

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Iva Kokotović

Procjena toksičnosti vode rijeke Save upotrebom
običnog luka (*Allium cepa* L.) kao modelnog organizma

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

PROCJENA TOKSIČNOSTI VODE RIJEKE SAVE UPOTREBOM OBIČNOG LUKA (*Allium cepa* L.) KAO MODELNOG ORGANIZMA

Iva Kokotović

Rooseveltova trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

Povećana urbanizacija i otpuštanje otpadnih voda u rijeke dovodi do sve većeg broja organskih zagađivača u vodenim ekosustavima i potrebe za pročišćavanjem otpadnih voda. Kvaliteta vode rijeke Save, uzorkovane na četiri lokacije (Lukavec, Rugvica, Jesenice i Hrušćica), u ovom je radu procijenjena pomoću Allium-testa i biokemijskih parametara - sadržaja proteina, karbonila i malondialdehida te aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i glutation-S-transferaze). Kao modelni organizam korišten je obični luk (*Allium cepa* L.), koji je pogodan za istraživanje cito- i genotoksičnosti zbog malog broja dugačkih kromosoma ($2n = 16$). Uzorci vode rijeke Save nisu inhibirali rast korjenčića luka, no pokazali su se genotoksičnim, a uzorak s lokacije Jesenice i citotoksičnim. Rezultati aktivnosti antioksidacijskih enzima i karbonilacije proteina pokazuju da su svi uzorci vode rijeke Save izazvali oksidacijski stres u korjenčićima luka i posljedično uzrokovali oštećenja na proteinima. Zbog jednostavnog načina čuvanja i rukovanja te osjetljivosti, obični luk je pogodan modelni organizam za biomonitoring površinskih voda.

(38 stranica, 11 slika, 3 tablice, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Allium cepa* L., Allium-test, oksidativni stres, antioksidacijski enzimi, organski zagađivači

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

Ocjenitelji: izv.prof.dr.sc. Sandra Radić Brkanac
izv.prof.dr.sc. Ines Radanović
prof.dr.sc. Iva Juranović Cindrić

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

TOXICITY ASSESSMENT OF SAVA RIVER USING ONION (*Allium cepa* L.) AS A MODEL ORGANISM

Iva Kokotović

Rooseveltovo trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

Increased urbanization and disposal of wastewater into rivers leads to ever-growing number of organic contaminants in aquatic ecosystems and the need for wastewater treatment. In the present study, the quality of Sava River collected at four locations (Lukavec, Rugvica, Jesenice i Hrušćica) has been evaluated using Allium-test and certain biochemical parameters – contents of proteins, malondialdehyde and carbonyls as well as activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase). Onion (*Allium cepa* L.) is often used as a model organism in cyto- and genotoxic studies because it has a small number of relatively large chromosomes ($2n = 16$). Samples of Sava River did not cause growth inhibition of onion roots, but they were genotoxic and the sample Jesenice was cytotoxic as well. The results of antioxidative enzyme activities and protein carbonilation showed that all samples of Sava River cause oxidative stress in onion roots and consequently damage to proteins. Due to the simplicity and low cost of the procedure as well as its sensitivity, onion is a suitable model organism for biomonitoring of surface waters.

(38 pages, 11 figures, 3 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Allium cepa* L., Allium-test, oxidative stress, antioxidant enzymes, organic pollutants

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

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

Dr. Ines Radanović, Assoc. Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

Thesis accepted:

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Testni organizam <i>Allium cepa</i> L.	1
1.2. Allium-test	2
1.3. Biokemijski pokazatelji stresa.....	3
1.4. Oksidativni stres	4
1.5. Antioksidacijski sustav	4
1.5.1. Superoksid dismutaza.....	4
1.5.2. Askorbat peroksidaza	5
1.5.3. Katalaza	5
1.5.4. Glutation-S-transferaza	5
1.6. Lipidna peroksidacija	5
1.7. Karbonili.....	6
1.8. Organski zagađivači	6
1.8.1 Organski zagađivači u uzorcima vode rijeke Save	8
1.9. Cilj istraživanja.....	12
2. Materijali i metode	13
2.1 Područje uzorkovanja rijeke Save.....	13
2.2. Allium-test – inhibicija rasta korjenčića,	13
mitotski indeks i kromosomske nepravilnosti.....	13
2.3. Ekstrakcija topivih proteina i određivanje aktivnosti enzima	14
2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	16
2.5. Određivanje sadržaja karbonila.....	16
2.6. Statistička obrada podataka	17
3. Rezultati	18
3.1. Allium test – inhibicija rasta korjenčića.....	18
3.2. Allium test – mitotski indeks i kromosomske nepravilnosti.....	19
3.3. Sadržaj topivih proteina i aktivnost enzima	22
3.4. Sadržaj malondialdehida	26
3.5. Sadržaj karbonila	27
3.6. Pearsonov koeficijent korelacije	28
4. Rasprava	29
5. Zaključak	34
6. Literatura	35

