

Biološki učinci mikroplastike onečišćene teškim metalima na barsku leću *Spirodela polyrhiza*

Kokić, Emilie

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:791201>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno - matematički fakultet
Biološki odsjek

Emilie Kokić

**Biološki učinci mikroplastike onečišćene teškim metalima
na barsku leću *Spirodela polyrhiza***

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Emilie Kokić

**Biological effects of microplastics contaminated by heavy
metals on greater duckweed *Spirodela polyrhiza***

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za Fiziologiju bilja na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu i u Zavodu za ekologiju i uzgajanje šuma Šumarskog fakulteta pod mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac i komentorstvom dr. sc. Marije Babić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Ovaj dio diplomskog rada želim posvetiti dragim i bitnim ljudima koji su mi pomogli i omogućili da danas budem tu gdje jesam, koji su me pratili kroz moje školovanje i koji su mi pomogli prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na stručnom vodstvu te ukazanom povjerenju, pomoći i pruženom znanju prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala profesorice na zanimljivim predavanjima koja su dodatno pobudila moj interes za prirodne znanosti, biljke i cjelokupni istraživački rad.

Posebno hvala mojoj dragoj komentorici dr. sc. Mariji Babić na svakom stručnom savjetu i usmjeravanju prilikom pisanja diplomskog rada te na pomoći u laboratoriju prilikom izvođenja praktičnog dijela rada. Hvala na svakom razgovoru i životnom savjetu za vrijeme dugih radnih sati u laboratoriju. Hvala na „pogurancima“ i podršci kada je sve izgledalo nemoguće.

Također veliko hvala tehničarki i dragoj kolegici Martini Galeković na nesebičnoj pomoći i ugodnoj atmosferi prilikom izvođenja zahtjevnih i dugotrajnih laboratorijskih analiza. Hvala na svakom savjetu, što stručnom, što životnom jer ipak se generacije najbolje razumiju!

Hvala mojim prijateljima i kolegama na faksu koji su mi uljepšali moje studentske dane, pomagali savjetima i bodrili me tijekom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem Viti na podršci i ljubavi. Hvala što si bio uz mene u lijepim ali i manje lijepim trenucima.

I naposljetku, veliko hvala mojoj obitelji, a posebno mojoj dragoj mami Ankici na strpljenju i podršci tijekom svih ovih godina. Hvala mom dragom pokojnom djedu Josipu i baki Anici na predivnom djetinjstvu, na svakom danu provedenom s njima, svakom savjetu, toplom zagrljaju i utjesi kada mi je bilo teško ili sam mislila da mi je teško, svakom brižno pripremljenom i ukusnom domaćem ručku i ispričanoj priči iz koje sam izvukla najbolje pouke za život. Bez vas ovo sve ne bi bilo moguće. Volim vas.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biološki učinci mikroplastike onečišćene teškim metalima na barsku leću *Spirodela polyrhiza*

Emilie Kokić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zbog svoje ekonomske isplativosti i široke primjene, plastika je postala neizostavan materijal u svakodnevnom ljudskom životu. Plastika se u okolišu djelovanjem različitih fizičkih i kemijskih procesa razgrađuje na manje čestice plastike koje tada nazivamo mikroplastika (MP). Degradirane čestice MP kasnije postaju veliki problem i prijetnja za ekosustav i organizme koji dođu u doticaj s njom jer lakše stupaju u interakciju s organskim i anorganskim onečišćivačima i adsorbiraju ih. MP najčešće na sebe adsorbira teške metale i postupno ih otpušta u okoliš. U ovome radu istražen je utjecaj čiste MP (smjesa čestica polietilena, polistirena, polipropilena i gume) i MP onečišćene smjesom teških metala (bakar, olovo i cink) na stopu rasta barske leće (*Spirodela polyrhiza* L.) i na pojedine fiziološke i biokemijske pokazatelje oksidacijskog stresa (sadržaj fotosintetskih pigmenata, karbonila i malondialdehida te aktivnost antioksidacijskih enzima). Rezultati su pokazali da dolazi do otpuštanja metala s površine MP u hranjivu podlogu te do njihovog nakupljanja u barskoj leći, no samo je nakupljanje Cu pri najvećoj koncentraciji MP onečišćene teškim metalima bilo statistički značajno u usporedbi s kontrolom i drugim tretmanima. Sedmodnevno izlaganje barske leće česticama čiste MP i MP onečišćene metalima nije statistički značajno utjecalo na stopu rasta. Primjećen je porast aktivnosti antioksidacijskih enzima pri nižim koncentracijama čiste MP i višim koncentracijama MP s adsorbiranim metalima. Lipidna peroksidacija bila je značajno povećana pri pojedinim koncentracijama MP s adsorbiranim metalima, dok se sadržaj karbonila i topivih proteina nije statistički značajno mijenjao. Zaključno, barska leća predstavlja pogodan model za fitoremedijaciju.

Ključne riječi: barska leća, reaktivni oblici kisika, antioksidacijski enzimi, lipidna peroksidacija, karbonili
(66 stranica, 21 slika, 3 tablica, 67 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac
Komentor: dr. sc. Marija Babić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Perica Mustafić
Izv. prof. dr. sc. Kristina Pikelj
Prof. dr. sc. Neven Bočić
Prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, zamjena

Rad prihvaćen: 6. lipnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Biological effects of microplastics contaminated by heavy metals on greater duckweed *Spirodela polyrhiza*

Emilie Kokić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Due to its economic profitability and wide application, plastic has become an indispensable material in everyday human life. Plastic is broken down in environment by various physical and chemical processes into smaller plastic particles, which is then known as microplastics (MP). Degraded MP particles later become a big problem and a threat to the ecosystem and organisms that come into contact with it, because they more easily interact with organic and inorganic pollutants and adsorb them. MP usually adsorbs heavy metals and gradually releases them into the environment. In this work the influence of pristine MP (a mixture of polyethylene, polystyrene, polypropylene and rubber particles) and MP contaminated with a mixture of heavy metals (copper, lead and zinc) was studied on the growth rate of greater duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.) and on certain physiological and biochemical indicators of oxidative stress (photosynthetic pigments, carbonyls and malondialdehyde and activity of antioxidant enzymes). Release of metals from the MP surface into the nutrient medium was determined, as well as metal accumulation in the greater duckweed, though only accumulation of Cu at the highest concentration of MP contaminated with metals was statistically significant compared to control and other treatments. The growth rate was not statistically significantly affected by the seven-day exposure of duckweed to pristine MP and MP contaminated with metals. An increase in the activity of antioxidant enzymes was observed at the lower concentrations of pristine MP and at the higher concentrations of MP with adsorbed metals. Lipid peroxidation increased in response to MP contaminated with metals, while the content of carbonyls and soluble proteins did not change significantly. In conclusion, greater duckweed represents a suitable model for phytoremediation.

Keywords: greater duckweed, reactive oxygen species, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, carbonyl

(66 pages, 21 figures, 3 tables, 67 references, original in: Croatian language)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Co-mentor: dr. sc. Marija Babić

Reviewers:

Full Prof. Perica Mustafić

Assoc. Prof. Kristina Pikelj

Full Prof. Neven Bočić

Full Prof. Blanka Cvetko Tešović

Thesis accepted: June 6, 2024.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Modelni organizam <i>Spirodela polyrhiza</i> L.....	2
1.2. Lemna - test.....	3
1.3. Mikroplastika.....	3
1.4. Otpuštanje štetnih tvari s površine plastike (<i>plastic leaching</i>).....	4
1.5. Teški metali.....	5
1.6. Metode uklanjanja mikroplastike i teških metala iz okoliša.....	6
1.7. Oksidativni stres u biljaka.....	7
1.8. Antioksidacijski sustav.....	8
1.8.1. Antioksidacijski enzimi.....	8
1.9. Karbonili.....	10
1.10. Lipidna peroksidacija.....	11
2. Cilj istraživanja.....	12
3. Materijali i metode.....	13
3.1. Kultura barske leće u uvjetima <i>in vitro</i>	13
3.2. Priprema tretmana i pribora za izvođenje Lemna - testa.....	14
3.3. Mjerenje teških metala u biljkama i hranjivim podlogama.....	18
3.4. Adsorpcija čestica mikroplastike, gume i lišća na biljke.....	19
3.5. Lemna - test i biokemijski pokazatelji u barskoj leći.....	19
Lemna - test ISO 20079 – stopa rasta.....	19
Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	20
Određivanje sadržaja topivih proteina.....	21
Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	22
Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	26
Određivanje sadržaja malondialdehida.....	26
3.6. Statistička obrada podataka.....	27
4. Rezultati.....	28
4.1. Otpuštanje metala s površine čestica mikroplastike.....	28
4.2. Adsorpcija mikroplastike na barsku leću.....	28
4.3. Sadržaj metala u biljkama.....	29
4.3.1. Bakar.....	29
4.3.2. Olovo.....	30
4.3.3. Cink.....	30
4.3.4. Kalcij.....	31
4.3.5. Željezo.....	32

4.3.6.	Magnezij.....	33
4.4.	Lemna – test ISO 20079 – stopa rasta.....	34
4.5.	Sadržaj fotosintetskih pigmentata.....	35
4.6.	Sadržaj topivih proteina.....	39
4.7.	Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	40
4.8.	Sadržaj karbonila.....	44
4.9.	Sadržaj malondialdehida	45
5.	Rasprava	47
6.	Zaključak.....	54
7.	Literatura	55
	Životopis.....	61

Popis kratica

APOD – askorbat peroksidaza

GPOD – gvajakol peroksidaza

SOD – superoksid dismutaza

GST – glutation-S-trasferaza

KAT – katalaza

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

MDA – malondialdehid

ROS – reaktivni oblici kisika

PE – polietilen

PP – polipropilen

PS – polistiren

1. Uvod

Mikroplastika je najčešći oblik krutog otpada na Zemlji te ju smatramo jednim od najizazovnijih onečišćivača današnjice (Boots i sur., 2023). Nakon što se veliki plastični otpad ispusti u okoliš i izloži mehaničkom trošenju, vjetru, vodi i sunčevom UV zračenju, plastični ostaci se razgrađuju i lome u manje dijelove koje tada nazivamo mikroplastikom (Li i sur., 2024). No, glavni i kontinuirani izvor mikroplastike u okolišu predstavlja abrazija proizvoda presvučenih plastikom (Kalčikova, 2020). Mikroplastika je vrlo složen onečišćivač okoliša jer može biti izrađena od različitih vrsta polimera i postojati u različitim oblicima. Kada čestice mikroplastike uđu u okoliš na njih utječu različiti biotički i abiotički čimbenici, koji uzrokuju promjenu njezinih svojstava (Kalčikova i sur., 2020). Složenost problematike mikroplastike leži u njezinim kompleksnim interakcijama s drugim onečišćivačima. Kada je u okolišu, mikroplastika može adsorbirati brojne kemijske onečišćivače, uključujući teške metale i razne organske spojeve.

Mikroplastika je postala sveprisutna u ekosustavima diljem svijeta (Rochmann i sur., 2019). Budući da mikroplastika ima veliku moć adsorbiranja različitih toksičnih tvari, ako životinje progutaju čestice mikroplastike koje su adsorbirale teške metale, to može uzrokovati štetne učinke na organizme kao što su inhibicija njihova rasta i razvoja, oksidativni stres, genotoksičnost i reproduktivne smetnje (Gao i sur., 2022).

U kompleksnoj smjesi otpadnih voda, mikroplastika s adsorbiranim teškim metalima može imati visoki ekotoksikološki potencijal i predstavljati opasnost za okoliš i čovjeka (Kalčikova i sur., 2020).

Kada mikroplastika uđe u vodeni sustav, većina čestica pluta na površini vode te najprije ulazi u interakciju s plutajućim vodenim biljem (Kalčikova, 2020). Vaskularne biljke su važni primarni proizvođači, a u vodenim ekosustavima predstavljaju hranu i stanište za mnoge ribe i ptice (Kalčikova i sur., 2017).

Kao biljni model u ovom istraživanju korištena je barska leća (*Spirodela polyrhiza* L. Schleid) iz porodice *Lemnaceae*. Barska leća je kozmopolitska vodena jednosupnica. Budući da joj odgovara mirnija voda, najčešće je susrećemo u jezerima, barama i mirnijim potocima u prirodi (Wang, 1990). Zbog svog brzog rasta, lakoće uzgoja, osjetljivosti, ali i sposobnosti

akumuliranja toksičnih tvari (Ali i sur., 2016), idealan je modelni organizam za istraživanja učinka mikroplastike i teških metala (Kalčikova i sur., 2020).

1.1. Modelni organizam *Spirodela polyrhiza* L.

Makrofiti su biljke koje rastu jednim svojim dijelom ili u potpunosti u vodi. Mogu biti ukorijenjene u plitkim vodama ili slobodno plutati u vodi ili na površini vode. Prema smještaju i načinu rasta u vodenom okolišu, makrofite možemo podijeliti u četiri skupine:

- submerzni makrofiti (biljke su ukorijenjene u supstrat, te u potpunosti uronjene u vodu)
- emerzni makrofiti (biljke su ukorijenjene u supstrat, a listovi izlaze iz vode te se pružaju u zrak)
- makrofite plutajućih listova (biljke su ukorijenjene, a listovi plutaju po površini vode)
- slobodno plutajući makrofiti (biljke plutaju na površini vode ili neposredno ispod površine)

Barska leća pripada skupini slobodno plutajućih makrofita.

Spirodela polyrhiza, višekorjenska barska leća ili velika vodena leća, trajna je zeljasta biljka iz porodice kozlaca (*Araceae*). U prirodi je široko rasprostranjena u slatkovodnim ekosustavima. Nalazimo je kao slobodnoplivajuću vodenu biljku koja u velikim i gustim skupinama prekriva površine voda stajaćica i sporih tekućica, na sunčanim i polusjenovitim mjestima. Ima jednostavnu građu i razmnožava se vegetativno pri čemu nastaje veliki broj genetički identičnih jedinki (klonova). Listovi su tamnozeleno boje, ovalni, glatki i plosnati. Karakteristično za nju je da ima više tankih korjenčića u obliku niti koje vise u vodi, te se po tome razlikuje od ostalih vodenih leća (Gligić, 1953; Zezulka i sur., 2013). Barska leća je dobar modelni organizam zbog svoje jednostavne građe, brzine razmnožavanja, široke rasprostranjenosti te jeftinog uzgoja (Ali i sur., 2016). Iako je barska leća osjetljiva biljna vrsta, ona je ujedno i veoma tolerantna vrsta zbog njezine prilagodljivosti stresnim uvjetima i velike sposobnosti akumulacije različitih štetnih tvari (Wang, 1990). Biljke preživljavaju nepovoljne uvjete zahvaljujući svom brzom razmnožavanju, pohranjivanju toksičnih tvari u vakuoli te promjenom fizioloških i biokemijskih parametara (Ali i sur., 2016).

1.2. Lemna - test

Među parametrima koji se najčešće procjenjuju u Lemna - testu su parametri rasta (Mohan i Hosetti, 1999). Mjerenje biokemijskih parametara tijekom izlaganja vodenih leća iz porodice Lemnaceae različitim onečišćivačima, također može poslužiti za procjenu učinaka pojedinih onečišćivača na prilagodljivost i preživljavanje biljaka izloženih onečišćivačima.

Biljke iz potporodice *Lemnoideae*, uključujući i barsku leću, koriste se kao modelni organizmi u Lemna - testu za određivanje kvalitete vode te za praćenje razine teških metala, hidrofilnih i lipofilnih vodenih onečišćivača i ostalih onečišćivača u vodi (Radić i sur., 2011). Mnoga fiziološka svojstva, koja posjeduje ova vodena biljka, kao što su mala veličina, brzi rast, vegetativno razmnožavanje i mogućnost rasta u širokom rasponu pH vrijednosti (između 5 i 9), čine ju idealnim kandidatom za testni organizam.

U ovom radu primijenjen je standardizirani protokol (ISO/CD 20079, 2005) u kojem su biljke barske leće tijekom sedam dana bile izložene testiranim onečišćivačima dodanim u hranjivu podlogu. Nakon toga je procijenjen učinak na stopu rasta, kao i na neke fiziološke i biokemijske parametre: sadržaj fotosintetskih pigmenata, aktivnost antioksidacijskih enzima, sadržaj malondialdehida (ukazuje na stupanj oksidacijskog oštećenja lipida) te sadržaj karbonila (ukazuje na stupanj oksidacijskog oštećenja proteina) (Radić i sur., 2010, 2011).

1.3. Mikroplastika

Znanost o polimerima jedno je od najrevolucionarnijih područja istraživanja prošlog stoljeća, potaknuto otkrićem bakelita, prve sintetičke plastike. Plastika, nekoć revolucionaran materijal, danas je globalna prijetnja okolišu (Mateos-Cárdenas i sur., 2019). Zbog ekonomske isplativosti, izvrsnih fizikalno - kemijskih svojstava i široke praktične primjene, opsežna proizvodnja i potrošnja plastike širom svijeta pridonijele su svrstavanju plastike u jedan od glavnih globalnih onečišćivača današnjice (Pan i sur., 2023). Glavni izvori otpuštanja plastike u vodenim slatkovodnim sustavima su neadekvatno odlaganje kućnog otpada, površinsko otjecanje otpadnih voda, ispusti iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda te industrijske, poljoprivredne i stočarske aktivnosti. Prema statistici, oko 4,8 do 12,7 milijuna tona plastike se ispusti u vodeni okoliš svake godine, a ta se plastika kasnije fizičkim i kemijskim procesima

razgrađuje na manje čestice plastike (< 5 mm) koje onda nazivamo mikroplastikom (Galloway i sur., 2020). Izraz „mikroplastika“ prvi put je upotrijebljen 2004. godine za opisivanje manjih čestica plastike. No ta definicija ne obuhvaća sve kriterije za sveobuhvatni opis mikroplastike (Mateos-Cárdenas i sur., 2019). Frias i Nash (2019) mikroplastiku su definirali kao „sintetičke čvrste čestice ili polimerne matrice, pravilnog ili nepravilnog oblika, koje su netopljive u vodi, veličine od 1 do 5 mm“. Hartmann i sur. (2019) predložili su karakterizaciju mikroplastike na temelju sedam kriterija: (1) kemijski sastav, (2) tvrdoća, (3) topljivost, (4) veličina, (5) oblik, (6) boja i (7) porijeklo. Rochman i sur. (2019) su uz već postojeće definicije mikroplastike dodali da „mikroplastika nije samo čestica izrađena od inertnog plastičnog materijala, već ona predstavlja složeni kemijski koktel monomera, oligomera i aditiva poput plastifikatora“, koji su povezani s proizvodnjom mikroplastike. Obzirom na porijeklo, mikroplastiku dijelimo u dvije klase, primarnu i sekundarnu. U primarnu mikroplastiku ubrajamo čestice plastike veličine do 5 mm, koje se proizvode u obliku mikroznaca te koriste kao abrazivna sredstva u tekstilnoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Gao i sur., 2022). Sekundarnu mikroplastiku čine mali komadići plastike koji se ne proizvode namjerno, već su rezultat lomljenja i fragmentacije većih plastičnih predmeta biološkim, fizičkim i kemijskim procesima. Fragmentacija plastike je uvjetovana vrstom polimera od kojeg je napravljena i okolišnih uvjeta u kojima se nalazi, koji mogu biti veoma varijabilni (Rochman i sur., 2019).

Najčešće proizvedeni i korišteni tipovi plastičnih polimera su polipropilen (PP), polietilen (PE) i polistiren (PS). Ove vrste plastike spadaju u termoplaste, odnosno u plastiku koja se zagrijavanjem topi, a hlađenjem stvrdne, što ih čini pogodnima za proizvodnju plastičnih proizvoda koji služe za obradu i pohranu hrane (tave, plastične kutijice, plastične vrećice, folija, ambalaža za hranu...) (Rochman i sur., 2019). Upravo zbog svoje masovne proizvodnje, spomenute tri vrste polimera najzastupljenije su vrste plastike u vodenim ekosustavima. Zbog gustoće slične vodi, njihove mikročestice lebde na površini vode ili su suspendirane u vodi te ih je stoga teško odvojiti i ukloniti iz vodenog okoliša (Pan i sur., 2023).

