rujna 2018.
- Pal, A., Yew – Hoong Gin, K., Yu – Chen Lin, A., Reinhard, M. (2010): Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408: 6062 – 6069

- Patra, J. K., Rath, S. K., Jena, K., Rathod, V. K., Thatoi, H. (2008): Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum sp.*) extract: A study on inhibition of glutathione-S-transferase activity. *Turkish Journal of Biology* 32: 119 – 125
- Pirson, A., Seidel, F., 1950. Cellular and physiological investigations of *Lemna minor* root with special consideration to potassium and calcium lack. *Planta* 38: 431–473
- Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Marijanović Rajčić, M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2011): Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surfacewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 182-187.
- Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Lovrenčić Mikelić, I., Marijanović Rajčić, M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. (2010): Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology* 19: 216-222
- Reinhold, D., Vishwanathan, S., Park, J. J., Oh, D., Suanders, M, F. (2010): Assessment of plant – driven removal of emerging organic pollutants by duckweed. *Chemosphere* 80: 687 – 692
- Richter, E., Hecht, F., Schnellbacher, N., Ternes, T. A., Wick, A., Wode, F., Coors, A. (2015): Assessing the ecological long-term impact of wastewater irrigation on soil and water based on bioassays and chemical analyses. *Water Research* 84: 33-42
- Sparling, D. W. (2016): *Ecotoxicology Essentials: Environmental contaminants and their biological effects on animals and plants*. Elsevier, London
- Steinberg, R. (1946): Mineral requirement of *Lemna minor*. *Plant Physiol* 21:42–48
- Stipaničev, D. (2011): *Ekotoksikološko istraživanje vode rijeke Ilove*. Doktorska disertacija, PMF, Zagreb.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006): Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178 – 189
- Wang, W. (1990): Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52: 7-22.

## Životopis

Rođena sam 23. prosinca 1994. godine u Zagrebu. Pohađala sam OŠ Dragutina Domjanića u Gajnicama prva dva razreda, a nakon selidbe, nastavila sam i završila osnovnoškolsko obrazovanje u OŠ Antuna Augustinčića u Zaprešiću. Nakon završetka osnovne škole 2009. godine upisala sam matematički smjer u Petoj gimnaziji u Zagrebu. 2013. godine, završila sam srednjoškolsko obrazovanje i upisala se na Preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku preddiplomskog studija, 2016. godine, upisala sam Diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno – matematičkom smjeru Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studija, sudjelovala sam četiri puta na Noći biologije te sam na Diplomskom studiju bila aktivni član Botaničke sekcije u BIUS-u.