Popis kratica

APOD – askorbat peroksidaza

CNDB – 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

DNPH – dinitrofenilhidrazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

GST – glutation-S-trasferaza

HALMED – Agencije za lijekove i medicinske proizvode

KAT – katalaza

MDA – malondialdehid

ROS – reaktivni oblici kisika

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbiturna kiselina

su.tv. – suhe tvari

1. Uvod

Suvremeno čovječanstvo izloženo je neprekidnim i trajnim opasnostima od onečišćenja okoliša. Čitav je niz toksičnih tvari koje nas okružuju u svakodnevnom životu: lijekovi, dodaci prehrani i industrijske kemikalije, prirodni toksini, otrovi u kućanstvima i dr. Ulaskom onečišćivača u vodu drastično se smanjuje sposobnost funkcioniranja vodenog ekosustava, stanje okoliša se narušava smanjenom produktivnošću biomase i gubitkom biološke raznolikosti. Mnoge tvari koje onečišćuju vodu imaju dugoročne negativne učinke na kvalitetu vode, što predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Iako se kemijskim analitičkim metodama može vrlo uspješno odrediti prisutnost i koncentracija kemijskih tvari u okolišu, rezultati dobiveni na taj način ne iskazuju niti omogućavaju procjenu o potencijalnom učinku tih tvari, kako na niže (organizmi), tako ni na više segmente ekološkog sustava (biocenoze, populacije). Tradicionalno fizikalno-kemijsko istraživanje onečišćenja i monitoring imaju niz nedostataka, a to su: učinci koji su ispod granice analitičkog određivanja toksičnih tvari (pa se ne mogu identificirati) i potencijalne kemijske interakcije s aditivnim, sinergističkim ili antagonističkim učincima koji se također ne mogu kemijski identificirati (Stipaničev, 2011). Upotrebom biotestova, posebice povezanih s kemijskom analizom, mogu se ukloniti navedena ograničenja. U ovom radu procijenjena je kvaliteta vode rijeke Save pri čemu je kao testni organizam korišten luk (*Allium cepa* L.)

1.1. Testni organizam *Allium cepa* L.

Allium cepa L. je zeljasta trajnica iz porodice Alliaceae. Podzemni organ je karakteristična lukovica, a gotovo svi dijelovi biljke se mogu koristiti za hranu. Lukovica, koja u cijelosti obuhvaća stabljiku, nastaje od odebljelih rukavaca baza odumrlih pravih listova (Nikolić, 2013). Obični luk je jedna od najstarijih biljnih vrsta kultiviranih širom svijeta. Poznat je po svojim ljekovitim svojstvima, kao začim za hranu ili sirovina za daljnju preradu (Fredotović i sur., 2017; Nikolić, 2013). Fitokemikalije su prirodne komponente u običnom luku koja mu daju brojna pozitivna svojstva kao što su: antiupalno, antimikrobno i antialergijsko (Parrek i sur., 2018). U svojoj lukovici sadrži spojeve poput propilensulfonske kiseline, aliina, metilaliina, propilaliina, cikloaleina, sumpornih spojeva, ali i flavonoide, bjelančevine, difenilamin i eterična ulja. Tiopropanol-S-oksid, koji nastaje razgradnjom propilaliina, izaziva suženje očiju prilikom rezanja luka (Nikolić, 2013). Obični luk je pogodan modelni organizam zbog jednostavnog

načina čuvanja i rukovanja. Vršne meristemske stanice korjenčića luka su prikladan sustav za promatranje makroskopskih parametara poput rasta i mikroskopskih parametara kao što su mitotičke i kromosomske nepravilnosti (Fiskesjö, 1988).

1.2. Allium-test

Allium test je dobro poznat i jednostavan biotest pogodan za izvedbu u laboratorijima u kojima se rutinski testira učinak različitih otopina, a njime se može odrediti ukupna toksičnost, citotoksičnost i genotoksičnost. Ukupna toksičnost se izražava inhibicijom rasta korjenčića na lukovici biljaka iz roda *Allium*. Genotoksični učinak se očituje smanjenjem broja stanica u mitozu u vršku korjenčića te pojavom kromosomskih i mitotičkih nepravilnosti. Među raznim vrstama iz roda *Allium*, *Allium cepa* L. (obični luk) se pokazao kao najkorisniji modelni organizam. Korištenje običnog luka kao testni sustav je uveo Levan (1938), kada su se istraživali utjecaji kolhicina. Od tada je Allium test često korišten biotest (Fiskesjö, 1985). Allium test ima mnoge prednosti kao što su: niska cijena, jednostavna izvedba, raspoloživost velikog broja stanica na jednom mikroskopskom preparatu što doprinosi pouzdanosti dobivenih rezultata te visoka podudarnost rezultata s rezultatima dobivenim u nekim drugim testnim sustavima (Leme i Marin-Morales, 2009; Radić i sur., 2014). Uzorke koje se želi testirati nije potrebno sterilizirati niti podvrgnuti prethodnoj obradi. Biljke iz roda *Allium* imaju malobrojne i relativno velike kromosome pogodne za proučavanje različitih kromosomskih aberacija. Kromosomski komplement vrste *Allium cepa* sastoji se od osam parova homolognih kromosoma ($2n = 2x = 16$). Stanični ciklus u meristemskom dijelu korjenčića luka traje oko 20 sati pri 20°C, od čega na sam proces diobe otpada 2-4 sata (Fiskesjö, 1985).