1.4. Otpuštanje štetnih tvari s površine plastike (engl. *plastic leaching*)

Čestice mikroplastike pronalazimo u tlu i sedimentu, zraku i vodi, ali i u ljudskoj hrani te pitkoj vodi. Jednom kada plastika uđe u okoliš, izložena je različitim prirodnim procesima koji bitno utječu na njezina svojstva i ponašanje. Vremenske prilike uzrokuju najprije promjenu fizičkog

integriteta plastike na način da se zbog utjecaja atmosferilija troši i lomi na manje komade, distribuirajući se tako na velike udaljenosti u okolišu. Jednom kada je plastika degradirana na manje komadiće lakše dolazi do njenih kemijskih promjena. Kada dođe do kemijske degradacije čestice, što je vidljivo po promjeni boje i pojavama pukotina na površini mikroplastike, takva čestica je podložnija razgradnji i otpuštanju toksičnih spojeva, koji se plastici dodaju kao aditivi (metali, bisfenoli, ftalati, bromirani usporivači plamena i dr.), u okoliš (Gunaalan i sur., 2020). Također, takve usitnjene čestice mikroplastike lakše stupaju u interakciju i adsorbiraju organske i anorganske onečišćivače. Kasnije ih sa svoje degradirane površine postupno otpuštaju u okoliš (Kalčikova i sur., 2020). Dakle, pod pojmom otpuštanje ili *leaching* (engl.) podrazumijeva se ispiranje toksičnih tvari s površine mikroplastike tijekom određenog vremena. Na brzinu otpuštanja teških metala s površine mikroplastike utječe veličina čestica mikroplastike i kemijski sastav otopine, ali i pH vrijednost otopine, gdje vrijedi pravilo što je niži pH otopine to je i veća tendencija otpuštanja teških metala ili drugih onečišćivača s površine mikroplastike (Zuo i sur., 2023).

1.5. Teški metali

Antropogene aktivnosti, kao što su industrijalizacija i sve veća urbanizacija, praćene su ispuštanjem različitih onečišćujućih tvari u okoliš. Danas, zahvaljujući neadekvatnom skladištenju industrijskog otpada, sve su češća onečišćenja teškim metalima, koja mogu izazvati toksičan učinak u biljaka, izravno djelujući na fiziologiju i razvoj biljke. Stres uzrokovan teškim metalima predstavlja ozbiljnu prijetnju za normalan rast i razvoj biljke, te ga smatramo jednim od glavnih čimbenika abiotičkog stresa (Berni i sur., 2018). Ispuštanje teških metala iz različitih antropogenih i industrijskih izvora u vodeni sustav predstavlja prijetnju za zdravlje biote (Meitei i Majeti, 2013). Teški metali ostaju u okolišu jer se ne mogu razgraditi, te konačno dolaze do čovjeka kroz hranidbeni lanac. Kao što je već rečeno, mikroplastika ima veliku tendenciju adsorbiranja različitih toksičnih tvari na sebe. Jedan od najčešćih adsorbensa su upravo teški metali koji se zbog svoje prekomjerne zastupljenosti u otpadnim vodama, distribuiraju na velike udaljenosti, a imaju i visok ekotoksikološki potencijal (Kalčikova i sur., 2020).

Olovo (Pb), bakar (Cu) i cink (Zn) često su prisutni u industrijskim otpadnim vodama te su opasni za žive organizme posebice u vodenom sustavu. Glavni izvori onečišćenja olovom u otpadnim vodama uključuju baterije, industrijske boje i pigmente, benzin i industriju plastike

(Meitei i Majeti, 2013). Bakar i cink pripadaju skupini esencijalnih mikronutrijenata važnih za normalan rast i razvoj biljke. Oba elementa sastavni su dijelovi mnogih enzima i redoks-sustava. Međutim, u prekomjernoj količini, ovi teški metali mogu negativno utjecati na fiziološke procese u biljnim stanicama. Bakar je široko rasprostranjen metalni onečišćivač u prirodnim i otpadnim vodama, a u okoliš dolazi uslijed poljoprivrednih i industrijskih aktivnosti kao što su proizvodnja boja i pigmenata, rudarstvo i galvanizacija (Upadhyay i Panda, 2010). Cink ubrajamo u umjereno toksične metale. Visoke koncentracije kod biljaka uzrokuju inhibiciju rasta listova i korijenja. Kao najveći izvori onečišćenja cinkom u prirodi su upotreba umjetnih gnojiva, rudarstvo, industrijske i otpadne vode (Stanton i sur., 2022).

Ulazak teških metala u prehrambeni lanac negativno utječe na zdravlje ljudi. Trovanje teškim metalima uzrokuje oštećenja živčanog i reproduktivnog sustava, mozga, bubrega i mnogih drugih organa u ljudskom organizmu (Meitei i Majeti, 2013). Prisutnost mikroplastike i teških metala u okolišu predstavlja veliki ekološki problem jer se radi o materijalima i spojevima koji su teško razgradivi i zbog toga imaju tendenciju nakupljanja u okolišu. Zbog svega navedenog, potrebno je spriječiti njihovo ispuštanje u okoliš ili ih ukloniti iz okoliša (Michalak i sur., 2013).

1.6. Metode uklanjanja mikroplastike i teških metala iz okoliša

Konvencionalne kemijske metode (kao što su membranska filtracija, kemijsko taloženje, ionska izmjena, kelacija i dr.) koje se koriste za uklanjanje čestica mikroplastike i teških metala iz otpadnih voda, pokazale su se ili neučinkovitim ili ekonomski neisplativim, posebno u slučaju niskih koncentracija onečišćivača. Takve metode uklanjanja iza sebe ostavljaju kao nusprodukt ogromne količine mulja kojeg je kasnije teško ukloniti (Meitei i Majeti 2013).

Kao puno uspješnije i ekonomski isplativije metode uklanjanja spomenutih onečišćivača iz okoliša, pokazale su se biološke metode. Jedna od bioloških metoda uklanjanja mikroplastike i teških metala iz vodenih sustava je adsorpcija, odnosno biosorpcija. Biosorpcija označava proces adsorpcije različitih onečišćujućih tvari (koje zajedničkim imenom zovemo adsorbati) na različite materijale (adsorbense) biološkog podrijetla tako što ih veže (adsorbira) iz vodene otopine na različite materijale biološkog podrijetla (Michalak i sur., 2013). Biosorpcija se pokazala učinkovita, ekonomski isplativa i ekološki prihvatljiva metoda uklanjanja mikroplastike i teških metala iz vodenih sustava. Različite vodene biljke, poput vodene i barske leće, smeđih i zelenih algi, vodene mahovine, vošćike, vodenog zumbula i rese (krocnja)

proučavani su za uklanjanje pojedinih skupina mikroplastike i teških metala iz otpadnih voda (Meitei i Majeti, 2013). Druga najčešća biološka metoda koja se koristi prilikom sanacije vodenih tijela je fitoremedijacija. To je proces čišćenja područja ili površine od opasnih kemikalija korištenjem biljaka, s ciljem smanjenja koncentracije i toksičnog utjecaja onečišćivača. Opasni spojevi obuhvaćaju teške metale, čestice mikroplastike i različite organske spojeve (Chattopadhyay i sur., 2012).

Vodene biljke svrstavamo u potencijalnu skupinu biljaka koje nakupljaju i akumuliraju određene koncentracije onečišćivača prisutnih u okolišu. Biljke iz potporodice *Lemnoideae*, u koju pripada i barska leća, smatraju se prikladnim kandidatima za fitoremedijaciju vodenih površina. Utvrđeno je da biljke iz te potporodice imaju dobru sposobnost akumulacije teških metala, mikroplastike i ostalih onečišćujućih tvari, u određenim koncentracijama. Budući da je barska leća široko rasprostranjena vrsta, bioremedijacija može predstavljati učinkovitiji i jeftiniji način sanacije u usporedbi s tradicionalnim kemijskim sredstvima za uklanjanje teških metala i mikroplastike. Međutim, mana je barske leće i općenito bioloških metoda što nisu pogodne za uklanjanje viših koncentracija onečišćivača (Hou i sur., 2007).

1.7. Oksidativni stres u biljaka

Aerobnim organizmima za život je neophodan kisik. Unatoč tome što viši eukariotski organizmi ne mogu opstati bez kisika, kisik je ujedno i inherentno opasan za njihovo postojanje. Svaki atom kisika ima jedan nesporeni elektron u svojoj valentnoj ljusci, dok molekularni kisik ima dva nesporena elektrona. Radikal se definira kao bilo koja vrsta atoma ili molekule s jednim ili više nesporenih elektrona u vanjskoj valentnoj ljusci. Stoga, atomski kisik predstavlja slobodni radikal, a molekularni kisik slobodni biradikal, te kao takvi imaju tendenciju stvarati reaktivne intermedijere tijekom redukcije kisika. U redukcijском procesu kisika nastaje nekoliko različitih radikala i neradikalnih štetnih molekula. Prvi radikal koji nastaje redukcijom kisika, odnosno dodavanjem jednog slobodnog elektrona je superoksidni radikal (O_2^-). Daljnjom redukcijom, odnosno dodavanjem drugog nesporenog elektrona i dva vodikova iona nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). Zatim, sparivanjem trećeg nesporenog elektrona i otpuštanjem hidroksilnog iona (OH^-) nastaje visoko reaktivni hidroksilni radikal ($\cdot OH$). U konačnici, u slijedećem koraku nastaje bezopasna molekula vode (Davies, 1995).

Proizvodnja spomenutih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, engl. Reactive Oxygen Species) u biljkama je dio normalnog metabolizma u brojnim staničnim organelima poput kloroplasta, mitohondrija, peroksisoma, endoplazmatskog retikuluma, stanične membrane i stanične stijenke (Smirnoff i Arnaud, 2018). Međutim, izloženost nepovoljnim okolišnim uvjetima (npr. visokim koncentracijama teških metala) može nadvladati antioksidacijske sustave koji štite biljke i rezultirati pojavom oksidativnog stresa. U uvjetima oksidativnog stresa može doći do oksidacije biomolekula kao što su DNK, proteini, lipidi i ugljikohidrati (Berni i sur., 2018).

1.8. Antioksidacijski sustav

Biljke su izložene različitim abiotičkim i biotičkim stresnim čimbenicima, što smanjuje i ograničava produktivnost poljoprivrednih usjeva. Abiotički stres uključuje temperaturu, ultraljubičasto zračenje, salinitet, poplave, sušu, teške metale i sl. (Arora i sur., 2002), dok se biotički stres odnosi na nepovoljno djelovanje uzrokovano virusima, bakterijama, kukcima, biljojedima, gljivicama, ili drugim biljnim vrstama (alelopatija) (Bolaji Umar i sur. 2022). Utvrđeno je da svi oblici abiotičkog i biotičkog stresa u određenoj mjeri induciraju oksidacijski stres, a sposobnost biljaka da kontroliraju povišene razine oksidansa u korelaciji je s njihovom razinom tolerancije na stres (Matić i sur., 2021). Budući da su biljke sesilni organizmi i ne mogu se „maknuti“ iz okoline koja im uzrokuje stres, razvile su kompleksan antioksidacijski sustav kako bi što učinkovitije svladale promjenjive uvjete okoliša. Antioksidacijskim obrambenim sustavom biljke razgrađuju slobodne radikale i zaustavljaju lančane reakcije stvaranja novih radikala, sprječavajući na taj način njihovo štetno djelovanje (Arora i sur., 2002). Antioksidacijski sustav biljaka možemo podijeliti na enzimске i neenzimске komponente. Enzimске komponente za detoksikaciju reaktivnih vrsta kisika uključuju superoksid dismutazu (SOD), katalazu (KAT), peroksidazu (POD) i glutation reduktazu (GR). U neenzimске komponente obrambenog sustava ubrajamo male molekule poput askorbata, tokoferola, polifenola, karotenoida i glutationa (Matić i sur., 2021).

1.8.1. Antioksidacijski enzimi

Aerobni organizmi sintetiziraju brojne antioksidacijske enzime i proteine kako bi minimalizirali oksidacijska oštećenja. Jedan od najvažnijih antioksidacijskih enzima je superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1). SOD pripada skupini enzima koje nazivamo metaloenzimima, nazvanim

prema metalnom kofaktoru kojeg vežu na svoje aktivno mjesto. Na temelju kofaktora kojeg enzim koristi, SOD klasificiramo u tri skupine: bakar/cink SOD, mangan SOD i željezo SOD (Alscher i sur., 2002). Uloga svakog od metaloenzima SOD je da katalizira proces redukcije supeoksidnih radikala u molekularni kisik i vodikov peroksid (Davies, 2000). Cu/Zn SOD se nalazi u kloroplastu, citosolu i izvanstaničnom prostoru. Mn SOD se većinom pronalazi u mitohondriju i u manjim količinama u peroksisomu, dok Fe-SOD uglavnom koriste bakterije, (umjesto Cu/Zn SOD), može se naći i u u kloroplastima biljaka (Davies, 2000; Alscher i sur., 2002). Budući da je vodikov peroksid, produkt superoksid dismutaze, toksičan i opasan za stanicu mora se brzo ukloniti. U biljnim stanicama postoje dva tipa enzima koji mogu razgraditi vodikov peroksid, to su katalaza (KAT, EC 1.11.1.6) i peroksidaze, prvenstveno askorbat peroksidaza (APOD, EC 1.11.1.11). I KAT i APOD detoksificiraju vodikov peroksid i prevode ga redukcijom u kisik i vodu (Davies, 2000).

Katalaza je enzim koji nalazimo u svim aerobnim organizmima u peroksisomima (Arora i sur., 2002; Davies, 2000). Katalaza je prvootkriveni antioksidacijski hem-enzim. Prisutan je u svim aerobnim, ali i u nekim anaerobnim organizmima. Taj enzim katalizira dismutaciju reaktivnog vodikovog peroksida u vodu i kisik (Mhamdi i sur., 2010). Iako neke bakterije koriste mangan kao redoks-aktivni kofaktor, svi poznati eukariotski organizmi koriste hem kofaktor koji sadrži željezo (Zamocky i sur., 2008).

Askorbat peroksidaza katalizira razgradnju vodikovog peroksida u citosolu, te stromi i tilakoidama u kloroplastima. Citosolni APOD odgovoran je za zaštitu kloroplasta i njegove fotosintetske aktivnosti, posebno tijekom svjetlosnog stresa. U biljkama kod kojih nedostaje citosolni oblik APOD, primijećeno je da kloroplastni, mitohondrijski i membranski vezani proteini lakše i brže oksidiraju. Prilikom redukcije jedne molekule vodikovog peroksida, askorbat peroksidaza koristi dvije molekule askorbata, pri čemu nastaju dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroaskorbata (Arora i sur., 2002). Gvajakol peroksidaze (GPOD) pripadaju skupini enzima III. faze koji imaju veliki broj izooblika i različitu ekspresiju zbog varijabilnih aminokiselinskih slijedova (Hiraga i sur., 2001). Imaju različite uloge u brojnim fiziološkim procesima, a možemo ih pronaći u različitim dijelovima stanice (u citosolu, staničnoj stijenci, vakuoli i apoplastu), ali i u izvanstaničnom prostoru. Pripadaju skupini hem proteina koji uz utrošak vodikovog peroksida oksidiraju elektron donore kao što su gvajakol i pirogalol (Sharma i sur., 2012). GPOD u odnosu na KAT ima veći afinitet prema vodikovom peroksidu te stoga i ti enzimi imaju važnu ulogu u uklanjanju reaktivnih oblika kisika u stanici (Gill i Tuteja, 2010).

Glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) je enzim odgovoran za detoksikaciju različitih ksenobiotika (npr. herbicida) i uz sve ostale enzime sudjeluje u zajedničkoj obrani od oksidativnog stresa u stanici. Glutation-S-transferaze pripadaju velikoj skupini višenamjenskih enzima II faze koji elektrofilne ksenobiotike i njihove metabolite prevode u oblike koji su topiviji u vodi, olakšavajući tako njihovo izbacivanje iz stanice te su jedni od najvažnijih detoksikacijskih enzima u prirodi (Dixon i sur., 2010). U biljaka, GST reducira hidrosiperoksidne masne kiseline i prevodi ih u manje toksične oblike, kako bi zaštitio stanicu od toksičnog djelovanja kisika (Wagner i sur., 2002). Modulacija aktivnosti tih enzima u biljnim stanicama zamijećena je nakon infekcije, u odgovoru na tretman ozonom i vodikovim peroksidom, herbicidima, teškim metalima, abiotičkim stresnim čimbenicima i sl. Jedna od neizravnih uloga GST je uklanjanje ROS koji se kontinuirano proizvode u stanicama. GST kataliziraju detoksikaciju ksenobiotika dodavanjem reduciranog oblika glutationa (GSH) elektrofilnoj skupini, obilježavajući ga na taj način kao spoj koji treba biti izbačen iz stanice. Najpoznatija detoksikacija ksenobiotika je GST katalizirana supstitucija GSH s kloridnom skupinom ksenobiotika 1-klor-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) - koji služi kao marker za detekciju aktivnosti tog enzima (Dixon i sur., 2010).

1.9. Karbonili

Karbonilacija proteina nepovratan je oblik posttranslacijske modifikacije koju pokreću ROS u životinjskim i biljnim stanicama. Stupanj karbonilacije proteina smatra se jednim od pokazatelja oksidacije proteina (Tola i sur., 2021). Kada ROS uspiju izbjeći mehanizmima oksidacije i redukcije antioksidacijskih enzima, nakupljaju se u stanici te u konačnici mogu reagirati s biomolekulama, najčešće s proteinima. Takva oštećenja proteina mogu dovesti do njihove pretjerane osjetljivosti na proteolizu što za posljedicu ima inhibiciju djelovanja različitih enzima (Dalle-Donne i sur., 2003). Karbonilacija proteina nastaje izravnom oksidacijom bočnih lanaca lizina, arginina, prolina i treonina hidroksilnim radikalom ($\text{HO}\cdot$) pomoću metalnog katalizatora, ili dodavanjem reaktivnih karbonilnih vrsta uključujući α i β nezasićene aldehide i ketone na bočne lance cisteina, lizina i histidina (Tola i sur., 2021). Tako oksidirani proteini s karbonilnim skupinama na krajevima svojih lanaca (aldehidima i ketonima) predstavljaju stabilne oblike molekula te se kao takvi lakše izbacuju iz stanice. Kao jedna od najčešćih metoda za utvrđivanje ukupnog oštećenja proteina je mjerenje količine nastalih karbonila u stanici (Dalle - Donne i sur., 2003).

1.10. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces u kojem oksidansi poput radikala kisika ili neradikalnih vrsta, napadaju lipide koji sadrže ugljik-ugljik dvostruku vezu, posebno nezasićene masne kiseline koje grade membranske lipide stanica. U tom procesu ROS se vežu na nezasićene masne kiseline membranskih lipida gdje se umjesto vodika veže kisik te nastaju lipidni peroksidni radikali ($\text{LOO}\cdot$) i hidroperoksidi (Skorzynska-Polit, 2007).

U biljnim stanicama peroksidacija nezasićenih masnih kiselina može se odvijati na neenzimski ili enzimski način (Skorzynska-Polit, 2007). Neenzimska lipidna peroksidacija inicirana je pomoću ROS ili prijelaznim metalima, dok je enzimska katalizirana lipooksigenazama.