Najznačajniji makroskopski parametar je dužina korijena, ali također i redukcija rasta zelenih listova te oblik i boja korijena (Fiskesjö, 1985). Manja prosječna dužina korjenčića na lukovici u odnosu na kontrolnu seriju lukovica odraz je sveukupnog toksičnog učinka testirane otopine. Promjena boje korijena može biti uzrokovana bojom testirane kemikalije, ali žućenje korijena može značiti smrt stanica uslijed toksičnog djelovanja. Od promjena oblika korijena najčešće su pojava c-tumora i kuka na njegovom vršku.

Što se tiče mikroskopskih parametara, smanjeni mitotski indeks ukazuje na zaostajanje stanice u pojedinoj fazi staničnog ciklusa. Kromosomske nepravilnosti su posljedica oštećenja molekule DNA inducirane fizikalnim ili kemijskim čimbenicima i potpunog izostanka ili

neučinkovitog popravka molekule DNA. Kromosomske nepravilnosti su vidljive u metafazi i anafazi mitoze a nastaju u jednoj od faza interfaze kada kromosomi nisu u kontrahiranom stanju već se nalaze u obliku dugačkih i tankih niti (Fiskesjö, 1985; 1988). Postoje i tvari koje ne djeluju izravno na genetički materijal, ali narušavaju strukturu diobenog vretena. Posljedica njihovog djelovanja su tzv. genomske mutacije koje dovode do pojave aneuploidije ili poliploidije. U aneuploidnim stanicama nedostaje pojedini kromosom ili se pojavljuje višak kromosoma. Poliploidne stanice nastaju multipliciranjem čitavog genoma. Od mitotskih i kromosomskih nepravilnosti u ovom su istraživanju praćene one koje dovode do promjena u strukturi kromosoma (lomovi), kromatina (anafazni mostovi i sljepljivanje) i funkcije diobenog vretena (c-mitoza, zaostali kromosomi, multipolarno vreteno). Kromosomske lomove uzrokuju vrlo toksične tvari, a najčešće se primjećuju u anafazi mitoze. Kromosomski lomovi mogu uzrokovati pojavu fragmenata i anafazne mostove što je kasnije povezano s translokacijom ili ljepljivim krajevima kromosoma. Kod c-mitoze vreteno je potpuno neaktivno i ne može se oformiti ekvatorijalna ravnina te je dioba centromere odgođena pa se kromosomi zadržavaju u metafazi. Za vrijeme c-mitoze kromosomi su više kontrahirani što pospješuje njihovo širenje. Ukoliko se c-mitoza nastavi, doći će do udvostručavanja kromosoma, a ako se prekine, telofazni kromosomi će se skupiti u grupe s varijabilnim brojem kromosoma u svakoj grupi. Ovakav tijek događaja će uzrokovati stvaranje stanice s više jezgara ako se ne oformi stanični zid ili će dovesti do stvaranja stanica čiji broj kromosoma odstupa od normalnog odnosno do aneuploidije. Dakle, ova oba tipa genotoksičnosti, kromosomski lomovi i c-mitoza, biti će zabilježeni kada su prisutne toksične tvari u okolišu. Sljepljivanje kromosoma se javlja kao posljedica toksičnosti i uzrokuje smrt stanice (Fiskesjö, 1985).

1.3. Biokemijski pokazatelji stresa

Pored klasičnog Allium-testa, u ovom su istraživanju za procjenu toksičnosti vode rijeke Save korišteni i dodatni biokemijski pokazatelji mjereni u stanicama korijena luka - aktivnost antioksidacijskih enzima te sadržaj malondialdehida (pokazatelj lipidne peroksidacije) i karbonila (pokazatelj oksidacijskog oštećenja proteina). Obzirom da brojne toksične tvari prisutne u površinskim vodama mogu dovesti do oksidacijskog stresa u biljnim stanicama, u slijedećem su poglavlju pobliže opisani oksidativni stres i antioksidacijski sustav.

1.4. Oksidativni stres

Biljke rastu u dinamičnom okruženju i stalno se suočavaju sa stresnim uvjetima, pa tako i oksidativnim stresom (Schmidt i sur., 2018). Oksidativni stres može dovesti do brojnih oštećenja stanice ili njihove smrti i uvenuća biljke (Baek i Skinner, 2012). Oksidativni stres nastupa kada je proizvodnja slobodnih radikala nadjačala antioksidacijski sustav (Perrone i sur., 2012). Slobodni radikali, koji se mogu definirati kao bilo koja kemijska vrsta koja može samostalno opstati, su zbog svojih nesparenih elektrona nestabilni i jako reaktivni te stoga stupaju u kemijske reakcije (Lobo i sur., 2010). Bez obzira što biljke bez kisika ne bi mogle preživjeti, postoji i „negativna“ strana aerobnog načina života, a to su reaktivni oblici kisika (ROS). U ROS ubrajamo slobodne radikale, poput superoksidnog ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksilnog ($\cdot OH$) radikala, te neradikalne molekule, poput vodikovog peroksida (H_2O_2), koje mogu uzrokovati oštećenja (Davies, 1995). Oni mogu nastati u različitim dijelovima stanice; kloroplastima, mitohondrijima, peroksisomima i izvanstaničnoj strani plazmatske membrane, kao produkti različitih metaboličkih puteva (Bailey-Serres i Mittler, 2006). Različiti biotički i abiotički čimbenici stresa potiču povećanu proizvodnju ROS (Arora, 2002). Ako ne dođe do adekvatne reakcije antioksidacijskog sustava i enzima dolazi do oštećenja proteina, lipida, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina kao rezultata kaskadnih reakcija koje je pokrenuo ROS (Baek i Skinner, 2012).