Visoke razine ROS mogu nanijeti izravno štetu lipidima, posebice hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$) i hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2\cdot$). Hidroksilni radikal je mala, vrlo pokretna, topljiva u vodi i kemijski najreaktivnija vrsta kisika. Hidroperoksilni radikal je protonirani oblik superoksida koji kao takav može reagirati s redoks aktivnim metalima, kao što su Cu i Fe, i dalje stvarati nove hidroksilne radikale. Budući da je hidroperoksilni radikal puno jači oksidans od superoksidnog anionskog radikala, lakše i brže pokreće lančanu oksidaciju nezasićenih fosfolipida, što dovodi do oštećenja strukture i funkcije stanične membrane (Ayala i sur., 2014). Cjelokupni proces lipidne peroksidacije sastoji se od tri koraka: inicijacije, propagacije i terminacije. U prvom koraku inicijacije peroksidacije lipida, prooksidans poput hidroksilnog radikala oduzima alilni vodik tvoreći lipidni radikal s ugljikom u središtu ($\text{L}\cdot$). U fazi propagacije, lipidni radikal brzo reagira s kisikom i formira lipidni peroksil radikal ($\text{LOO}\cdot$) (koji odvaja vodik od druge molekule lipida stvarajući novi lipidni radikal te nastavlja lančanu reakciju) i lipidni hidroperoksid (LOOH). U zadnjem koraku terminacije, antioksidansi poput tokoferola doniraju atom vodika lipidnom peroksil radikalom i formiraju odgovarajući radikal tokoferola koji onda reagira s drugim lipidnim peroksil radikalom stvarajući neradikalne produkte i tako zaustavljajući proces uzimanja vodika susjednom lipidu. Peroksidacijom lipida nastaju različiti oksidirani produkti. Glavni primarni produkti lipidne peroksidacije su lipidni hidroperoksidi (LOOH) (Ayala i sur. 2014). Lipidni hidroperoksidi nastali neenzimskim reakcijama su nestabilni i razgrađuju se u složeni niz produkata razgradnje koji pokazuju širok raspon štetnih djelovanja. Primjerice, aldehidne molekule nastale tijekom lipidne peroksidacije, uzročnici su mnogih citotoksičnih procesa jer reagiraju izravno s biomolekulama i oštećuju ih (Skorzynska-Polit, 2007). Među brojnim aldehydima koji se mogu formirati kao sekundarni

produkti tijekom lipidne peroksidacije je i malondialdehid (MDA). Malondialdehid je mutagena, izrazito reaktivna i toksična molekula, te se zbog toga smatra najpogodnijim biomarkerom peroksidacije lipida (Ayala i sur. 2014).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi učinak mikroplastike onečišćene teškim metalima (Pb, Zn, Cu) na stopu rasta barske leće *Spirodela polyrhiza* te na pojedine fiziološke i biokemijske pokazatelje oksidacijskog stresa (sadržaj fotosintetskih pigmenata, aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid-dismutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, glutation-S-transferaze, sadržaj karbonila i sadržaj malondialdehida). S ciljem utvrđivanja mogućeg prijenosa teških metala s čestica mikroplastike u podlogu odnosno u biljke, izmjeren je i sadržaj Pb, Zn i Cu u podlogama bez biljaka kao i sadržaj tih metala u biljkama.

3. Materijali i metode

3.1. Kultura barske leće u uvjetima *in vitro*

Za dugotrajnu kultivaciju barske leće koristila sam modificiranu Pirson-Seidel (PS) hranjivu podlogu (Pirson i Seidel, 1950) čiji je sastav iskazan u Tablici 1. Biljke su na Pirson-Seidel podlozi uzgajane u klima-komori u uvjetima *in vitro* na temperaturi od $24\pm 1^\circ\text{C}$ u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) uz rasvjetu pod bijelim fluorescencijskim svjetlima intenziteta od $90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$

Eksperimentalnu analizu učinka čiste i onečišćene mikroplastike te usitnjenog lišća (korišteno kao model prirodnih čestica sličnih česticama mikroplastike odnosno kao pozitivna kontrola) provela sam na hranjivoj podlozi po Steinbergu (S; 1946). Kako bi se biljke adaptirale na hranjivu podlogu po Steinbergu, prije izvođenja samog eksperimenta sam biljke koje sam uzgojila na podlozi PS prethodno predkultivirala tijekom tjedan dana na podlozi S. Sastav hranjive podloge po Steinbergu prikazan je u Tablici 2.

Sve biljke sam uzgajala u uvjetima kontinuiranog osvjetljenja na temperaturi od $24\pm 1^\circ\text{C}$ uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki ($90 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) u klima-komori.

Tablica 1. Sastav tekuće hranjive podloge po Pirson i Seidel-u (1950).

Makroelementi	mg/L
KNO ₃	400
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	804
KH ₂ PO ₄	200
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	300
Mikroelementi	μg/L
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	300
H ₃ BO ₃	500
Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	1860
Željezni citrat	5000
Organski dodaci	g/L
Saharoza	10
Asparagin	0,1

pH hranjive podloge podesila sam na vrijednost 4,55 pomoću 0,1 M KOH.

Tablica 2. Sastav tekuće hranjive podloge po Steinbergu (1946).

Makroelementi	mg/L
KNO ₃	350
KH ₂ PO ₄	90
K ₂ HPO ₄	12,6
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	100
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	295
Mikroelementi	µg/L
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	180
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	44
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	180
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	760
Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	1500

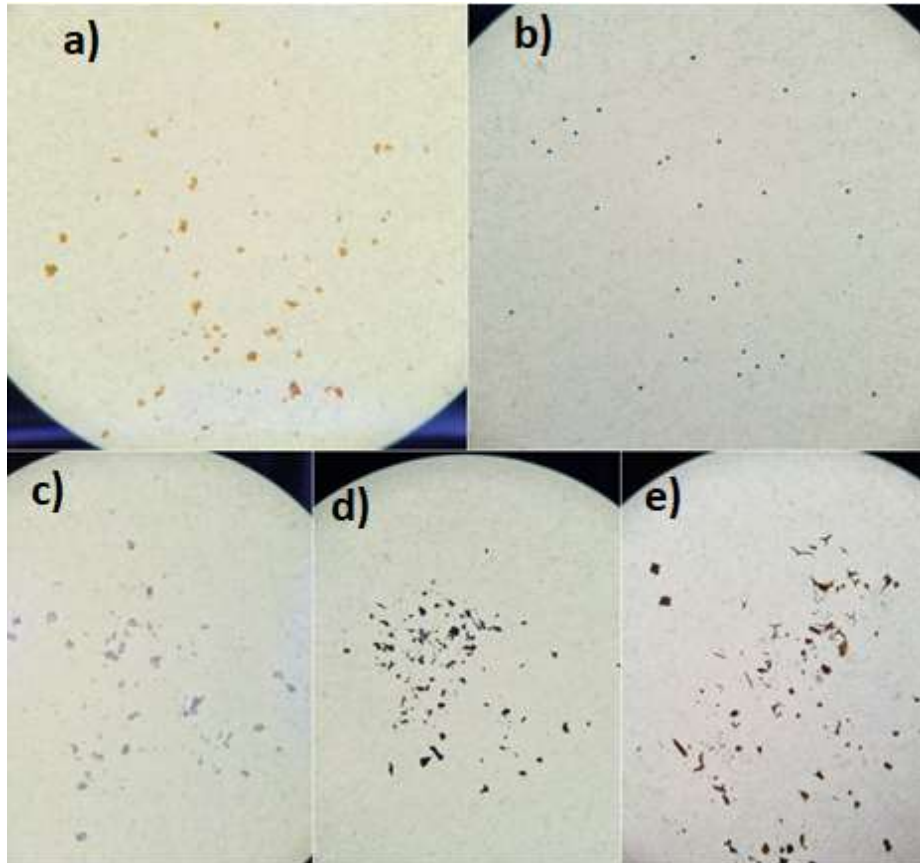
pH hranjive podloge podesila sam na vrijednost 6.

3.2. Priprema tretmana i pribora za izvođenje Lemna - testa

Čestice plastike (polipropilena, polistirena i polietilena), gume i lišća nabavljene su i usitnjene na Institutu Ruđer Bošković. Čestice mikroplastike dobivene su mljevenjem plastičnih peleta promjera 3-5 mm (Europlast, Zagreb, Hrvatska) u vibracijskom mlinu kućne izrade te se prosijavanjem dobila frakcija < 500 µm. Uz pomoć lupe utvrđeno je da je 90% mikroznaca plastike u rasponu veličine 100-500 µm. Reciklirane gumene granule promjera < 2mm (Gumiimpex - GRP d.o.o., Varaždin, Hrvatska) korištene su za dobivanje čestica gume < 500 µm. Lišće (sakupljeno u šumi Grmošćica, Zagreb) koje je korišteno kao model prirodnih čestica sličnih česticama mikroplastike mehanički je usitnjeno u tarioniku te prosijano u frakciju < 500 µm.

Kako bih pripremila hranjive podloge s dodatkom spomenutih mikročestica polietilena (PE), polipropilena (PP), polistirena (PS) i gume (1:1:1:1) u koncentracijama od 20, 100, 1000 i

10000 čestica po litri, usitnjene čestice brojala sam pod lupom (Slika 1), zapakirala u paketiće koje sam čuvala do početka pokusa na sobnoj temperaturi.



Slika 1. Mikročestice slikane pod lupom: a) polipropilen, b) polietilen, c) polistiren, d) guma i e) lišće (Izvor: E. Kokić).

Za pokus sam koristila Erlenmeyerove tikvice od 300 mL. Prazne tikvice začepljene vatom i aluminijskom folijom sterilizirala sam tijekom 20 minuta u sušioniku pri 160°C. Nakon provedene suhe sterilizacije, tikvice sam ohladila te zatim u svaku od njih ulila po 200 mL prethodno autoklavirane hranjive podloge po Steinbergu,

Kontrolna otopina (K) sadržavala je hranjivu podlogu S bez ikakvih dodataka.

Tretmani s čistom mikroplastikom i gumom (P1, P2, P3 i P4) sadržavali su hranjivu podlogu S u koju sam neposredno prije pokusa dodala mikročestice plastike i gume u količini potrebnoj za postizanje konačnih koncentracija (20, 100, 1000 i 10000 čestica po litri). Postupak

prebacivanja mikročestica iz pripremljenih paketića s prethodno izbrojanim česticama u hranjive podloge provela sam u laminaru kako se hranjive podloge ne bi kontaminirale.

Tretmani s onečišćenom mikroplastikom i gumom (M1, M2, M3, M4) sadržavali su hranjivu podlogu S u koju sam neposredno prije pokusa dodala mikročestice plastike i gume onečišćene smjesom olova, cinka i bakra. Kako bih pripremila onečišćene mikročestice plastike i gume, prethodno izbrojane čiste mikročestice plastike i gume inkubirala sam tjedan dana u otopini olova, cinka i bakra u kojoj je svaki metal je bio zastupljen u koncentraciji od 8 g/L. Prije dodavanja u hranjivu podlogu, mikročestice plastike i gume s adsorbiranim teškim metalima su iz otopine teških metala izdvojene vakuum filtracijom.

Metoda vakumske filtracije izvedena je pomoću vakuum pumpe s tlakom do 1 bara (Sartorius, Njemačka, 16309), na koju su spojene staklena tikvica od 1000 mL za skupljanje filtrata, držača filtera od stakla u PTFE prstenu (politetrafluoretilen), metalne stezaljke, staklenog lijevka od 250 mL i staklene baze s priključkom na crijevo. Smjesu teških metala i čestica mikroplastike profiltrirala sam kroz polikarbonatni filter papir (\varnothing 47mm, pore 0,5 μ m). Filter papir na kojem su nakon filtracije zaostale onečišćene mikročestice pažljivo sam prenijela u Erlenmeyerove tikvice (Slika 2).



Slika 2. Prebacivanje filter papira sa onečišćenim mikročesticama plastike i gume u tikvicu s hranjivom podlogom (Izvor: E. Kokić).

Kao model prirodnih čestica (sličnih česticama mikroplastike) koristila sam usitnjeno lišće. **Tretman s usitnjenim lišćem (L1, L2, L3 i L4)** pripremila sam na identičan način kao i tretman s čistim mikročesticama plastike i gume, samo što su u hranjivu podlogu S dodane čestice usitnjenog lišća (Slika 3).



Slika 3. Čiste čestice mikroplastike i gume u hranjivoj podlozi po Steinbergu. (Izvor: E. Kokić)

Također, prije samog presađivanja biljaka sav potreban metalni pribor (pincete i eze) i filter papir, autoklavirala sam pri temperaturi od 120 °C i tlaku od 1,5 atm u trajanju od 20 minuta. Sav korišteni pribor prilikom presađivanja biljaka u laminaru sam dodatno sterilizirala uranjanjem u 96% etanol i spaljivanjem nad plamenikom.

3.3. Mjerenje teških metala u biljkama i hranjivim podlogama

Kako bih izmjerila količinu teških metala u biljkama i hranjivim podlogama, pripremila po tri replike za svaki od analiziranih tretmana u pokusu. Za kvantitativno određivanje sadržaja Pb, Zn, Cu, Fe, Ca i Mg u biljkama te hranjivim podlogama koristila sam atomsku emisijsku spektroskopiju uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) (Thermo Fischer iCAP6300 Duo).

ICP-AES je metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje elemenata. Nakon unošenja peristaltičkom pumpom u raspršivač te u plazmu argona (ionizirani plin visoke temperature (5500 - 8000 K) dolazi do desolvacije, vaporizacije, atomizacije i ionizacije uzorka. Sudaranje elektrona i iona u plazmi rezultira pobuđivanjem atoma uzorka. Pomoću ICP-AES izdvajaju se valne duljine specifične za pojedini element, pri čemu je intenzitet emitiranog zračenja proporcionalan koncentraciji elementa u uzorku.

Sadržaj teških metala mjerila sam u barskoj leći uzgojenoj na najvišoj koncentraciji mikročestica lišća (tretman L4) i čiste plastike i gume (tretman P4) te u svim koncentracijama mikročestica plastike i gume s onečišćenih teškim metalima (M1, M2, M3, M4). Osim u biljnom materijalu, sadržaj teških metala odredila sam i u hranjivim podlogama bez nasadenih biljaka za sve koncentracije onečišćene mikroplastike te za najvišu koncentraciju čiste mikroplastike. Sadržaj teških metala u biljkama i podlogama izmjerila sam u tri replike.

Prije mjerenja teških metala u biljkama, prvo sam izvagala oko 50 mg liofiliziranog biljnog tkiva. Nakon toga provela sam razaranje biljnih uzoraka metodom mokre digestije pomoću zlatotopke u mikrovalnom sustavu za razaranje uzoraka Anton Paar Multiwave 3000 (koristeći rotor XFS-100 i teflonske posude volumena 100 mL). Biljni materijal razoren je pomoću smjese od 5 mL HNO₃ (65 %, p.a., Carlo Erba Reagenti, Italija) i 2 mL H₂O₂ (30 %, p.a., Carlo Erba Reagenti, Italija). Na identičan način pripremila sam i slijepu probu. Između dva uzastopna mjerenja, korištene teflonske kivete isprala sam ultračistom vodom te zatim sušila na sobnoj temperaturi.

Kalibraciju uređaja za mjerenje optičkog emisijskog spektrometra (ICP-OES) provela sam koristeći se serijom standardnih otopina poznatih koncentracija elemenata koje sam mjerila. Otopine su priređene razrjeđivanjem originalnih standardnih otopina:

– Multielement standard solution (koja sadrži Al, Ag, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn; 5 % HNO₃) 100 mg/L, CPAChem, Bugarska

– Multielement standard solution III for ICP (koja sadrži Ca, Mg, K, Na; 5 % HNO₃), Fluka/Sigma-Aldrich, Švicarska

Kako bih izmjerila sadržaj teških metala koja se s onečišćenih mikročestica plastike i gume otpušta u hranjivu podlogu (*leaching*), pripremila sam po tri replike hranjive podloge bez nasadenih biljaka za sve koncentracije mikročestica s adsorbiranim teškim metalima (tretmani M1-M4), za najvišu koncentraciju čistih mikročestica plastike i gume (tretman 4P) te najvišu koncentraciju s usitnjenim lišćem (tretman 4L).

Epruvete od 50 mL pripremila sam za mjerenje tako da sam ih 3 dana sam držala u 10% (v/v) otopini HNO₃ (1 konc. HNO₃ : 9 ultračista H₂O), isprala ih pet puta u ultračistoj H₂O i osušila u laminaru (24h). Podloge (40 mL) sam profiltrirala i ulila u pripremljene epruvete te zatim zakiselila s 1% sp konc. HNO₃, promućkala i čuvala na +4°C do mjerenja.

3.4. Adsorpcija čestica mikroplastike, gume i lišća na biljke

Kako bih procijenila potencijalnu adsorpciju čestica mikroplastike, usitnjene gume i lišća na biljke, nasumično sam uzorkovala po jednu koloniju (s dva listića) iz svake replike pojedinih tretmana. Uz pomoć lupe sam za svaku koloniju zabilježila nekoliko podataka - jeli došlo do adsorpcije čestica, koja vrsta čestica mikroplastike se adsorbirala i na koji organ (frond ili korijen).

3.5. Lemna - test i biokemijski pokazatelji u barskoj leći

Lemna - test ISO 20079 – stopa rasta

Na pripremljene hranjive podloge (K, P, M, L) od kojih je svaka priređena u 4 koncentracije (20, 100, 1000 i 10000 čestica po litri) te u tri biološke replike, u sterilnim uvjetima u laminaru nasadila sam 35±2 biljaka barske leće. Nasađene biljke sam uzgajala tijekom sedam dana pri temperaturi od 24±1°C uz rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki (90 μEm⁻²s⁻¹) u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) u klima-komori. Tijekom sedmodnevne inkubacije biljke su svaki dan u dva navrata lagano promiješane (simulacija gibanja uslijed vjetra na prirodnom staništu).

Rast biljaka sam pratila na temelju određivanja broja listova (tzv. frondova) biljke i mase svježe tvari nakon sedam dana izlaganja testnim hranjivim podlogama. Sve biljke sam nakon tjedan

dana inkubacije izvagala kako bih iz dobivenih podataka mogla izračunati stopu prirasta mase svježe tvari biljaka. Pri brojanju biljaka, uzela sam u obzir i najmanji frond biljke vidljiv golim okom. Stopu rasta sam izračunala prema sljedećoj formuli (ISO/CD 20079, 2005):

$$\text{stopa rasta} = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

pri čemu su:

x_{t_1} – vrijednost promatranog parametra u vremenu t_1 (dan nasađivanja)

x_{t_2} – vrijednost promatranog parametra u vremenu t_2 (sedmi dan pokusa)

$t_2 - t_1$ – vremenski period između dana posljednjeg dana pokusa i dana nasađivanja (sedam dana)

Zatim sam sve biljne materijale isprala ultračistom destiliranom vodom (engl. *Mili-Q Ultrapure Water*) nekoliko puta, kratko posušila biljke na filter papiru. Biljni materijal sam potom liofilizirala tijekom 24 sata na temperaturi od -60°C pod tlakom od 0,01 mbar (liofilizator Alpha 1-2, Christ, Germany). U liofiliziranom biljnom materijalu analizirala sam sadržaj pigmenata i ukupnih topivih proteina, izmjerila aktivnost enzima (katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, suproksid-dismutaze i glutation-S-transferaze) te sadržaj karbonila i produkata lipidne peroksidacije.

Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

U smeđe Eppendorf epruvete stavila sam 10 mg prethodno liofiliziranog biljnog materijala i metalnu kuglicu kako bi pospješila homogenizaciju samih uzoraka. Eppendorf epruvete s biljnim materijalom složila sam u nosače te ih ohladila u tekućem dušiku radi učinkovitije homogenizacije biljnog tkiva. Uzorke sam homogenizirala u mlinu (IST 400) 1 min na 30000 Hz. Zatim sam u uzorke dodala 1500 μL 80% - tnog hladnog acetona i ponovno ih homogenizirala još 1 min na 30000 Hz. Ekstrakte uzoraka sam potom centrifugirala u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri 4°C 10 minuta na $5000 \times g$. Dobiveni supernatant sam prelila u nove čiste smeđe Eppendorf epruvete. Sadržaj fotosintetskih pigmenata mjerila sam na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific) koristeći pločice s jažicama s ravnim dnom (Brand). U jažice sam otpipetirala 300 μL uzorka i istovremeno izmjerila apsorbancije na tri valne duljine: 663 nm, 646 nm i 470 nm. Sadržaj

fotosintetskih pigmenata - sadržaj klorofila *a* (chl *a*), klorofila *b* (chl *b*) i ukupnih karotenoida (car) odredila sam prema sljedećim jednadžbama (Wellburn, 1994):

$$\begin{aligned} \text{a) za klorofil } a: & \quad c_a = \frac{12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}}{1 \times 1000 \times m} \times V \\ \text{b) za klorofil } b: & \quad c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}}{1 \times 1000 \times m} \times V \\ \text{c) za ukupne karotenoide: } & \quad c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{1 \times 1000 \times m} \times V \end{aligned}$$

pri čemu je:

c_a – sadržaj klorofila *a* $\left[\frac{mg}{g} \text{ suhe tvari} \right]$

c_b – sadržaj klorofila *b* $\left[\frac{mg}{g} \text{ suhe tvari} \right]$

c_k – sadržaj ukupnih karotenoida $\left[\frac{mg}{g} \text{ suhe tvari} \right]$

$A_{646,663,470}$ – apsorbancije uzoraka pri 663 nm, 646 nm i 470 nm

V – volumen uzorka [mL]

l – duljina optičkog puta = 1cm

m – masa uzorka

Određivanje sadržaja topivih proteina

U prozirne Eppendorf epruvete odvagala sam po 10 mg prethodno liofiliziranog biljnog materijala. U svaki uzorak dodala sam po jednu kuglicu, složila ih u nosače te ohladila u tekućem dušiku. Uzorke sam homogenizirala u mlinu (IST 400) 1 min na 30000 Hz. Zatim sam u Eppendorf epruvete s usitnjenim tkivom dodala po 1000 μ L ekstrakcijskog kalij fosfatnog pufera (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH vrijednosti 7,0 uz dodatak 500 μ L 10 mM EDTA) i homogenizirala još 1 min na 30000 Hz. U tako pripremljen homogenat dodala sam netopivi polivinilpolipirrolidon (PVPP) i centrifugirala ekstrakte u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi od 4°C 30 minuta na 29000 \times g. Dobiveni supernatant sam prelila u čiste Eppendorf epruvete te sam ga kasnije iskoristila kako bih odredila sadržaj topivih proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima te sadržaj malondialdehida i karbonila.