1.5. Antioksidacijski sustav

Biljke su razvile učinkovit i kompleksan antioksidacijski sustav kako bi uklonile ROS, zaštitile se od oksidativnog stresa i izbjegle oštećenja makromolekula. Antioksidansi se mogu podijeliti u tri grupe: 1) antioksidacijski enzimi poput superoksid dismutaze (SOD), glutation S-transferaze (GST), katalaza (KAT), askorbat peroksidaze (APOD), glutation peroksidaze i dr.; 2) antioksidansi topivi u vodi, poput askorbata i glutationa; 3) antioksidansi topivi u lipidima, poput tokoferola i karotenoida. Antioksidacijski enzimi su najaktivniji i najefikasniji u zaštiti od oksidativnog stresa (Baek i Skinner, 2012).

1.5.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza je metaloenzim koji katalizira redukciju dva superoksidna radikala u molekulu kisika i vodikovog peroksida. SOD predstavlja prvu crtu obrane od ROS u stanici. Postoje tri različita oblika superoksid dismutaze klasificiranih na temelju metalnog kofaktora:

bakar/ cink (Cu-Zn SOD), mangan (Mn SOD), i željezo (Fe SOD). Izomeri SOD se mogu naći u većini odjeljaka u stanici. Cu-Zn SOD su locirane u kloroplastu, citosolu i izvanstaničnom prostoru, Mn SOD u mitohondriju i peroksisomu, a Fe SOD u kloroplastima (Arora i sur., 2002; Alscher i sur., 2002).

1.5.2. Askorbat peroksidaza

Askorbat peroksidaza spada u skupinu hem-peroksidaza, koje se mogu naći u višim biljkama te zelenim i crvenim algama. APOD katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu, pomoću askorbata koji služi kao elektron donor. Da bi se reducirala jedna molekula H_2O_2 potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (Caverzan i sur., 2012). Aktivnost askorbat peroksidaze je zabilježena u citosolu i kloroplastima (Arora i sur., 2002)

1.5.3. Katalaza

Katalaza (KAT) je prvi otkriveni i opisani antioksidacijski enzim. Prisutna je u stanicama svih eukariota. Katalaza je hem-sadržavajući enzim koji dismutira dvije molekule vodikovog peroksida u dvije molekule vode i jednu molekulu kisika (Mhamdi i sur., 2010). Važna je za uklanjanje vodikovog peroksida nastalog u peroksisomima/glioksisomima. Katalaza ima veliku katalitičku aktivnost, ali slabu supstratnu specifičnost i afinitet za H_2O_2 , jer treba dvije molekule H_2O_2 u aktivnom mjestu (Willekens i sur. 1997).

1.5.4. Glutation-S-transferaza

Glutation-S-transferaza je enzim građen od dvije podjedinice, a lokaliziran u citosolu. Svaka podjedinica ima aktivno mjesto, na aktivno mjesto jedne podjedinice se veže glutacion, a na aktivno mjesto druge podjedinice elektrofilni i hidrofobni ligand. GST spaja glutacion s ROS i na taj način štiti stanicu od oksidativnog stresa. GST je enzim II. faze uključen u detoksikaciju ksenobiotika; elektrofile ksenobiotike i njihove metabolite čini topivim u vodi. Konjugat ksenobiotika i glutaciona se iz citosola prenosi u vakuolu na daljnju preradu (Edwards i sur., 2000; Kumar i Trivedi, 2018).

1.6. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija, jedan od pokazatelja oksidacijskog stresa u biljkama, je reakcija ROS s lipidima, najčešće nezasićenim masnim kiselinama poput linolne i arahidonske kiseline (Nam,

2011). Proces se sastoji od tri koraka: inicijacija, propagacija i završetak. U procesu inicijacije ROS napada lipide i oduzima im vodik te ga ostavlja kao lipidni radikal ($L\bullet$). Lipidni radikal potom reagira s kisikom i stvara peroksil radikal ($LOO\bullet$) koji oduzima vodik susjednoj molekuli lipida čineći novi lipidni radikal, a sam postaje lipidni hidroperoksid (LOOH). Do završetka procesa dolazi samo ako neki antioksidans kao npr. tokoferol ili manitol donira vodik lipidnom peroksil radikalu i zaustavlja proces otimanja vodika susjednom lipidu (Ayala i sur., 2014). Lipidna peroksidacija se razlikuje od ostalih oštećenja stanica i tkiva uzrokovanih ROS jer je samoodrživa (Nam, 2011). Lipidnom peroksidacijom mogu nastati brojni sekundarni produkti; aldehidi, ketoni, ugljikohidrati, epoksidi i aktivni radikali (Štefan i sur., 2007). Malondialdehid (MDA), jedan od završnih produkata procesa lipidne peroksidacije, je pouzdan marker oksidativnog stresa u biljkama (Ayala i sur., 2014).