Za određivanje koncentracije topivih proteina koristila sam metodu po Bradfordu (1976) koja se temelji na vezanju boje Coomasie Brilliant Blue G-250 na proteine. Reagens po Bradfordu sadrži crveni protonirani oblik boje Coomasie Brilliant Blue G-250 koji tijekom 40 minuta inkubacije s proteinima prelazi u neprotonirani plavi oblik koji ima maksimum apsorpcije pri

595 nm. Reakcijsku smjesu za mjerenje slijepe probe sam pripremila miješajući 200 μL Bradford reagensa s 10 μL kalij fosfatnog pufera (50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH vrijednosti 7,0 uz dodatak 500 μL 10 mM EDTA), a reakcijsku smjesu za mjerenje količine proteina u uzorcima miješajući 200 μL Bradford reagensa s 10 μL pripremljenih uzoraka. Koncentracija proteina u uzorcima određena je pomoću baždarne krivulje koja je izrađena na pomoću otopina albumina goveđeg seruma (BSA – *bovine serum albumin*) poznatih koncentracija (u rasponu od 0,1 do 0,8 mg/ml).

Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

Superoksid dismutaza (SOD)

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) odredila sam na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific) pri 560 nm prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Metoda se bazira na sustavu ksantin/ksantin oksidaza u kojem se stvaraju superoksidni radikali. Kako nastaju, superoksidni radikali reduciraju supstrat nitro plavi tetrazolij diklorid (NBT) u ljubičasto-plavi spoj diformazan koji ima maksimum apsorpcije upravo pri 560 nm. Ukoliko je enzim SOD prisutan i aktivan u uzorku, tada SOD smanjuje koncentracije superoksidnih radikala razgrađujući ih u vodikov peroksid i kisik. Posljedično se smanjuje nastajanje ljubičasto-plavog diformazana kao i apsorbancija pri 560 nm.

Prije mjerenju aktivnosti enzima SOD u biljnim uzorcima, najprije sam mjerila maksimalnu brzinu redukcije NBT u diformazan. Pripremila sam reakcijsku smjesu koja se sastoji od 165 μL SOD reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatnog pufera, 75 μM NBT i 0,1 mM EDTA; pH= 7,8), 15 μL 10,8 mM ksantina, 10 μL ekstrakcijskog pufera i 10 μL destilirane vode. Otopinu ksantina (10 mL) koncentracije 10,8 mM priredila sam otapajući 16,4 mg ksantina uz lagano zagrijavanje i dodatak par kapi KOH. Pripremila sam razrijeđeni enzim ksantin oksidazu (XOD) 0,05 U/mL (1 mL) te ga čitavo vrijeme držala na ledu budući da je tako razrijeđeni enzim stabilan samo 1 sat. Reakcijsku smjesu za nuliranje (slijepa proba) pripremila sam miješajući 165 μL SOD reakcijskog pufera, 15 μL ksantina koncentracije 10,8 mM, 10 μL ekstrakcijskog pufera i 10 μL dH_2O . Reakcijsku otopinu za mjerenje maksimalne brzine redukcije, pripremila sam miješajući 165 μL SOD reakcijskog pufera, 15 μL ksantina koncentracije 10,8 mM, 10 μL ekstrakcijskog pufera te 10 μL 0,05 U/mL ksantin oksidaze (XOD). Nakon pipetiranja reakcijskih otopina za nuliranje i uzorka za mjerenje maksimalne brzine redukcije NBT u jažice, uzorke sam prvo protresla (5 s u mikročitaču), nakon čega sam

mjerila apsorbanciju pri 560 nm tijekom ukupno 210 sekundi (7 mjerenja svakih 30 sekundi). Kako bi se u sljedećim mjerenjima s biljnim uzorcima standardizirala količina superoksidnog radikala, inicijalna promjena apsorbancije podešena je na vrijednost $0,025/\text{min} \pm 0,005$.

Reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti SOD u biljnim uzorcima pripremila sam miješajući 165 μL SOD reakcijskog pufera, 15 μL ksantina koncentracije 10,8 mM, 9 μL ekstrakcijskog pufera, 10 μL 0,05 U/mL XOD i 1 μL uzorka.

Konačni rezultat aktivnosti SOD izrazila sam u jedinicama aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina) koristeći se kalibracijskom krivuljom napravljenom s goveđim SOD standardom pripremljenim u koncentracijama 0,005, 0,02, 0,05, 0,08, 0,15, 0,2 i 0,5 U/ μL .

Katalaza (KAT)

Za određivanje aktivnosti katalaze (KAT) koristila sam metodu prema Aebi (1984) u kojoj se mjeri pad apsorbancije zbog razgradnje vodikovog peroksida pri valnoj duljini od 240 nm. Reakcijska smjesa za slijepu probu sadržavala je 250 μL KAT reakcijskog pufera (50 mM kalij fosfatnog pufera pH 7; 10 mM H_2O_2) te 8 μL ekstrakcijskog pufera. Reakcijska smjesa za mjerenje uzorka sadržavala je 250 μL KAT reakcijskog pufera te 8 μL uzorka. Aktivnost katalaze mjerila sam na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific) nakon 2 sekunde protresanja te praćenjem pada apsorbancije na 240 nm (zbog razgradnje H_2O_2) svakih 10 s tijekom 2 minute. Koristila sam pločice sa ravnim dnom za mjerenje pri UV (Eppendorf). Aktivnost KAT sam izrazila kao promjenu apsorbancije u μmol razgrađenog H_2O_2 u minuti (jedna jedinica – U) po miligramu proteina (U / mg proteina) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta A_{\lambda} = \frac{\Delta A_{sv} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times l} [\mu\text{mol} / \text{min ml}]$$

$$\frac{\text{aktivnost KAT } [\mu\text{mol} / \text{min ml}]}{\text{sadržaj proteina } [\text{mg} / \text{ml}]}$$

pri čemu je:

ΔA_{sv} – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 s

6 – faktor s kojim se množi ΔA_{sv} da bi se rezultat izrazio u minuti

$V_{r.s.}$ – volumen reakcijske smjese

V_{uz} – volumen uzorka

ϵ - ekstinkcijski koeficijent = $40 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

l – duljina optičkog puta

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka

Gvajakol peroksidaza (GPOD)

Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOD) odredila sam prema metodi Chance i Maehly (1955) koja se temelji na porastu apsorbancije pri 470 nm uslijed oksidacije gvajakola u tetrahidrogvajakol. Reakcijska smjesa za slijepu probu sadrži 250 μL GPOD reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatni pufer pH 7; 18 mM gvajakol; 5 mM H_2O_2) te 5 μL ekstrakcijskog pufera. Reakcijska smjesa za uzorak sadrži 250 μL GPOD reakcijskog pufera te 5 μL uzorka. Nakon pipetiranja svih sastojaka u jažice na pločicama sa ravnim dnom (Brand) za VIS, uslijedilo je 5 s miješanja te mjerenje apsorbanciju pri 470 nm tijekom 2,5 min (svakih 15 sekundi) na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific). Aktivnost GPOD izračunala sam kao porast apsorbancije u μmol nastalog tetragvajakola u minuti (jedna jedinica – U) po miligramu proteina (U / mg proteina), uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta A_{\lambda} = \frac{\Delta A_{sv} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times l} [\mu\text{M} / \text{min ml}]$$

$$\frac{\text{aktivnost GPOD } [\mu\text{mol} / \text{min ml}]}{\text{sadržaj proteina } [\text{mg} / \text{ml}]}$$

pri čemu je:

$$\lambda = 470 \text{ nm}$$

ΔA_{sv} – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 15 s (tijekom 2,5 min)

4 – faktor s kojim se množi ΔA_{sv} da bi se rezultat izrazio u minuti

Askorbat peroksidaza (APOD)

Za mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APOD) koristila sam metodu prema Nakano i Asada (1981) koja se temelji na praćenju smanjenja apsorbancije pri valnoj duljini od 290 nm uslijed potrošnje askorbata. Reakcijska smjesa za slijepu probu sadržavala je 225 μL APOD reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatni pufer pH 7; 0,1 mM EDTA), 2,5 μL 12 mM H_2O_2 , 2,5 μL 50 mM Na-askorbata te 20 μL ekstrakcijskog pufera. Reakcijska smjesa za uzorak sadržavala je sve isto kao i reakcijska smjesa za slijepu probu, osim što je umjesto 20 μL ekstrakcijskog pufera u reakcijsku smjesu dodano 20 μL uzorka. Vodikov peroksid sam dodavala u reakcijske smjese neposredno prije svakog mjerenja. Nakon pipetiranja svih

potrebnih sastojaka u jažice na pločicama sa ravnim dnom (Eppendorf) za UV, uslijedila je 1 s snažnog miješanja te mjerenje apsorbancije pri 290 nm u svakoj sekundi tijekom sveukupno 15 sekundi. Aktivnost APOD izrazila sam kao količinu potrošenog askorbata u μmol po minuti (jedna jedinica – U) po miligramu proteina (U / mg proteina) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta A_{\lambda} = \frac{\Delta A_{sv} \times 60 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times l} [\mu M / \text{min ml}]$$

$$\frac{\text{aktivnost APOD } [\mu\text{mol} / \text{min ml}]}{\text{sadržaj proteina } [\text{mg} / \text{ml}]}$$

pri čemu je:

$$\lambda = 290 \text{ nm}$$

ΔA_{sv} – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 1 s

60 – faktor s kojim se množi ΔA_{sv} da bi se rezultat izrazio u minuti

Glutation-S-transferaza (GST)

Za mjerenje aktivnosti glutacion-S-transferaze (GST) koristila sam metodu prema Habigu i Jacoby (1981) koja se temelji na praćenju porasta apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm uslijed nastanka konjugata između reduciranog glutaciona i 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB). Reakcijska smjesa za slijepu probu sadržavala je 250 μL GST reakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer pH 6,5; 1 mM EDTA), 2,5 μL 0,1 M CDNB, 20 μL 10 mM reduciranog glutaciona te 2,5 μL ekstrakcijskog pufera. Reakcijska smjesa za uzorak sadržavala je 250 μL GST reakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer pH 6,5; 1 mM EDTA), 2,5 μL 0,1 M CDNB, 20 μL 10 mM reduciranog glutaciona te 2,5 μL uzorka. Nakon što sam u jažice u pločici s ravnim dnom za UV (Eppendorf) pipetirala sve potrebne otopine, pločicu sam snažno protresla 5 s, nakon čega sam mjerila apsorbanciju na 340 nm svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute. Aktivnost GST izrazila sam kao promjenu apsorbancije u μmol nastalog CDNB po minuti (jedna jedinica – U) po miligramu proteina (U / mg proteina) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{350} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) prema sljedećoj jednadžbi:

$$\Delta A_{\lambda} = \frac{\Delta A_{sv} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times l} [\mu M / \text{min ml}]$$

$$\frac{\text{aktivnost GST } [\mu\text{mol} / \text{min ml}]}{\text{sadržaj proteina } [\text{mg} / \text{ml}]}$$

pri čemu je:

$$\lambda = 340 \text{ nm}$$

ΔA_{sv} – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 s

4 – faktor s kojim se množi ΔA_{sv} da bi se rezultat izrazio u minuti

Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Mjerenje karbonila provela sam prema metodi Levine i sur. (1990). 200 μL supernatanta koji je sadržavao najmanje 0,5 mg/ml proteina pomiješala sam s 300 μL 10 mM dinitrofenilhidrazinom (DNPH) u 2M HCl, kako bi se pocijepali proteini. Kao slijepu probu koristila sam alikvot istog uzorka (200 μL) te ga pomiješala samo s 300 μL 2M HCl (bez DNPH). Tako pripremljene uzorke sam inkubirala 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 minuta na tresilici (Vortex). Nakon inkubacije, u uzorke sam dodala 500 μL 10%-tne trikloroetene kiseline kako bi se potaknula precipitacija proteina. Nakon par minuta hlađenja na -20°C , uzorke sam centrifugirala 10 minuta (u rotoru 12154H centrifuge Sigma 3K18) pri $12\,000 \times g$. Nakon centrifugiranja, supernatant sam odlila, a u talog dodala 400 μL 6M uree otopljene u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) kako bi se talog otopio. Tako pripremljene uzorke prebacila sam u jažice pločica s ravnim dnom za UV (Eppendorf). Sadržaj karbonila temeljen na reakciji karbonilnih skupina s DNPH odredila sam mjerenjem apsorbancija uzoraka na 370 nm i 280 nm („oporavak“ proteina) na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific). Sadržaj dobivenih karbonila izrazila sam kao nmol po miligramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Baždarnu krivulju sam napravila s BSA u urei.

Određivanje sadržaja malondialdehida

Za određivanje sadržaja konačnog produkta lipidne peroksidacije – malondialdehida (MDA), koristila sam metodu prema Heathu i Packeru (1968). Najprije sam pripremila reakcijsku smjesu (reagens) sastavljenu od 0,25% tiobarbituratne kiseline (TBA) otopljene u 10%-tnoj trikloroetenoj kiselini (TCA) lagano zagrijavajući smjesu na miješalici do potpunog otapanja. Zatim sam otpipetirala 200 μL supernatanta (ekstrakta) i 300 μL pripremljenog reagensa u Eppendorf epruvetu od 2 ml. Kao slijepu probu koristila sam reakcijsku smjesu (reagens) uz dodatak 200 μL ekstrakcijskog pufera. Uzorke i slijepu probu sam zagrijavala u sušioniku na 95°C 30 minuta. Nakon toga, uzorke sam brzo ohladila u ledenoj vodenoj kupelji i centrifugirala

(u rotoru 12154H centrifuge Sigma 3K18) 10 minuta pri 4 °C na 10000 × g. Supernatante sam prenijela u jažice pločica s ravnim dnom za VIS (Brand) i izmjerila apsorbancije na mikročitaču (Multiskan Microplate Photometer, Thermo Scientific) pri valnim duljinama od 532 nm i 600 nm (zbog korekcije na nespecifičnu zamućenost). Prilikom zagrijavanja reakcijske smjese dolazi do raspadanja molekula lipidne peroksidacije i kao konačan produkt te reakcije nastaje malondialdehid. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA stvarajući crvenkastu boju i tom kompleksu kasnije mjerimo apsorbanciju pri 532 nm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je preko količine MDA prema sljedećoj jednadžbi u nmol/g suhe tvari:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{\Delta A \times V_{r.s.}}{V_{uz} \times \varepsilon \times m(g)}$$

pri čemu je:

A_{532} – apsorbancija izmjerena na 532 nm

A_{600} – apsorbancija izmjerena na 600 nm (specifično zamućenje)

$\Delta A = A_{532} - A_{600}$

ε - ekstinkcijski koeficijent = 155 mM⁻¹cm⁻¹

$V_{r.s.}$ – volumen reakcijske smjese

V_{uz} – volumen uzorka

m – masa tkiva (g)

3.6. Statistička obrada podataka

Dobivene podatke prikazala sam kao srednje vrijednosti tri replike ± standardna devijacija. Za statističku obradu podataka koristila sam računalni program STATISTICA 14.0 (TIBCO Software Inc., SAD), a za grafički prikaz Excel program Microsoft Office paketa. Statističku obradu dobivenih podataka provela sam pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA – eng. *Analysis of variance*) i primjenjujući *post hoc* Duncan test višestrukih usporedbi (*Duncan's New Multiple Range Test*, DNMR). Statistički značajnim podacima smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Otpuštanje metala s površine čestica mikroplastike

Kako bih utvrdila stupanj otpuštanja metala s površine čestica mikroplastike u hranjive podloge, napravila sam analizu sadržaja metala u čistoj hranjivoj podlozi (tretman K), kao i u hranjivim podlogama s dodatkom najviše koncentracije čiste mikroplastike i gume (tretman P4) i najviše koncentracije onečišćene mikroplastike i gume (tretman M4) nakon 7 dana inkubacije. Dobivene rezultate prikazala sam u Tablici 1. Količina bakra u hranjivoj podlozi s inkubiranim česticama čiste MP (tretman P4) i česticama MP onečišćenim smjesom teških metala (tretman M4) je statistički značajno veća u odnosu na kontrolnu podlogu. Također, količina olova u hranjivoj podlozi s inkubiranim česticama MP onečišćenim smjesom teških metala je statistički značajno veća nego u kontrolnim podlogama. Za razliku od Cu i Pb, čiji sadržaj je značajno povišen u hranjivim podlogama s inkubiranim česticama MP, sadržaj cinka nije se značajnije promijenio u odnosu na kontrolne podloge.

Tablica 1. Rezultati otpuštanja metala s površine MP u hranjive podloge

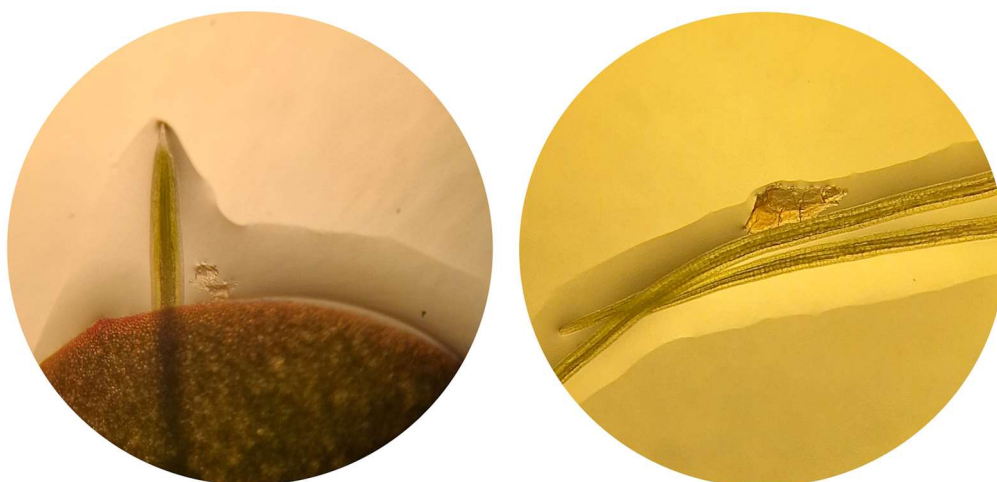
$\mu\text{g/L}$	Cu	Pb	Zn
Tretman K	$0,738 \pm 0,062$	$1,02 \pm 0,177$	$68,12 \pm 6,192$
Tretman P4	$7,10 \pm 0,429^*$	$2,01 \pm 0,549$	$75,75 \pm 6,000$
Tretman M4	$10,34 \pm 0,670^*$	$3,77 \pm 0,601^*$	$71,40 \pm 2,432$

Prikazani brojevi predstavljaju srednju vrijednost tri replike \pm SD.

*označava statističku značajnost ($p < 0,05$).

4.2. Adsorpcija mikroplastike na barsku leću

Nakon 7 dana uzgoja barske leće na istraživanim hranjivim podlogama sa i bez dodatka čestica čiste i onečišćene mikroplastike i gume, izdvojila sam po jednu koloniju koja se sastojala od dvije biljke i promatrala pod lupom kako bih utvrdila postoji li adsorpcija čestica MP ili gume na biljke. Među analiziranim česticama mikroplastike i gume, čestice polipropilena, koje su ujedno i najnepravilnijeg oblika, su se najčešće adsorbirale na listiće i korijenčice biljaka (Slika 4). S obzirom na biljni organ, češća je bila adsorpcija čestica polipropilena na listićima u usporedbi s korijenom biljaka. I ostale čestice MP su se češće vezale za površinu lista (svi tretmani P i M), dok su se čestice usitnjenog lišća vezale samo za listove biljaka barske leće.