1.7. Karbonili

ROS može uzrokovati brojne promjene u strukturi proteina. Promjene u strukturi proteina dovode do gubljenja enzimskih funkcija proteina, što dovodi do poremećaja staničnih funkcija. Zbog svoje ireverzibilne prirode karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina (Nyström, 2005). Karbonilne grupe nastaju oksidacijom izloženih bočnih lanaca hidrofilnih aminokiselina prolina, arginina, lizina i treonina, često kataliziranom metalima, što ih čini hidrofobnijim i time sklonim agregaciji radi isključenja vode. Upotreba karbonilnih skupina proteina kao biomarkera oksidativnog stresa ima brojne prednosti u odnosu na ostale metode zbog svog, relativno brzog, nastajanja i stabilnosti karboniliranih proteina. Većina testova za detekciju karbonilnih grupa proteina uključuje derivatizaciju karbonilne grupe s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), koji vodi do formiranja stabilnog dinitrofenil (DNP) hidrazona, koji se može detektirati različitim metodama, a u ovom radu je korišteno spektrofotometrijsko mjerenje. Mjerenje sadržaja karbonila koji se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH je najkorištenija metoda određivanja oksidacije proteina (Dalle-Donne i sur., 2003).

1.8. Organski zagađivači

Povećana urbanizacija i otpuštanje otpadnih voda u površinske vode dovelo je do povećanja organskih molekula u vodenom ekosustavu (Pal i sur., 2010). Različite sintetičke organske molekule se koriste, u velikim količinama, za brojne namjene koje uključuju: proizvodnju i čuvanje hrane, industrijsku proizvodnju i zdravstvenu njegu životinja i ljudi. Posebnu

zabrinutost izazivaju EOC (Emerging Organic Contaminants). Ovaj izraz se koristi ne samo za novo sintetizirane organske molekule već i za njihove derivate, novo otkrivene spojeve u okolišu, koji su otkriveni zahvaljujući različitim analitičkim metodama, i spojeve koji su nedavno klasificirani kao zagađivači. EOC uključuju različite spojeve poput: farmaceutika, proizvoda za osobnu njegu, pesticida, veterinarskih produkata, industrijskih spojeva i nusprodukata proizvodnje, dodataka prehrani i projektiranih nanomaterijala (Lapworth i sur., 2012). Zadnjih nekoliko godina se pridaje posebna pažnja EOC zbog njihovog velikog ulaska u ekosustav i slabih saznanja o njihovom utjecaju na ljudsko zdravlje i okoliš (Babić i sur., 2018).

Izvori ulaska organskih zagađivača mogu se podijeliti na točkaste i difuzne. Primjeri točkastog izvora su bolnice, industrijska postrojenja, postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i zakopane septičke jame. Točkasti izvori otpuštaju veliku količinu otpada na jednom mjestu što omogućuje da se lakše detektiraju od difuznih izvora. Difuzni izvori, poput kućanstava, ne ispuštaju velike količine otpada u okoliš jer su raspršeni na većem prostoru (Babić i sur., 2018; Lapworth i sur., 2012).

1.8.1 Organski zagađivači u uzorcima vode rijeke Save

Kemijskom analizom provedenom u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda utvrđeni su organski zagađivači prisutni u uzorcima vode koji su korišteni za istraživanje. Organski zagađivači u uzorcima testnih voda su određeni pomoću tekućinskog kromatografa UHPLC-QTOF-MS (engl. liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry).

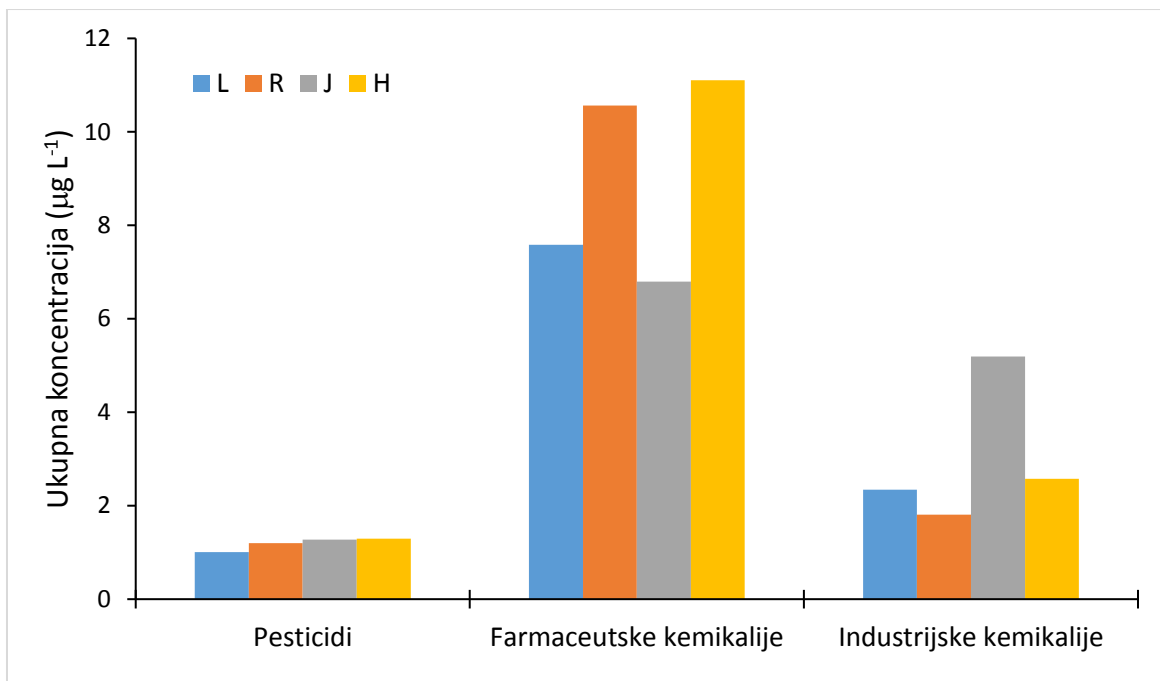
Organski zagađivači su podijeljeni u tri skupine: pesticidi, farmaceutske kemikalije i industrijske kemikalije. Pesticidi su podijeljeni na tri podskupine: herbicidi, fungicidi i insekticidi. Farmaceutske kemikalije su podijeljene na devet podskupina: antibiotici, analgetici, hipnotici/antikonvulzanti/anestetici, halucinogeni/stimulansi/nedopuštene droge, antidepresivi, opioidi, antiepileptici/neuroleptici, kardiovaskularni lijekovi i steroidni hormoni. Od 566 mjerenih, detektirano je prosječno 388 organskih zagađivača u uzorcima rijeke Save s različitih lokacija (Tablica 1).