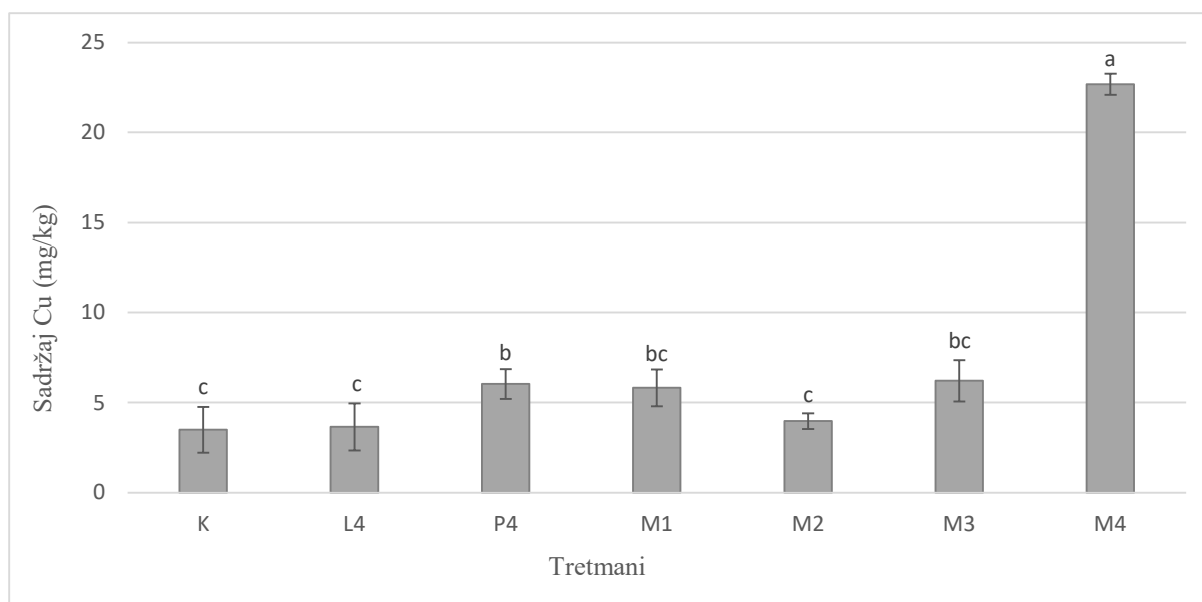
Slika 4. Adsorpcija polipropilena (tretman P4) na listiću i korijenu barske leće.

4.3. Sadržaj metala u biljkama

4.3.1. Bakar

Tretman P4 s najvećom koncentracijom dodanih usitnjenih čestica čiste MP i tretman M4 s najvećom koncentracijom dodanih usitnjenih čestica MP onečišćene smjesom teških metala, uzrokovali su statistički značajan porast sadržaja Cu u tretiranim biljkama u odnosu na kontrolne biljke (Slika 5).

Ostali tretmani nisu uzrokovali statistički značajne promjene sadržaja bakra u biljkama.



Slika 5. Sadržaj Cu (mg/kg) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu (K) te hranjivim podlogama s dodatkom usitnjenih čestica lišća u najvišoj koncentraciji (L4), s dodatkom usitnjenih čestica čiste MP i gume (P4) te usitnjenih čestica MP i gume onečišćenih teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

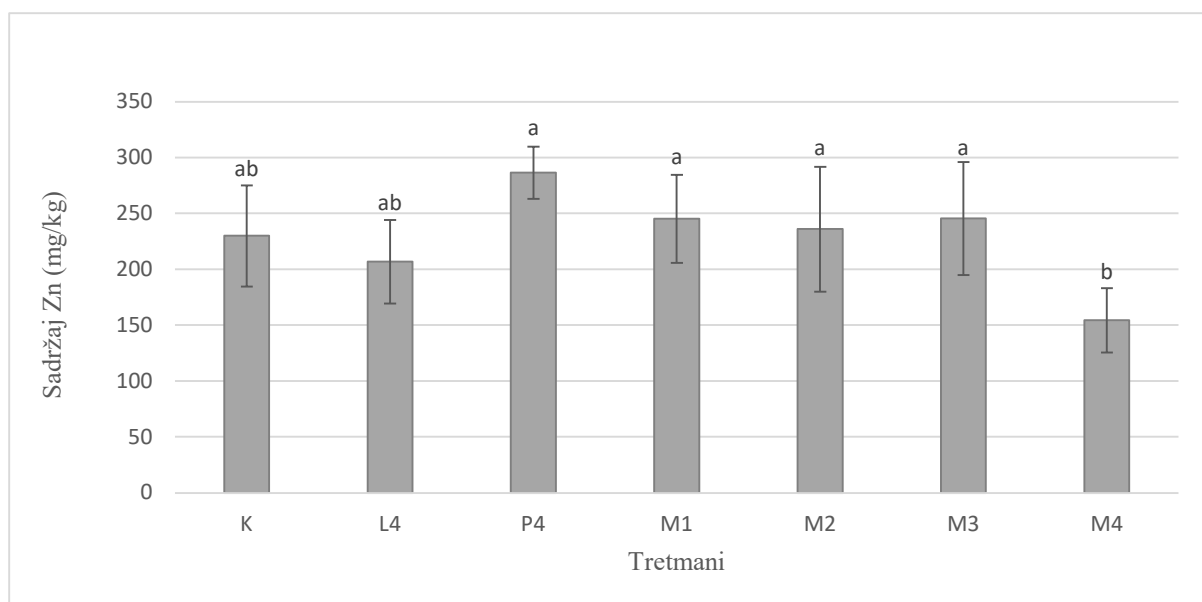
4.3.2. Olovo

Neovisno o tretmanu, sadržaj Pb u biljkama barske leće bio je ispod granice detekcije korištene metode (ICP-AES).

4.3.3. Cink

Neovisno o tretmanu u biljkama barske leće nisu zabilježene statistički značajne promjene u sadržaju Zn niti pri jednoj istraženoj koncentraciji u odnosu na kontrolu.

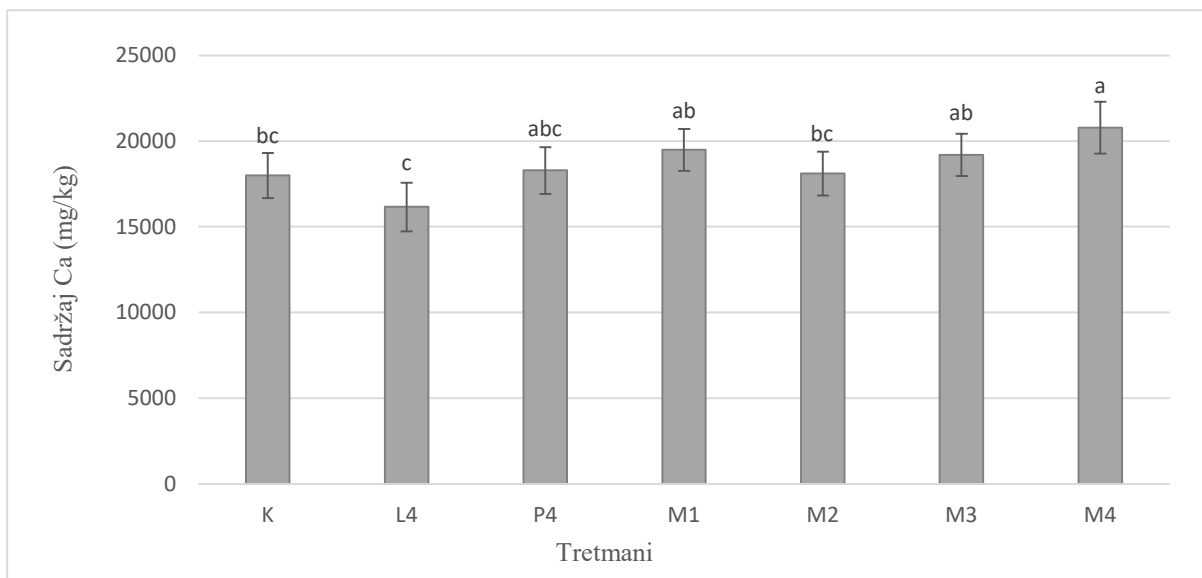
Iako nije bio statistički značajno povećan u usporedbi s kontrolom, lagani porast sadržaja Zn primijećen je u tretmanu P4 i u gotovo svim tretmanima M (Slika 6).



Slika 6. Sadržaj Zn (mg/kg) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu (K) te hranjivim podlogama s dodatkom usitnjenih čestica lišća u najvišoj koncentraciji (L4), s dodatkom usitnjenih čestica čiste MP i gume (P4) te usitnjenih čestica MP i gume onečišćenih teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3.4. Kalcij

U tretmanu M4 s najvećom koncentracijom čestica MP i gume onečišćene smjesom teških metala zabilježen je statistički značajan porast sadržaja Ca, dok se kod ostalih tretmana sadržaj Ca nije značajno mijenjao u odnosu na kontrolu (Slika 7).

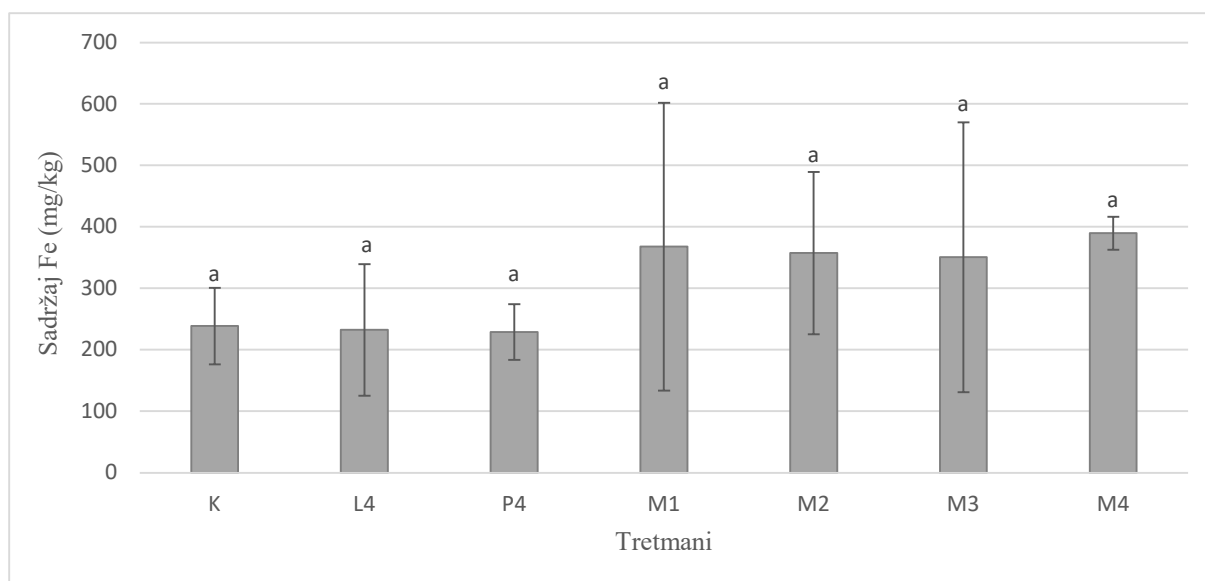


Slika 7. Sadržaj Ca (mg/kg) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu (K) te hranjivim podlogama s dodatkom usitnjenih čestica lišća u najvišoj koncentraciji (L4), s dodatkom usitnjenih čestica čiste MP i gume (P4) te usitnjenih čestica MP i gume onečišćenih teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3.5. Željezo

Neovisno o tretmanu, u biljkama barske leće nisu zabilježene statistički značajne promjene u sadržaju Fe niti pri jednoj istraženoj koncentraciji u odnosu na kontrolnu skupinu.

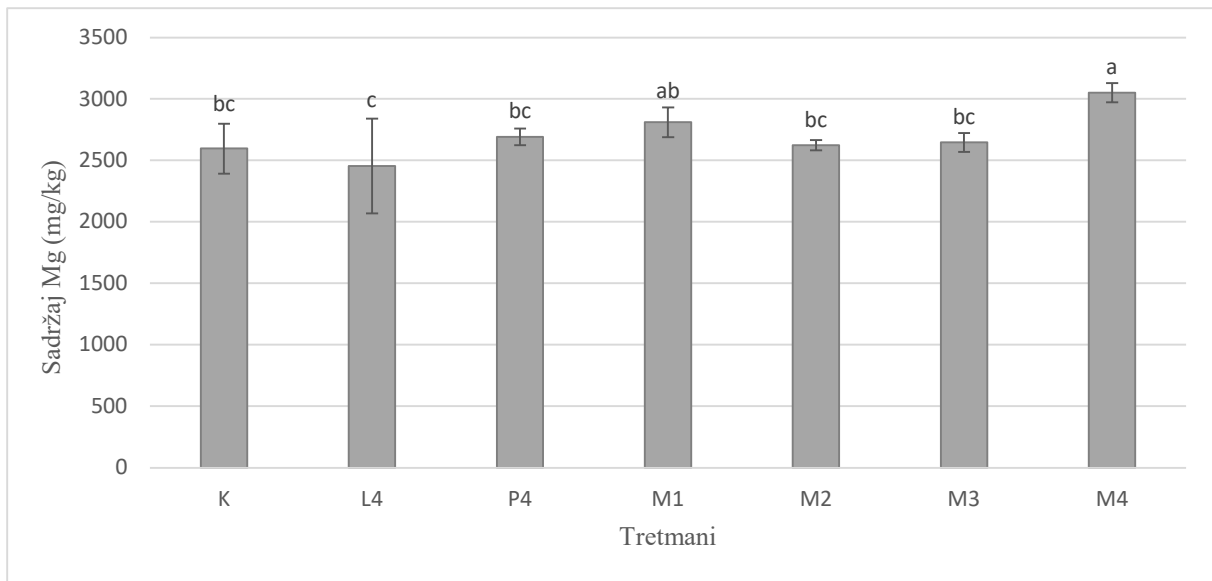
Primijećeno je povećanje sadržaja Fe u biljkama tretiranim česticama MP i gume onečišćene teškim metalima, ali ono nije bilo statistički značajno (Slika 8).



Slika 8. Sadržaj Fe (mg/kg) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu (K) te hranjivim podlogama s dodatkom usitnjenih čestica lišća u najvišoj koncentraciji (L4), s dodatkom usitnjenih čestica čiste MP i gume (P4) te usitnjenih čestica MP i gume onečišćenih teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3.6. Magnezij

U odnosu na kontrolu, statistički značajan porast sadržaja Mg u biljkama barske leće zabilježen je u biljaka tretiranih najvećom koncentracijom čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M4), dok ostali tretmani nisu uzrokovali statistički značajne promjene u sadržaju magnezija (Slika 9).

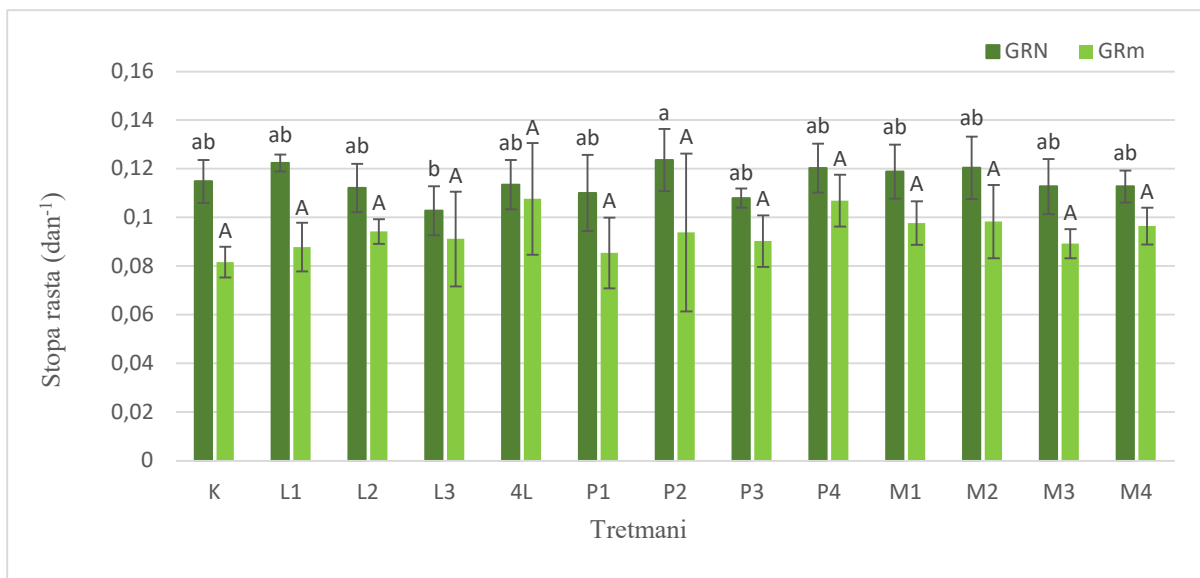


Slika 9. Sadržaj Mg (mg/kg) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu (K) te hranjivim podlogama s dodatkom usitjenih čestica lišća u najvišoj koncentraciji (L4), s dodatkom usitjenih čestica čiste MP i gume (P4) te usitjenih čestica MP i gume onečišćenih teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.4. Lemna – test ISO 20079 – stopa rasta

Na Slici 10. prikazana je stopa rasta biljaka barske leće izražena putem dva parametra (broja listića biljke te mase svježe tvari) nakon sedam dana izlaganja biljaka svim prethodno spomenutim tretmanima.

Neovisno o parametrima i tretmanima, stopa rasta barske leće u odnosu na kontrolnu skupinu se ne razlikuje statistički značajno.

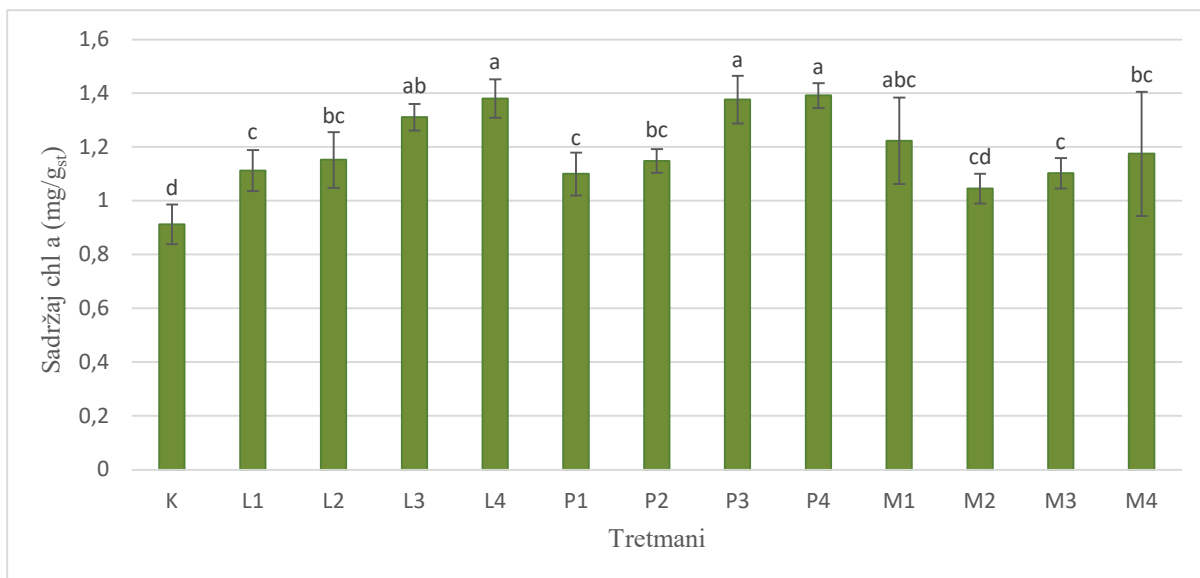


Slika 10. Stopa rasta izražena prema broju listića (GRN) i masi svježe tvari (GRm) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.5. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Na Slici 11. prikazana je količina klorofila *a* mjerena u uzorcima barske leće nakon sedam dana uzgoja na hranjivim podlogama po Steinbergu, kao i na podlogama koje su sadržavale dodane usitnjene čestice lišća, čestice čiste MP i gume te čestice MP i gume onečišćene teškim metalima.