Tablica 1. Broj detektiranih organskih zagađivača u uzorcima vode rijeke Save

	Lukavec	Rugvica	Jesenice	Hrušćica
Pesticidi	177 62h; 46f; 69i	183 63h; 51f; 69i	210 73h; 57f; 80i	181 67h; 48f; 66i
Farmaceutske kemikalije	175 56a;15an;20h/a/a 19h/s/n;11ad;15o 15a/n; 9k; 15sh	174 50a;15an;20h/a/a 23h/s/n;14ad;16o 14a/n; 7k; 15sh	156 57a;14an;15h/a/a 18h/s/n;10ad;9o 12a/n; 6k; 15sh	179 56a;14an;22h/a/a 24h/s/n;12ad;15o 15a/n; 8k; 13sh
Industrijske kemikalije	29	29	30	30
UKUPNO	381	386	396	390

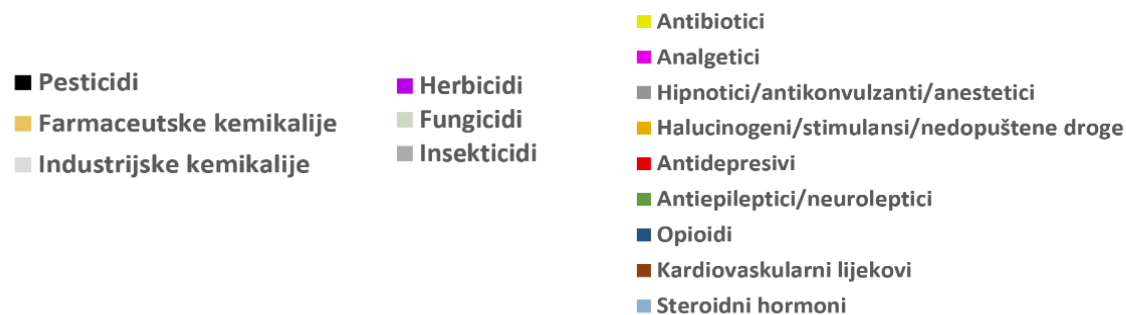
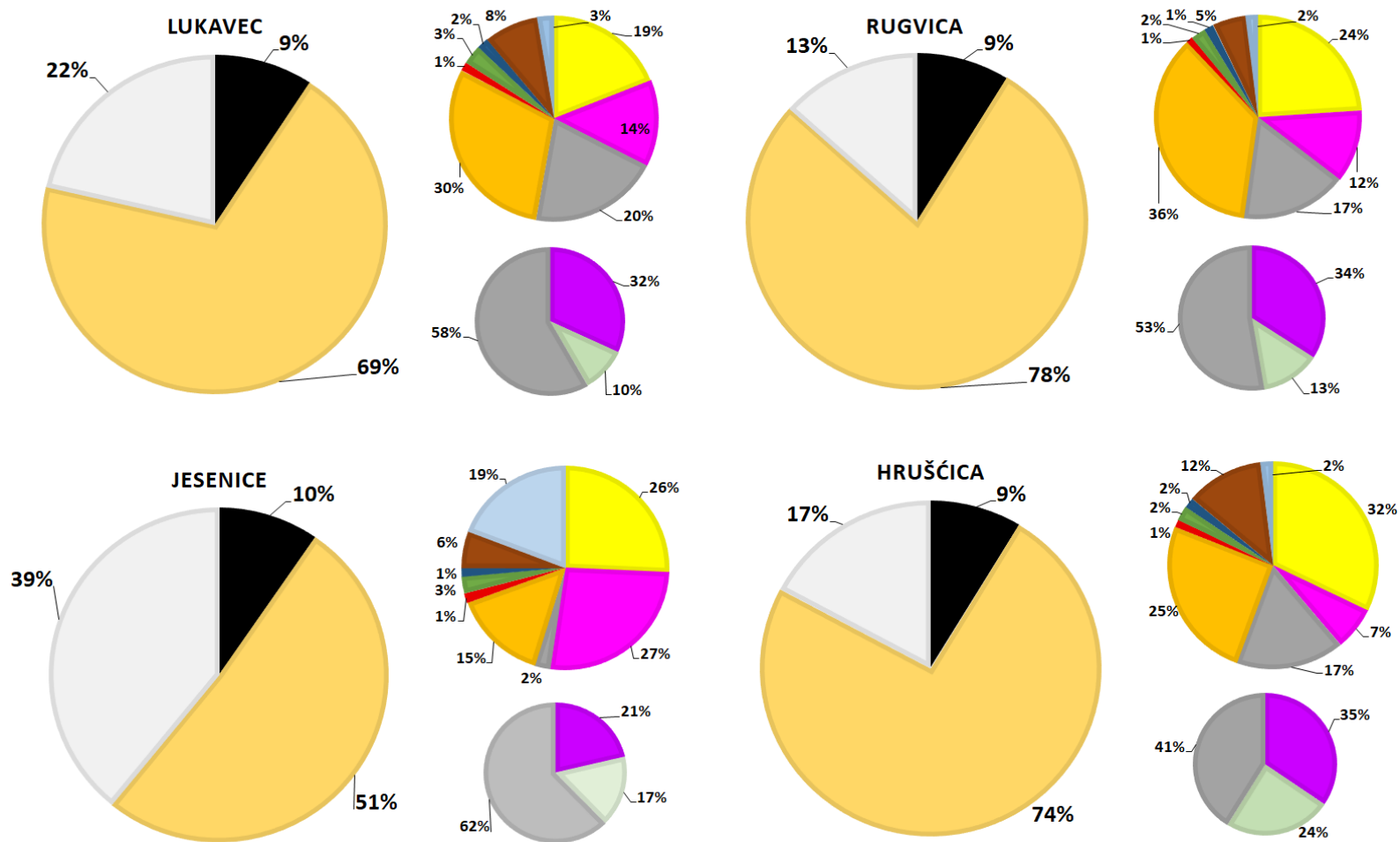
h-herbicidi; f-fungicidi; i-insekticidi; a-antibiotici; an-analgetici; h/a/a- hipnotici/antikonvulzanti/anestetici; h/s/n- halucinogeni/stimulansi/nedopuštene droge; ad-antidepresivi; o-opioidi; an-antiepileptici/neuroleptici; k-kardiovaskularni lijekovi; sh-steroidni hormoni