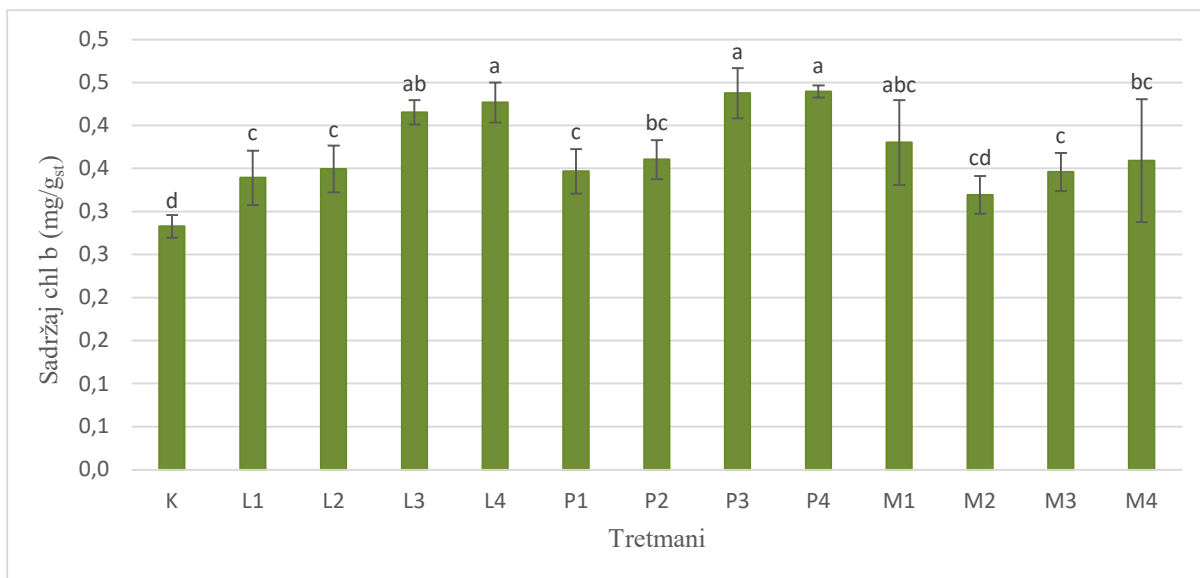
Svi tretmani, osim tretmana M2, pokazuju statistički značajan porast količine klorofila *a* u odnosu na kontrolu.



Slika 11. Sadržaj klorofila *a* (mg/g suhe tvari) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Na Slici 12. prikazana je količina klorofila *b* mjerena u uzorcima barske leće nakon sedam dana uzgoja barske leće na hranjivoj podlozi po Steinbergu, kao i na hranjivim podlogama u koje su dodane usitnjene čestice lišća, čestice čiste MP i gume te čestice MP i gume onečišćene teškim metalima.

Kao i kod klorofila *a*, svi tretmani osim tretmana M2, pokazuju statistički značajan porast količine klorofila *b* u odnosu na kontrolu.

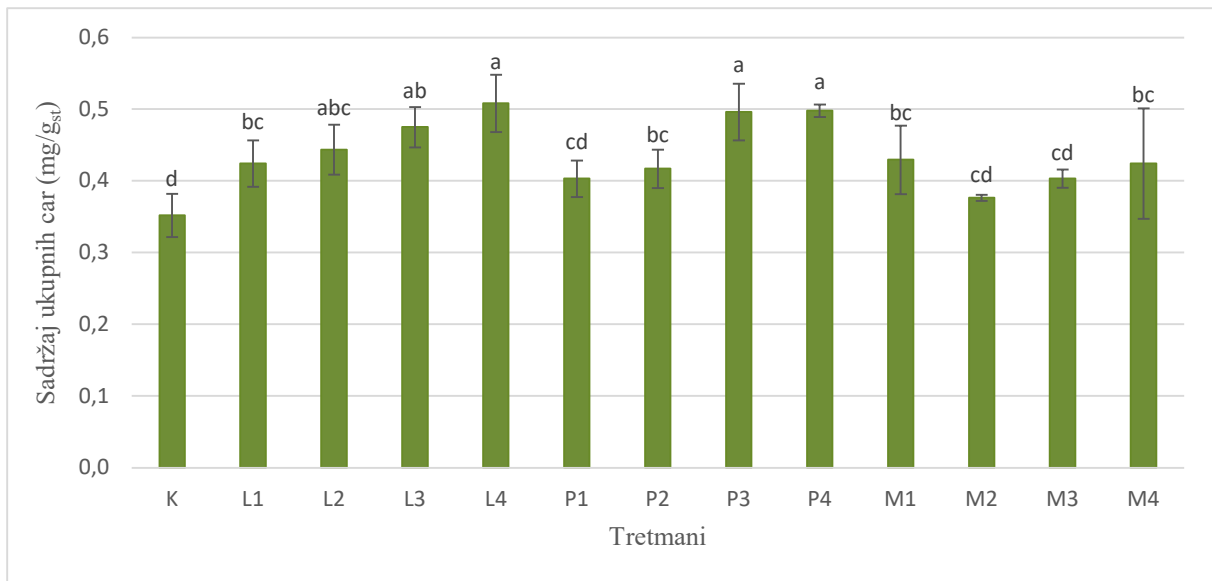


Slika 12. Sadržaj klorofila *b* (mg/g suhe tvari) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Na Slici 13. prikazana je količina ukupnih karotenoida mjerena u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja barske leće hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima.

Sadržaj karotenoida u barskoj leći izloženoj tretmanima P1, M2 i M3 ne razlikuje se statistički značajno od kontrole.

Količina ukupnih karotenoida kod ostalih tretmana je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu.

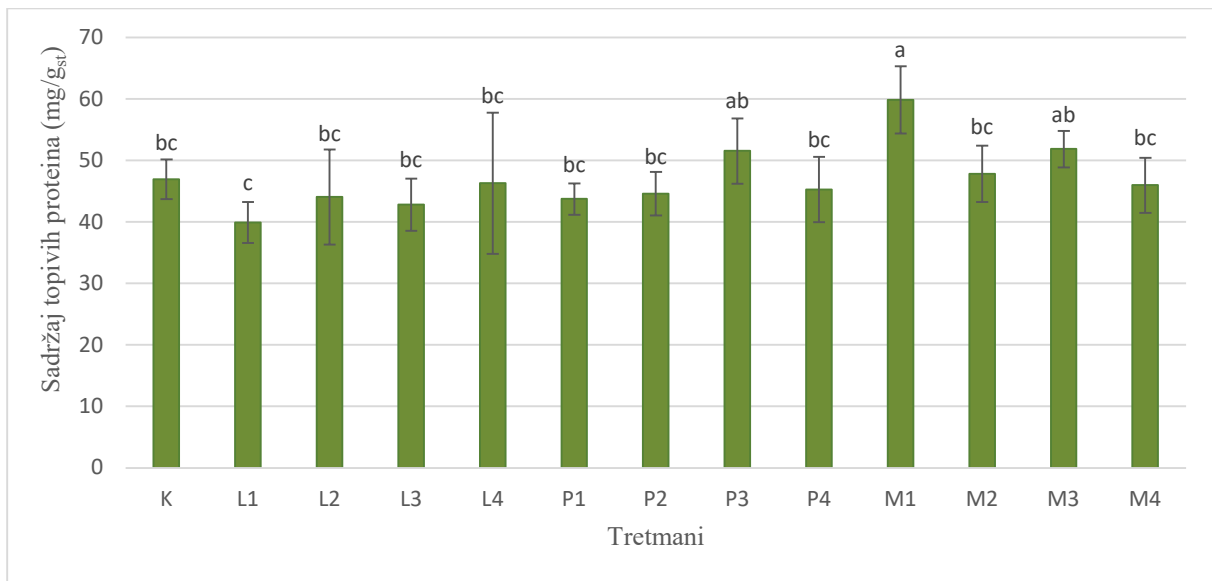


Slika 13. Sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g suhe tvari) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.6. Sadržaj topivih proteina

Na Slici 14. je prikazana količina ukupnih topivih proteina izmjerena u barskoj leći nakon sedam dana uzgoja na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima.

Dodatak analiziranih čestica nije značajno utjecao na sadržaj topivih proteina osim u tretmanu M1 gdje je uočen značajan porast sadržaja proteina (26% u odnosu na kontrolnu skupinu).

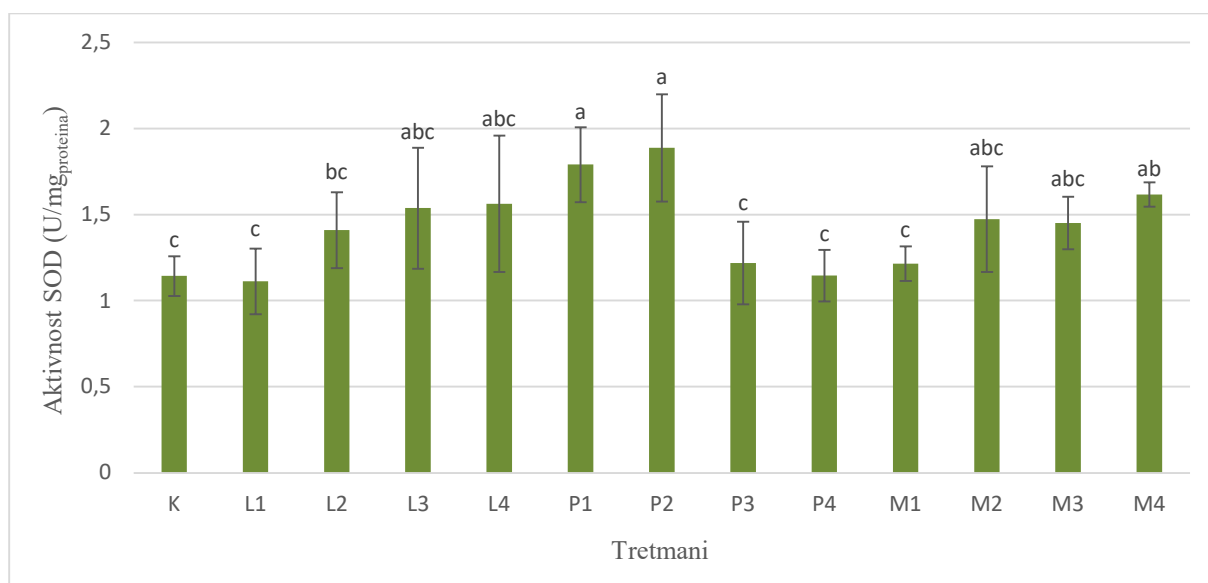


Slika 14. Sadržaj topivih proteina (mg/g suhe tvari) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.7. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Aktivnost enzima superoksid dismutaze mjerene u barskoj leći nakon sedam dana uzgoja na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima, prikazana je na Slici 15.

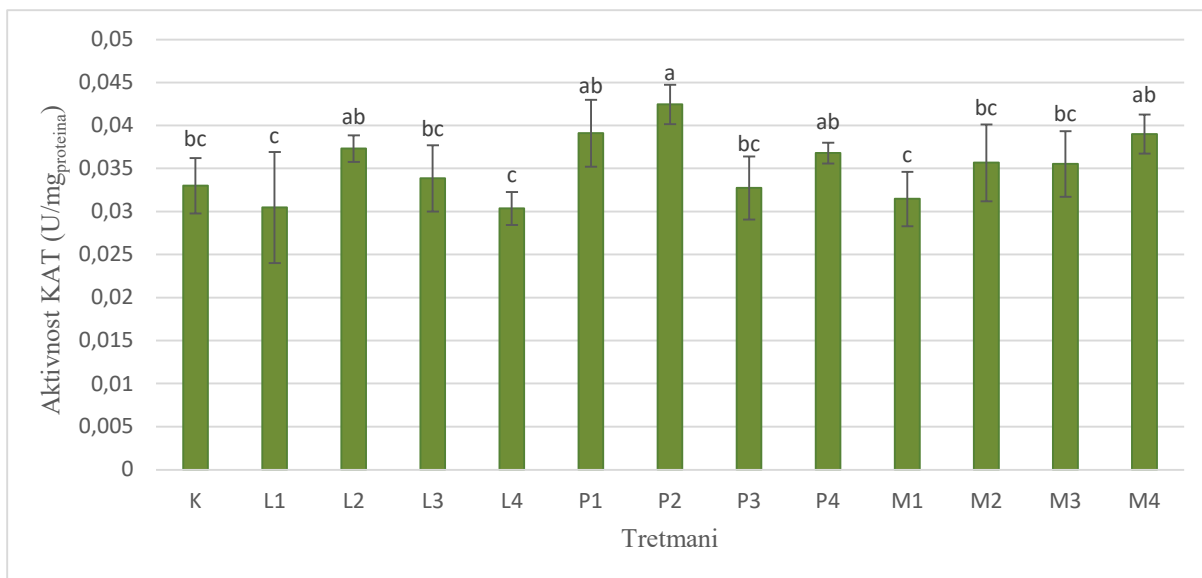
Pri tretmanima P1, P2 i M4 zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu, dok ostali tretmani nisu značajno utjecali na aktivnost tog enzima.



Slika 15. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD, U/mg proteina) mjerena u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Aktivnost katalaze mjerene u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja barske leće hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima, prikazana je na Slici 16.

Statistički značajno povećanje aktivnosti enzima KAT pokazao je tretman P2 (29% u odnosu na kontrolu), dok ostali tretmani nisu pokazali značajan učinak na aktivnost tog enzima.

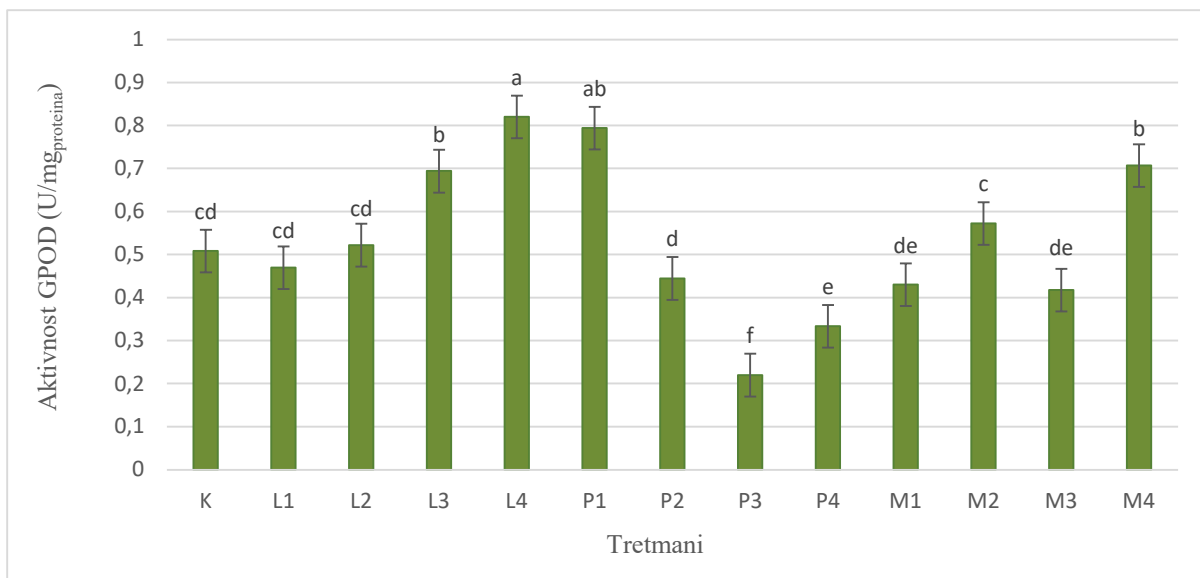


Slika 16. Aktivnost katalaze (KAT, U/mg proteina) mjerena u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Na Slici 17. prikazana je aktivnost gvajakol peroksidaze mjerene u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima.

Nakon izlaganja barske leće spomenutim tretmanima, statistički značajan porast GPOD u toj biljci uzrokovale su više koncentracije tretmana L (37-61% u odnosu na kontrolu), najniža koncentracija tretmana P (56% u odnosu na kontrolu) i najviša koncentracija tretmana M (39% u odnosu na kontrolu).

Najviše koncentracije tretmana P uzrokovale su statistički značajnu inhibiciju GPOD (smanjenje 35-57% u odnosu na kontrolu) u usporedbi s kontrolom i većinom ostalih tretmana.

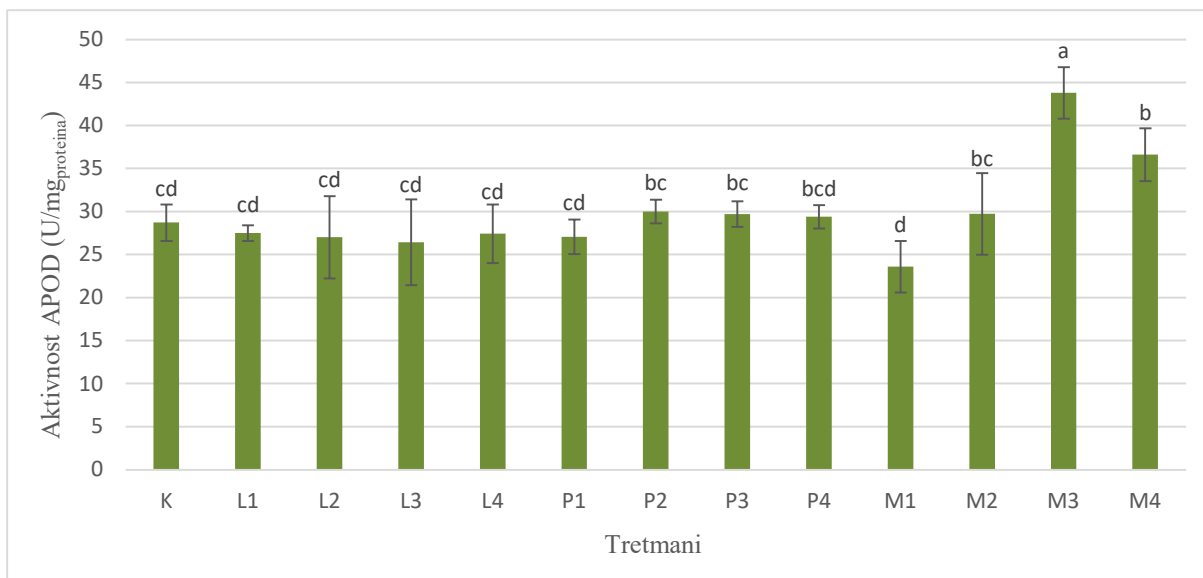


Slika 17. Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOD, U/ mg proteina) mjerena u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Na Slici 18. prikazana je aktivnost askorbat peroksidaze mjerene u barskoj leći nakon sedam dana uzgoja na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima.

Nakon izlaganja barske leće spomenutim tretmanima, zabilježene su statistički značajne promjene u aktivnosti APOD pri višim koncentracijama tretmana M u odnosu na kontrolu i ostale tretmane.

Najveći porast tog enzima od 53% u odnosu na kontrolu uzrokovao je tretman M3 u odnosu na kontrolu.

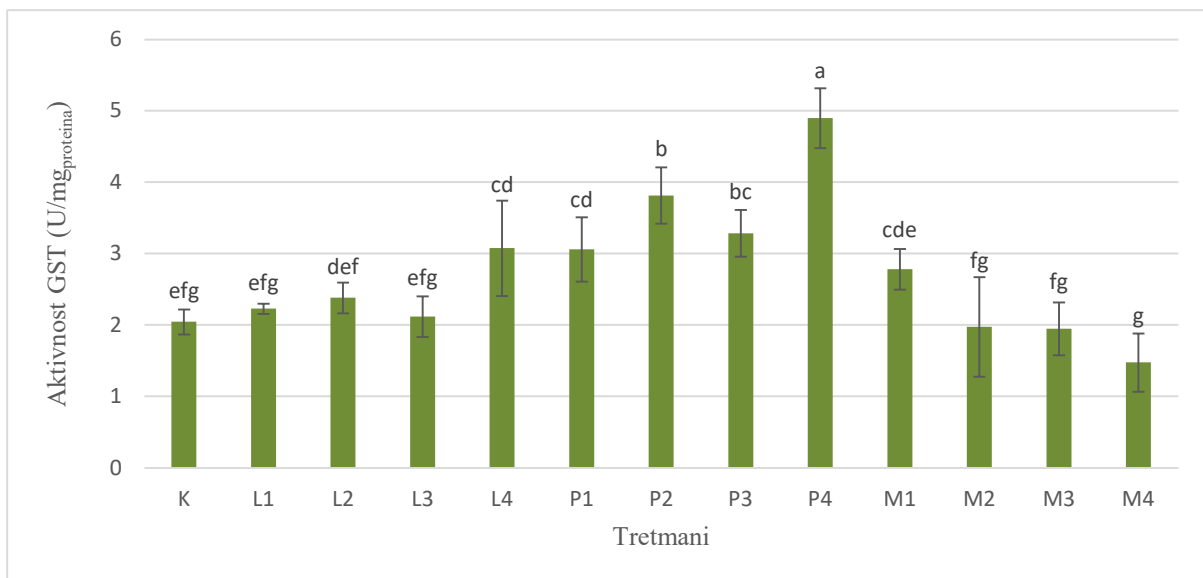


Slika 18. Aktivnost askorbat peroksidaze (APOD, U/ mg proteina) mjerena u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Slika 19. prikazuje aktivnost glutation-S-transferaze (GST) mjerene u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima.

Pri svim tretmanima s čistom MP i gumom te tretmanu s najvećom koncentracijom lišća (L4), zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti GST u odnosu na kontrolu.

Gotovo dva i pol puta veća aktivnost tog enzima u odnosu na kontrolu zabilježena je pri najvišoj koncentraciji s čistom mikroplastikom i gumom P4.

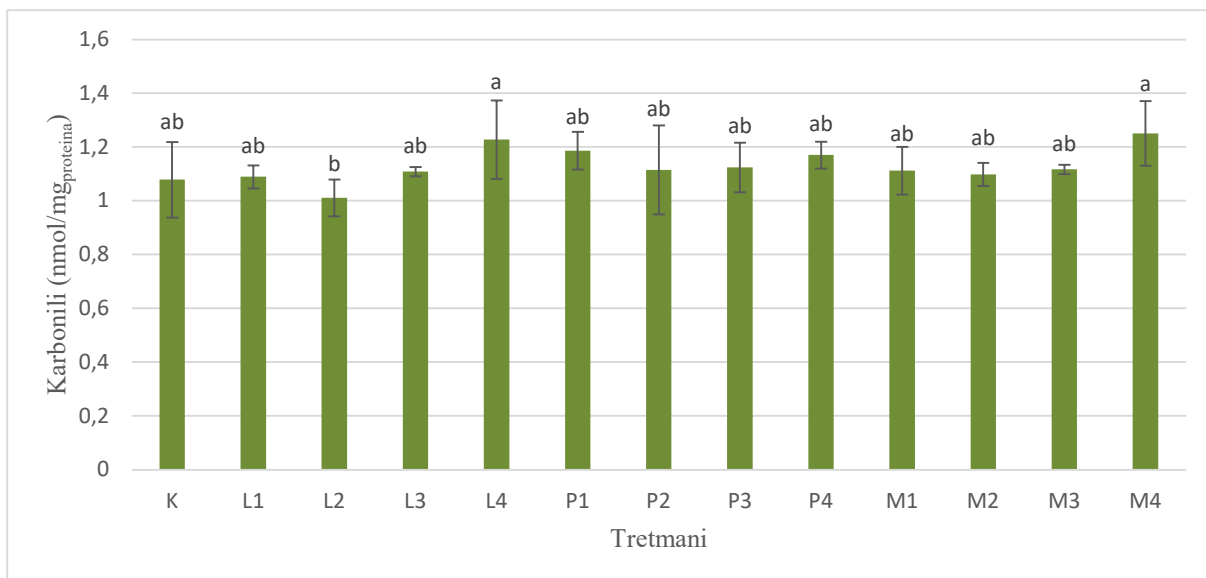


Slika 19. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST, U/mg proteina) mjerena u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.8. Sadržaj karbonila

Sadržaj ukupnih karbonila izmjerenih u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima prikazan je na Slici 20.

Nakon izlaganja barske leće spomenutim tretmanima, nijedan tretman nije uzrokovao statistički značajne promjene sadržaja karbonila u odnosu na kontrolu.

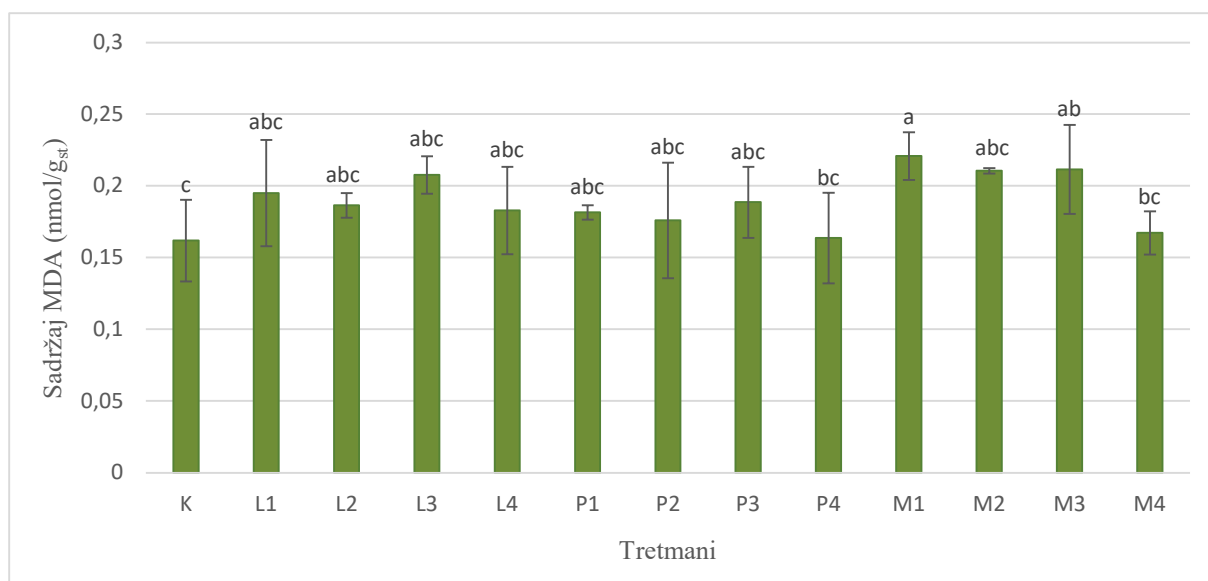


Slika 20. Sadržaj karbonila (nmol/mg proteina) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.9. Sadržaj malondialdehida

Sadržaj malondialdehida izmjeren u barskoj leći nakon sedam dana izlaganja hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez dodatka usitnjenih čestica lišća, čestica čiste MP i gume te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima prikazan je na Slici 21.

Tretmani M1 i M3 pokazuju povećan stupanj lipidne peroksidacije (porast MDA 31-36% u odnosu na kontrolu); sadržaj MDA pri ostalim tretmanima bio je sličan kontrolnim vrijednostima.



Slika 21. Sadržaj malondialdehida (MDA, nmol/g suhe tvari) u barskoj leći nakon 7 dana rasta na hranjivim podlogama po Steinbergu sa i bez usitnjenih čestica lišća (L1-L4), čestica čiste MP i gume (P1-P4) te čestica MP i gume onečišćene teškim metalima (M1-M4). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 3 replike \pm standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

5. Rasprava

Danas postoji samo nekoliko studija koje su usredotočene na proučavanje utjecaja plastičnih čestica na primarne proizvođače. Nedostatak istraživanja vaskularnih biljaka rezultira velikom prazninom u znanju o učincima i posljedicama plastičnih čestica na zdravlje ekosustava. Budući da vodene slatkovodne biljke pružaju utočište mnogim organizmima na višim trofičkim razinama i služe kao izvori hrane različitim vrstama vodenih i kopnenih biljojeda, potrebno je obratiti veliku pozornost na istraživanje utjecaja čestica plastike na vodene biljke, njihovu interakciju s drugim onečišćivačima i potencijalni prijenos duž hranidbene mreže (Eerkes – Medrano i sur., 2015). Vodene biljke, posebice plutajući makrofiti, koriste se kao indikatorske vrste za procjenu ekološkog rizika različitih biotičkih i abiotičkih stresnih čimbenika (Yu i sur., 2021). Rana i brza detekcija onečišćenja u okolišu pomoću biljaka sprečava biomagnifikacijske procese duž prehrambenih lanaca (Ceschin i sur. 2023).

U ovome radu istražen je utjecaj čiste MP (smjesa čestica polietilena, polistirena, polipropilena i gume) i MP onečišćene smjesom teških metala (bakar, olovo i cink) na stopu rasta barske leće (*Spirodela polyrhiza* L.) te na pojedine fiziološke i biokemijske pokazatelje oksidacijskog stresa (sadržaj fotosintetskih pigmenata, karbonila i malondialdehida te aktivnost antioksidacijskih enzima) s ciljem procjenjivanja barske leće kao modelnog organizma pogodnog za fitoremedijaciju.

Opsežna proizvodnja, potrošnja i neadekvatno zbrinjavanje plastičnog otpada, pridonijeli su svrstavanju plastike u jedan od glavnih onečišćivala današnjice. Zbog svoje ekonomske isplativosti i široke primjene, plastika je postala neizostavan materijal u svakodnevnom životu. Veći komadi plastike se djelovanjem različitih fizičkih i kemijskih procesa razgrađuju na manje čestice plastike koje tada nazivamo mikroplastika (MP). Tako usitnjene i degradirane čestice MP kasnije stupaju u interakciju s različitim organskim i anorganskim onečišćivačima adsorbirajući ih i mijenjajući tako njezina svojstva i ekotoksikološki učinak. MP najčešće na sebe adsorbira teške metale i postupno ih otpušta u okoliš (*leaching*) (Kalčikova i sur. 2020)

Teški metali kao što su bakar, olovo, cink, živa, nikal te mnogi drugi, pripadaju bionerazgradivim elementima koji se ne mogu eliminirati iz okoliša prirodnim procesima. Neki od metala, poput cinka, bakra, nikla i željeza spadaju u skupinu mikronutrijenata. Oni se moraju apsorbirati u malim količinama jer su neophodni za normalan rast i razvoj biljaka u kojima služe kao kofaktori pojedinih enzima (Singh i sur., 2022). No, u suvišku i ti esencijalni metali mogu djelovati negativno na biljku. Neesencijalni teški metali kao što su kadmij, olovo i živa,

nemaju korisna svojstva i štetni su kada njihova koncentracija u biljci prijeđe granične vrijednosti. Tada usporavaju rast i uzrokuju promjene u biokemijskim parametrima biljke (kao što su smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata i proteina) te aktiviraju obrambene mehanizme biljke (antioksidacijske enzime) s ciljem ublažavanja oksidacijskog stresa kako bi se spriječila stanična smrt (Singh i sur., 2022). Akumulacija i tolerancija biljaka na teške metale razlikuje se od vrste do vrste. Akumulacija teških metala u biljke i njihov prijenos kroz hranidbeni lanac može dovesti do ozbiljnih ekoloških i zdravstvenih problema.

U testovima toksičnosti, kao što je Lemna - test, jedan od najčešće korištenih parametara je stopa rasta biljaka. U ovome radu rast biljaka sam procijenila na temelju promjene broja listova i mase svježe tvari nakon 7 dana izlaganja barske leće testnim hranjivim podlogama. Rozman i sur. (2022) istražili su utjecaj kratkotrajne (7 dana) i dugotrajne (12 tjedana) izloženosti vodene leće *Lemna minor* polietilenskim česticama. Rezultati su pokazali da ni kratkotrajna ni dugotrajna izloženost polietilenskim česticama nisu utjecale na količinu ukupnih fotosintetskih pigmenata i specifičnu stopu rasta vodene leće *Lemna minor* bez obzira na koncentraciju čestica polietilena. Njihovi rezultati su u skladu s rezultatima koje sam dobila na barskoj leći *Spirodela polyrhiza* kod koje nakon 7 dana izloženosti smjesi čestica MP nije uočen učinak na stopu rasta biljaka, dok je sadržaj fotosintetskih pigmenata u barskoj leći kod većine istraživanih tretmana bio statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu. Vrste roda *Lemna* veoma su prilagodljive različitim zagađivačima i promjenama u okolišu, i kao takve toleriraju visoke koncentracije onečišćivača zbog čega ih se smatra idealnim modelom makrofita za fitoremedijaciju. U svojem radu Rozman i Kalčikova (2022) istraživali su učinak i prijanjanje tri vrste mikroplastike (polietilenskih mikroznaca, čestice usitnjene gume i vlakna polietilen-tetraftalata) i dvije vrste prirodnih čestica (čestice piljevine kore drveta i vlakna celuloze) na *Lemnu minor*. Rezultati su pokazali da vlakna celuloze i prirodne čestice nisu utjecale na specifičnu stopu rasta, sadržaj fotosintetskih pigmenata i duljinu korijena vodene leće, dok je uočeno značajno smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata kao i promjena morfologije biljaka izloženim mikroznacima polietilena i česticama istrošene gume. Smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata i promjena u morfologiji listova vodene leće upućuju na oštećenje fotosintetskog aparata. Analiza adsorbiranih čestica pokazala je najveći udio čestica polietilenskih mikroznaca (od svih vrsta mikroplastike i prirodnih čestica). Budući da je većina MP u slatkim vodama upravo polietilen, korištenje vodene leće za biomonitoring može pružiti važne informacije o onečišćenju slatkih voda MP. Također, Rozman i sur. (2022) naglasili su da oblik čestica MP predstavlja veliku važnost prilikom njihove adsorpcije i daljnjeg prijenosa niz hranidbeni lanac. Uspoređujući

čestice MP kuglastog oblika s česticama MP nepravilnih oblika (u obliku fragmenta ili vlakna), čestice kuglastog oblika su bile u puno manjoj mjeri adsorbirane na listove i korijenje biljaka te su imale malen ili nikakav utjecaj na organizme, za razliku od čestica nepravilnog oblika. Ovi rezultati se poklapaju i s rezultatima mojeg istraživanja gdje su čestice polipropilena nepravilnog oblika bolje i u većoj mjeri adsorbirale na listiće ili korijen barske leće za razliku od čestica polietilena koje su okruglog oblika.

Mikroplastika niske gustoće kao što su čestice od polistirena, polietilena i polipropilena, uglavnom je raspoređena u gornjim slojevima sporotekućih voda. Mikroplastika se često susreće sa slobodno plutajućim vodenim biljkama koje imaju korijenje i donju površinu vegetativnog tijela u izravnom kontaktu s vodom. Terenska istraživanja pokazala su kako neke vrste vodenih leća iz roda *Lemna* zadržavaju i fitostabiliziraju veliku količinu plutajućih zagađivača. Ceschin i sur. (2023) objašnjavaju fenomen adsorpcije plastičnog materijala od strane makrofita stvaranjem elektrostatskih sila između celuloznih sastojaka biljnih stanica i MP. Također, površinska morfologija može igrati važnu ulogu u interakciji MP i biljaka: što je složenija struktura biljke na površini, to više može vezati i zarobiti mikroplastiku uz svoje tkivo. Isto tako, ako je perifitonski sloj (npr. sastavljen od mikroalgi) prisutan na površini biljaka, stvara veću viskoznost koja povećava zadržavanje čestica MP na površini.

Obzirom na važnu ulogu vodenih makrofita u ekosustavima kao izvor hrane za niz organizama koji se nalaze na višim trofičkim razinama hranidbenog lanca, adsorpcija plastičnih čestica na korijenje vodenih biljaka može rezultirati prijenosom plastičnih čestica na različite vrste biljojeda unutar ekosustava. U istraživanju koje su proveli Dovidat i sur. (2019) pokazali su da izloženost barske leće nano- i mikroplastici ne utječe značajno na rast biljaka i proizvodnju klorofila, ali su rezultati mikroskopije pokazali adsorpciju čestica plastike (osobito sitnijih čestica – čestica nanoplastike) na vanjskim rubovima listića biljke, osobito na korijenju.

U svojem istraživanju Ozfidan-Konakci i sur. (2023) istražili su učinak čistih polistirenskih čestica kao i polistirenskih čestica tretiranih arsenom u trajanju od 7 dana. Rezultati su pokazali da u biljkama tretiranim čistim polistirenskim česticama dolazi do smanjenja udjela pojedinih mikro- i makroelemenata, među kojima su kalcij, magnezij, cink, bakar, kalij, fosfor i mangan, dok je u biljkama tretiranih onečišćenim česticama polistirena došlo do povećanja sadržaja kalcija i magnezija. U mojem istraživanju najviše koncentracije čiste MP izazvale su statistički značajan porast sadržaja bakra u barskoj leći, dok je u biljkama tretiranim najvišim koncentracijama MP onečišćene smjesom teških metala primjećeno statistički značajno nakupljanje Cu, Ca i Mg. Biljke koje su bile izložene česticama MP onečišćenih teškim

metalima uzrokovali su blagi porast sadržaja željeza i cinka, no taj porast nije bio statistički značajan.

Vodene i močvarne biljke mogu se koristiti u fitoremedijaciji onečišćenih voda. Među vodenim biljnim vrstama, biljke iz porodice *Lemnaceae* ističu se kao biljke s povećanim kapacitetom remedijacije organskih tvari i teških metala zbog svoje visoke tolerancije na spomenute zagađivače. Jednostavna građa, mala veličina i brzi rast čine ovu porodicu biljaka pogodnom za istraživanje toksičnosti različitih kemikalija i otpadnih voda. Dobro je poznato da biotički i abiotički stresni čimbenici ne uzrokuju samo oštećenje redoks homeostaze u biljnoj stanici, već i nakupljanje reaktivnih oblika kisika. ROS se proizvode kontinuirano kao produkti različitih metaboličkih putova, koji su lokalizirani u različitim staničnim odjeljcima kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi, ali u uvjetima stresa ta se proizvodnja povećava. Ti reaktivni oblici kisika se uklanjaju različitim mehanizmima antioksidativne zaštite (Uruc Parlak i Demirezen Yilmaz, 2012). Antioksidacijski sustavi su kompleksni i obuhvaćaju različite neenzimatske i enzimatske puteve koji su uključeni u proizvodnju antioksidansa ili uklanjanje oksidansa poput ROS-ova (Arora, 2002).

Glavna uloga antioksidacijskih enzima u svim organizmima je uklanjanje ROS-ova i ostalih štetnih molekula iz organizama. Prisutnost organskih i anorganskih onečišćivača može uzrokovati smanjenje ili povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, utjecati na stvaranje ROS-ova te tako povećati stupanj oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres nastaje kada proizvodnja ROS-ova nije usklađena s njihovom neutralizacijom pomoću antioksidacijskih molekula. Različite vrste biljaka različito reagiraju na određene vrste zagađivača, primjerice obični luk *Allium cepa* izložen tretmanima s polistirenskim česticama pokazuje visoki stupanj oksidacijskog oštećenja osobito pri visokim koncentracijama (Giorgetti i sur., 2020). Wang i sur. (2022) izvijestili su o smanjenju sadržaja fotosintetskih pigmenata u kukuruзу (*Zea mays*) izloženom polistirenskim česticama onečišćenim kadmijem, dok je kod riže (*Oryza sativa*) koja je podvrgnuta tretmanu kadmijem primjećeno povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima (Zhou i sur., 2021).

Glavni antioksidacijski enzimi biljaka uključuju superoksid dismutazu, katalazu i peroksidaze, od kojih je u biljaka posebice bitna askorbat peroksidaza, te glutation reduktaza. Zajedničkim djelovanjem navedenih enzima biljke ublažavaju i neutraliziraju štetne posljedice djelovanja ROS-ova (Rajput i sur., 2021). U ovome istraživanju istražila sam aktivnost pet različitih antioksidacijskih enzima: SOD, KAT, GPOD, APOD i GST. U provedenom istraživanju primijetila sam da i čista MP i MP tretirana smjesom teških metala mijenjaju aktivnost navedenih antioksidacijskih enzima. Aktivnost SOD bila je povećana u barskoj leći izloženoj

nižim koncentracijama čiste MP i gotovo svim koncentracijama MP onečišćene teškim metalima. Obzirom da ovaj enzim razgrađuje superoksidne ione (na vodikov peroksid i kisik), dobiveni rezultat navodi na zaključak da obje vrste MP uzrokuju povećanu produkciju superoksidnog iona u biljkama (Arora i sur., 2002).

Porast aktivnosti KAT primijećen je kod tretmana s čistom MP, iako statistički značajno povećanje tog enzima je utvrđeno samo pri koncentraciji 100 čestica/L. Budući da je uloga katalaze razgradnja vodikovog peroksida (Davies, 2000), povećanje aktivnosti katalaze je očekivana posljedica povećane aktivnosti SOD-a koja superoksidni ion disproporcionira u vodikov peroksid.