Slika 1 prikazuje ukupnu koncentraciju glavnih klasa organskih zagađivača u uzorcima rijeke Save. Najveću ukupnu koncentraciju u svim uzorcima imaju farmaceutske kemikalije zatim industrijske kemikalije te pesticidi. Koncentracija pesticida je podjednaka u svim uzorcima. Koncentracija farmaceutskih kemikalija je najveća u uzorku vode s lokacije Hrušćica, a najmanja u uzorcima vode s lokacije Jesenice. Najveća ukupna koncentracija industrijskih kemikalija zabilježena je u uzorku s lokacije Jesenice, a najmanja u uzorku s lokacije Rugvica.



Slika 1. Ukupna koncentracija glavnih klasa organskih zagađivača u uzorcima rijeke Save s lokacija Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H).

Slika 2 prikazuje distribuciju glavnih klasa i podklasa organskih zagađivača u uzorcima vode rijeke Save na temelju njihove ukupne koncentracije. Najvećim postotkom u svim uzorcima su zastupljene farmaceutske kemikalije. U uzorku s lokacije Lukavec od farmaceutskih kemikalija najviše su zastupljeni h/s/n sa 30%, h/a/a sa 20% i antibiotici s 19%. U uzorku s lokacije Rugvica sa 36% su zastupljeni h/s/n, sa 17% h/a/a te antibiotici s 24%. U uzorku s lokacije Jesenice u podjednakoj mjeri su zastupljeni antibiotici (26%) i analgetici (27%), a u nešto manjoj mjeri steroidni hormoni (19%). Sa 32% su antibiotici najzastupljenije farmaceutske kemikalije u uzorku s lokacije Hruščica, a slijede ih h/s/n sa 25% i h/a/a sa 17%. U svim uzorcima u rasponu od 1% do 3% su zastupljeni opiodi, antiepileptici i neuroleptici te antidepresivi. U svim uzorcima osim u uzorku s lokacije Jesenice su steroidni hormoni zastupljeni sa 2% ili 3%. U uzorku Jesenice su sa samo 2% zastupljeni h/a/a dok je u drugim uzorcima taj postotak znatno veći (17-20%). Kardiovaskularni lijekovi su zastupljeni u uzorcima od 5% do 12%. Pesticidi su u svim uzorcima zastupljeni u najmanjem postotku (9-10%). U najvećoj mjeri su od pesticida zastupljeni insekticidi (62-41%), zatim herbicidi (35-21%) te fungicidi (24-10%). Industrijske kemikalije su u najvećem postotku prisutne u uzorku s lokacije Jesenice (39%), a u najmanjem u uzorku s lokacije Rugvica (13%).



Slika 2. Distribucija (%) glavnih klasa i podklasa organskih zagađivača u uzorcima vode rijeke Save na temelju njihove ukupne koncentracije.