Budući da GPOD ima veći afinitet prema vodikovom peroksidu od KAT, ima važnu ulogu pri uklanjanju reaktivnih oblika kisika u stanici (Gill i Tuteja, 2010). Najniža koncentracija čiste MP je uzrokovala značajno povećanje GPOD, a više koncentracije čiste MP uzrokovale su statistički značajnu inhibiciju aktivnosti tog enzima. S druge strane, aktivnost APOD se nije značajno promijenila u odnosu na kontrolne biljke. Uruc Parlak i Demirezen Yilmaz (2012) istražili su učinak različitih koncentracija Zn na rast i nakupljanje Zn u *L.gibba*, *L. minor* i *S. polyrhiza*, kao i učinke na peroksidaciju lipida i aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD, KAT, APOD i GPOD). Aktivnost KAT se povećavala s povećanjem koncentracije Zn u sve tri vrste biljaka, ali je najviša koncentracija Zn uzrokovala inhibiciju aktivnosti tog enzima. Pretpostavka je da prekomjerna proizvodnja ROS uzrokovana teškim metalima može inaktivirati KAT inaktivacijom enzimski vezane hem skupine u peroksisomima stanice. Aktivnosti GPOD i APOD su se također povećale izlaganjem biljke sve većim koncentracijama Zn. Peroksidaze su povezane s oksidativnim reakcijama koje odgovaraju povećanju peroksida i slobodnih radikala u biljnim stanicama zbog metalnog stresa. Hiperaktivnost peroksidaza pod Zn stresom, ukazala je na njezinu ulogu u stalnoj detoksikaciji vodikovog peroksida.

Yang i sur. (2023) pokušali su utvrditi kako kombinacija dvaju zagađivača, kadmija i polietilenskih čestica, utječe na stopu rasta, sadržaj fotosintetskih pigmenata i aktivnost antioksidacijskih enzima u vodenoj leći *Lemna minor*. Rezultati su pokazali da različite koncentracije polietilenskih čestica onečišćenih kadmijem u različitim stupnjevima inhibiraju brzinu rasta i sadržaj klorofila u vodenoj leći. Aktivnost katalaze, peroksidaze i superoksid dismutaze povećala se proporcionalno s povećanjem koncentracije ova dva zagađivača. Količina MDA rasla je s različitim koncentracijama zagađivača, a najveće količine izmjerene su pri najvećim dodanim koncentracijama kadmija u mediju.

Karbonilacija proteina smatra se jednim od glavnih pokazatelja oksidacije proteina. Osim superoksidnog iona, hidroksilni ion, koji može nastati od superoksidnog iona, i singletni kisik

moгу izazvati oksidacijske promjene proteina (Dalle-Donne 2003). Rezultati mojeg rada nisu pokazali značajnije promjene u sadržaju i oštećenju topivih proteina. U istraživanju Uruc Parlak i Demirezen Yilmaz (2012), sadržaj ukupnih topivih proteina u nekoliko vrsta vodenih leća (*Lemna gibba*, *Lemna minor* i *Spirodela polyrhiza*) izloženih različitim koncentracijama cinka, mijenjao se s povećanjem koncentracije cinka u biljkama. Pri najvećoj koncentraciji cinka uočeno je smanjenje udjela proteina što može biti posljedica povećane aktivnosti proteaze ili nekog drugog kataboličkog enzima koji se aktiviraju u prisustvu teških metala. U svojem radu izmjerila sam sadržaj proteinskih karbonila u uzorcima barske leće kako bih utvrdila je li došlo do oštećenja proteina kod pojedinih tretmana. U mojem istraživanju sadržaj karbonila u istraženim tretmanima nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolu. Iako statistički nije značajan, primjećen je porast sadržaja proteinskih karbonila kod najviših ispitivanih koncentracija s čistom MP te čestica MP onečišćenih teškim metalima. Prekomjerno nakupljanje ROS-a u stanicama u konačnici rezultira oštećenjem pojedinih dijelova stanice i njihovom oksidacijom, a jedan od glavnih pokazatelja oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija. Koliki je stupanj oštećenja nastao lipidnom peroksidacijom odredila sam mjereći sadržaj MDA. Značajan porast sadržaja MDA u barskoj leći izloženoj česticama MP onečišćenim teškim metalima (M1 i M3) u odnosu na kontrolu, mogao bi biti posljedica toksičnog djelovanja nakupljenih metala, poglavito bakra. U radu Uruc Parlak i Demirezen Yilmaz (2012) uočeno je linearno povećanje sadržaja MDA s povećanjem koncentracije Zn u sve tri vrste vodenih leća. Budući da je MDA proizvod razgradnje polinezasićenih masnih kiselina biomembrana, njegovo povećanje pokazuje da su biljke izložene snažnijem oksidacijskom stresu.

Yu i sur. (2021) proveli su eksperiment kojim su istražili ekotoksičnost polistirenske MP i glifosata, posebno njihov kombinirani učinak, na vaskularnu plutajuću biljku *Salvinia cucullata*. Glifosat je značajno smanjio stopu rasta, fotosintetski kapacitet i aktivnost korijena biljke. Također su primijetili da je MP značajno smanjila aktivnost korijena *S. cucullata* zbog tendencije MP da se adsorbira i akumulira u korijenu što posljedično dovodi do mehaničkog oštećenja korijenskog sustava. Iako čista MP nije utjecala na razine fotosintetskih pigmenata, izlaganje biljaka kombiniranom djelovanju MP i glifosata izazvalo je prekomjerno nakupljanje ROS-ova i aktiviralo antioksidacijske obrambene sustave povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima. Značajno su se povećale razine SOD, APOD i KAT ispoljavajući sinergističke zaštitne učinke u održavanju stabilnosti stanica i rasta biljaka.

Song i sur. (2023) proveli su pilot istraživanje o mogućem fitotoksičnom učinku fluorescentne polistirenske MP na slobodno plutajućim vodenim biljkama *Spirodela polyrhiza*, *Salvinia*

natans i *Phragmites australis*, koristeći pri tome lasersku spektrofotometriju. Istraživanje je pokazalo da sve vodene biljke adsorbiraju čestice fluorescentne polistirenske MP. *S. polyrhiza* pokazala je značajno smanjenu biomasu nakon 3 tjedna izlaganju česticama MP, što se pripisuje mogućem smanjenju aseksualne reprodukcije biljke, dok *S. natans* nije pokazala nikakve razlike u biomasi. Smanjenje nadzemne biomase kod *P. australis* izazvano adsorpcijom čestica MP pripisuje se suženju ili začepljenju sustava cjevčica korijena biljke, koje su mogle ometati unos i translokaciju hranjivih tvari. Unatoč inhibiciji rasta biljaka, sadržaj klorofila nije se razlikovao među tretmanima, stoga se fitotoksičnost čestica MP prvenstveno očituje kao inhibicija rasta bez ubijanja biljaka. Ovo istraživanje je dobar dokaz da je akumulacija čestica MP različita i specifična kod pojedinih vodenih biljaka i da vjerojatno uzrokuje različite rezultate toksičnosti.

6. Zaključak

Temeljem provedenih analiza utvrđeno je da može doći do otpuštanja metala s površine čestica MP u hranjivu podlogu što je rezultiralo značajnim nakupljanjem Cu u barskoj leći *Spirodela polyrhiza* L..

Od svih čestica MP, čestice PP su se najčešće adsorbirale na listiće barske leće, no adsorpcija čestica MP utvrđena je samo pri najvišim primijenjenim koncentracijama MP.

MP u primijenjenim koncentracijama (bilo čista ili onečišćena teškim metalima) nije izazvala promjene u rastu barske leće *Spirodela polyrhiza* L., a nije uzrokovala ni smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata.

Analize utjecaja različitih koncentracija čiste MP i MP tretirane smjesom teških metala na pojavu oksidacijskog stresa, pružaju uvid u kompleksne biokemijske promjene koje se događaju u stanicama barske leće *Spirodela polyrhiza* L.. Varijabilni odgovor antioksidacijskih enzima sugeriraju da čista MP kao i MP onečišćena teškim metalima narušavaju redoks ravnotežu u stanicama barske leće. No, nepromijenjen sadržaj karbonila te tek blagi porast lipidne peroksidacije potvrđuju učinkovitost antioksidacijskog sustava, izostanak jačeg oksidacijskog stresa i posljedičnog oštećenja važnih biomolekula u istraženoj vrsti.

Zaključno, barska leća je pogodna vodena biljka za fitoremedijaciju čestica MP.

7. Literatura

- Aebi, H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105:121-126A.
- 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, 411-429.
- 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(372): 1331-1341.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science* 82: 1227-1238.
- Ayala, A., Munoz, M.F., Argüelles, S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 1-31.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Berni, R., Luyckx, M., Xu, X., Legay, S., Sergeant, K., Hausman, J. F., Lutts, S., Chai, G., Guerriero, G. (2018): Reactive Oxygen Species and heavy metal stress in plants: impact on the cell wall and secondary metabolism. *Environmental and Experimental Botany* 161: 98-106.
- Bolaji Umar, O., Amudalat Ranti, L., Shehu Abdulbaki, A., Lukman Bola, A., Khadijat Abdulhamid, A., Ramat Biola, M., & Oluwagbenga Victor, K. (2022): *Stresses in Plants: Biotic and Abiotic*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.100501
- Boots, B., Green, D.S., Olah – Kovacs, B., De Falco, F., Lupo, E. (2023): Physical and chemical effect of conventional microplastics glitter versus alternative glitter particles on a freshwater plant (Lemnaceae: *Lemna minor*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 263: 115-291.
- 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.
- Ceschin, S., Mariani, F., Di Lernia, D., Venditti, I., Pelella, E. (2023): Effects of Microplastic Contamination on the Aquatic Plant *Lemna minuta* (Least Duckweed). *Plants*, 12: 207.
- Chance, B., Maehly, A. C. (1955): Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.

- Chattopadhyay, S., Fimmen, R.L., Yates, B.J., Lal, V., & Randall, P.M. (2012). Phytoremediation of Mercury- and Methyl Mercury-Contaminated Sediments by Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *International Journal of Phytoremediation* 14: 142-161.
- 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.
- Davies, K.J.A (1995): Oxidative stress: the paradox of anaerobic life. *Biochemical Society Symposium* 61: 1-31.
- Davies, K.J.A. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement system. *IUBMB Life*, 50(4-5): 279-289.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R. (2010): Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71(4): 338-350.
- Dovidat, L.C., Brinkmann, B.W., Vijer, M.G., Bokser, T. (2019): Plastic particles adsorb to the roots of freshwater vascular plant *Spirodela polyrhiza* but do not impair growth. *Limnology and Oceanography Letters* 5.
- Eerkes – Medrano, D., Thompson, R.C., Aldridge, D.C. (2015): Microplastic in freshwater system: A review of the emerging threats identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research*, 75: 63-82.
- Frias, J.P.G.L., Nash, R. (2019): Microplastics: Finding a consensus on the definition. *Marine Pollution Bulletin* 138:145-147.
- Galloway, T., Haward, M.G., Mason, S., Babayemi, J.O., Hardesty, B., Krause, S., Lamb, L., Hinojosal, I., Horton, A.D. (2020): Science-Based Solutions to Plastic Pollution. *One Earth* 2(1): 5-7.
- Gao, D., Liu, X., Junaid, M., Liao, H., Chen, G., Wu, Y., Wang, J. (2022): Toxicological impacts of micro (nano) plastic in the benthic environment. *Science of The Total Environment* 836: 155-620.
- Giorgetti, L., Spano, C., Muccifora, S., Bottega, S., Barbeieri, F., Bellani, L., Ruffini-Castiglione, M. (2020): Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149: 170-177.
- Gill, S.S., Tuteja, N. (2010): Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gligić V. (1953): Etimološki botanički rečnik. Sarajevo: „Veselin Masleša“.

- Gunaalan, K., Fabbri, E., Capolupo, M. (2020): The hidden threat of plastic leachates: A critical review on their impacts on aquatic organisms. *Water Research* 184:116170.
- Habig, W. H., Jakoby, W. B. (1981): Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology* 77: 398-405.
- Hartmann, N.B., Hüffer, T., Thompson, R.C., Hassellöv, M., Verschoor, A., Daugaard, A.E., Rist, S., Karlsson, T., Bremholt, N., Cole, M., Herrling, M.P., Hess, M.C., Ivleva, N.P., Lusher, A.L., Wagner, M. (2019): Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environmental Science and Tehnology* 53: 1039-1047.
- 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.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H, (2001): A large family of class III peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42: 462-468.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chi Chang, C. (2007): Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restauration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant physiology and biochemistry* 45(1): 62-69.
- ISO Water Quality - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) - Duckweed Growth Inhibition Test. 2005.
- Kalčíkova, G. (2020): Aquatic vascular plants - A forgotten piece of nature in microplastic research. *Environmental Pollution* 262: 114354.
- Kalčíkova, G., Skalar, T., Marolt, G., Jemec Kokalj, A. (2020): An environmental concentration of aged microplastics with adsorbed silver significantly affects aquatic organisms. *Water Research* 175: 115644.
- Kalčíkova, G., Žgajnar Gotvajn, A., Kladnik, A., Jemec, A. (2017): Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*. *Environmental Pollution* 230: 1108-1115.
- 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 in Enzymology* 186: 464-478.
- Li, Y., Liu, C., Yang., H., He, W., Li, B., Zhu, X., Liu, S., Jia, S., Li, R., Tang, K.H.D. (2024): Leaching of chemicals from microplastics from microplastics: A review of chemical types, leaching mechanisms and influencing factors. *Science od The Total Environment* 906: 167666.
- Mateos-Cárdenas, A., Scott, D.T., Seitmaganbetova, G., van Pelt, F.N.A.M., O'Halloran, J., Jansen, M.A.K. (2019): Polyethylene microplastics adhere to *Lemna minor* (L.), yet have no effects on plant growth or feeding by *Gammarus duebeni* (Lillj.). *Science od The Total Environment* 689: 413-421.

- Matić, M., Vuković, R., Vrandečić, K., Štolfa Čamagajevac, I., Ćosić, J., Vuković, A., Sabljčić, K., Sabo, N., Dvojković, K., Novoselović, D. (2021): Oxidative status and antioxidative response to fusarium attack and different nitrogen levels in wheat varieties. *Plants* 10 (4): 611.
- Meitei, M. D., Majeti, P. (2013): Lead (II) and cadmium (II) biosorption on *Spirodela Polyrhiza* (L.) Schleiden biomass. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3: 200-207.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S. Breusegem, F.V., Noctor, G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61 (15): 4197-4220.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Witek-Krowiak, A. (2013): State of the Art for the Biosorption Process - a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (6): 1389-1416.
- 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 and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Arıkan, B., Alp-Turgut, F.N., Turan, M., Cavusolgu, H., Skalak, H. (2023): Response of individual and combined polystyrene and polymethyl methacrylate nanoplastics on hormonal content, fluorescence/photochemistry of chlorophylls and ROS scavenging capacity in *Lemna minor* under arsenic-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 196: 93-107.
- Pan, T., Chen, X., Kong, C., Gao, D., Liu, W., Liao, H., Junaid, M., Wang, J. (2023): Single and combined toxicity of polystyrene nanoplastics and PCB-52 to the aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Science of The Total Environment* 901: 166482.
- 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., 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.
- 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.
- Rajput, V. ., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. ., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., (2021): Recent developments in enzymatic

antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology (Basel)*, 10 (4): 267.

Rochman, C. M., Brookson, C., Bikker, J., Djuric, N., Earn, A., Bucci, K., Athey, S., Huntington, A., McIlwraith, H., Munno, K., De Frond, H., Kolomijeca, A., Erdle, L., Grbic, J., Bayoumi, M., Borrelle, S. B., Wu, T., Santoro, S., Werbowski, L. M., Zhu, X., Giles, R. K., Hamilton, B. M., Thaysen, C., Kaura, A., Klasios, N., Ead, L., Kim, J., Sherlock, C., Ho, A., Hung, C. (2019): Rethinking microplastics as a diverse contaminant suite. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38: 703-711.

Rozman, U., Kalčíkova, G. (2022): The Response of Duckweed *Lemna minor* to Microplastics and Its Potential Use as a Bioindicator of Microplastic Pollution. *Plants* 11 (21): 2953.

Rozman, U., Jemec Kokalj, A., Dolar, A., Drobne, D., Kalčíkova, G. (2022): Long-term interactions between microplastics and floating macrophyte *Lemna minor*: the potential for fitoremediation of microplastics in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 831: 154866.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. (2012:) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 217037.

Singh, H., Kumar, D., Soni, V. (2022): Performance of chlorophyll *a* fluorescence parameters in *Lemna minor* under heavy metal stress induced by various concentration of copper. *Scientific reports*, 12(1): 101620.

Skorzynska-Polit, E. (2007): Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and changes under heavy metal stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 76 (1): 49-54.

Smirnoff, N., Arnaud, D. (2018): Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 211 (3): 1197-1214.

Song, U., Kim, J., Rim, H. (2023): Assessing phytotoxicity of microplastics on aquatic plants using fluorescent microplastics. *Environmental Science and Pollution Research*, 30: 74186-74195.

Stanton, C., Sanders, D., Krämer, U., Podar, D. (2022): Zinc in plants: Integrating homeostasis and bioformatification. *Molecular Plant* 15(1): 65-85.

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

Tola, A. J., Jaballi, A., Missihoun, T. D. (2021): Protein carbonylation: emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants-Basel* 10 (7): 1451.

Upadhyay, R., Panda, S. K. (2010): Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. *Journal of Hazardous Materials* 175 (1-3): 1081-1084.

- Uruc Parlak, K., Demirezen Yilmaz, D. (2012): Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 85: 52-58.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauch, F. (2002): Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* 49(5): 515-532.
- Wang, W. (1990): Literature Review on Duckweed Toxicity Testing. *Environmental Research* 52, 7-22.
- Wellburn, A. R. (1994): The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology* 144, 307-313.
- Yang, X., Liso, H.M., Tan, A.J., Gan, S.X., Yang, G.L. (2023): Effects of microplastics and cadmium on growth rate, photosynthetic pigment content and antioxidant enzymes of duckweed (*Lemna minor*). *Environmental Science and Pollution Research* 30, 96181-96190.
- Yu, H., Peng, J., Cao, X., Wang, Y., Zhang, Z., Xu, Y. (2021): Effects of microplastics and glyphosate on growth rate, morphological plasticity, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic species *Salvinia cucullata*. *Environmental Pollution*, 279: 116900.
- Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2008): Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling* 10: 1527-1547.
- Zežulka, Š., Kummerová, M., Babula, P., Váňová, L. (2013): *Lemna minor* exposed to fluoranthene: Growth, biochemical, physiological and histochemical changes. *Aquatic Toxicology* 140-141: 37-47.
- Zhou, C.Q., Lu, C.H., Mai, L., Bao, L.J., Liu, L.Y., Zeng, E.Y. (2021): Response of rice (*Oryza sativa* L.) roots to nanoplastic treatment at seeding stage. *Journal of Hazardous Materials*, 401: 123412.
- Zuo, C., Li, Y., Chen, Y., Jiang, J., Qiu, W., Chen, Q. (2023): Leaching of heavy metals from polyester microplastic fiber and the potential risks in simulated real-world scenarios. *Journal of Hazardous Materials* 461: 132639.

Životopis

Rođena sam 28. lipnja 1994. u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Ljudevita Gaja u Zaprešiću i Žensku opću gimnaziju Družbe sestara milosrdnica s pravom javnosti u Zagrebu. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala sam 2017. godine Preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku preddiplomskog studija, 2021. godine, upisala sam Diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija dvaput sam sudjelovala na manifestaciji i realizaciji projekta Noć biologije (2018. i 2022.) te dvaput na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja u Zagrebu (2022. i 2023.) kao poster izlagač i oralni izlagač. Kao poster izlagač sudjelovala sam 2022. godine u Sloveniji na međunarodnoj konferenciji „Plants in changing environment“ i 2023. godine u Koprivnici na međunarodnoj konferenciji „Second International Conference – Food & Climate Change“. Dobitnica sam Rektorove nagrade za 2021./2022. godinu, u kategoriji „Nagrada za individualni znanstveni i umjetnički rad (jedan ili dva autora)“ za rad: Utjecaj temperaturnog stresa na koncentraciju bioaktivnih spojeva i biološke učinke ekstrakata mladih biljaka brokule (*Brassica oleracea* L. *botrytis* (L.) Alef. *cymosa* Duch.). Isti rad je objavljen u časopisu *Plants*. DOI: [10.3390/plants12051135](https://doi.org/10.3390/plants12051135) - Šola I, Davosir D, Kokić E, Zekirovski J. Effect of Hot- and Cold-Water Treatment on Broccoli Bioactive Compounds, Oxidative Stress Parameters and Biological Effects of Their Extracts. *Plants*. 2023; 12(5):1135. <https://doi.org/10.3390/plants12051135>.