1.9. Cilj istraživanja

Cilj predloženog rada je procjena toksičnosti i genotoksičnosti rijeke Save pomoću Allium-testa i biokemijskih pokazatelja toksičnosti – sadržaja malondialdehida i karbonila te aktivnosti enzima (superoksid dismutaza, katalaza, glutation-S-transferaza i askorbat peroksidaza).

2. Materijali i metode

2.1 Područje uzorkovanja rijeke Save

Uzorci vode sakupljeni su od strane djelatnika Hrvatskih voda na rijeci Savi 14. svibnja 2018. godine na četiri lokacije: Jesenice (J – Jesenice 45°50'43.8"N 15°42'33.8"E), Hrušćica (H – Hrušćica 45°46'50.3"N 16°08'16.5"E), Rugvica (R – Rugvica 45°43'32.1"N 16°12'36.3"E) i Lukavec (L – Lukavec Posavski 45°24'33.6"N 16°31'08.8"E). Uzorci su sakupljeni za vrijeme prosječnog vodostaja rijeke Save, a lokacije su odabrane prema dostupnim podacima o stupnju onečišćenja rijeke Save (Babić i sur., 2018). Lokacija Jesenice je otprilike 13 km uzvodno od Zagreba i predstavlja slabo do umjereno onečišćenu lokaciju. Lokacija Hrušćice je smještena oko 100 m nizvodno od glavnog kanala Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu, a lokacija Rugvica je smještena otprilike 10 km nizvodno od ispusta postrojenja za obradu otpadnih voda i stoga prima komunalne i industrijske otpadne vode iz Zagreba. Lokacija Lukavec je otprilike 10 km nizvodno od grada Siska, i prima vode nastale proizvodnjom pesticida, iz željezare, rafinerije nafte i komunalne vode grada Siska (Babić i sur., 2018)

2.2. Allium-test – inhibicija rasta korjenčića, mitotski indeks i kromosomske nepravilnosti

Allium-test je jednostavni biotest pogodan za izvedbu u laboratorijima u kojima se rutinski testira učinak različitih otopina. Inhibicija rasta korjenčića luka kao i promjene u morfologiji samih korjenčića korišteni su kao pokazatelji ukupne toksičnosti uzoraka površinskih voda. Lukovice su stavljene na vrh bočica te bazom uronjene u odstajalu vodovodnu vodu dok korjenčići nisu postigli duljinu od cca 2 cm. Nakon toga su premještene na uzorke testnih voda (realni uzorci). Nakon 24 h izlaganja testnim vodama, običnoj destiliranoj vodi (kontrola) ili 5 mM otopini etilmetansulfonata (EMS, pozitivna kontrola), korjenčići su fiksirani u mješavini 96% etanola i ledene octene kiseline u omjeru 3:1 (30 min do 24h). Fiksiranjem se zaustavlja dioba stanica. Prije same analize korjenčići su prvo omekšani zagrijavanjem u 1M HCl te zatim obojeni 1%-tnom otopinom aceto-karmina. Pri izradi preparata, otkinuti vršni dio korjenčića (intezivno obojana zona primarnog meristema) stavljen je na predmetno stakalce u kap aceto-karmina te maceriran staklenim štapićem. Macerirani korjenčići prekriveni su pokrovnicom i laganim pritiskom zgnječeni ("squash") (Sharma i Sharma, 1972). Predmetna i pokrovna stakalca prethodno su očišćena u etanolu.

Mikroskopiranje i fotografiranje je obavljeno svjetlosnim mikroskopom "Standard 20 Zeiss". Za analizu mitotske aktivnosti pregledano je najmanje 3000 stanica (1000 stanica u svakoj od 3 replike) po svakom uzorku testnih voda, a za analizu kromosomskih aberacija najmanje 100 diobenih stanica vrškova korjenčića luka po uzorku (kontrola, EMS, uzorci voda). Mitotski indeks je izračunat kao omjer broja stanica u diobi i ukupnog broja stanica uzorka i izrazila u postocima. Tipovi mitotičkih i kromosomskih nepravilnosti uključuju: lomove, anafazne mostove i sljepljivanje, c-mitozu, zaostale kromosome i anafaze s multipolarnim vretenom. Inhibicija rasta korjenčića luka praćena je nakon 72 h rasta na testnim vodama. Duljina korjenčića (3 lukovice za pojedini uzorak vode) izmjerena je u mm.

2.3. Ekstrakcija topivih proteina i određivanje aktivnosti enzima

Uzorci korjenčića luka za mjerene biokemijske parametre uzimani su nakon 72 h rasta na testnim vodama. Uzorci liofilizacijom osušenog biljnog materijala (20 mg) homogenizirani su u mlinu (IST 400) 1 min na 30 000 Hz, zatim je dodan 1 mL kalij fosfatnog pufera (50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH vrijednosti 7,0 s dodatkom 0,5 mM EDTA) te homogenirano još 1 min na 30 000 Hz. Zatim je dodan još 1 mL kalij fosfatnog pufera te netopivi polivinilpolipirolidon (PVPP). Tako pripremljen homogenat je centrifugiran u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 °C 30 minuta na 30 000 × g. Dobiveni supernatant iskorišten je za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda (1976), za određivanje aktivnosti enzima te za određivanje sadržaja malondialdehida i karbonila.

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

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitisa i Riesa (1977). Reakcijska otopina je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 μM kloridne soli nitrotetrazolijevog plavila, 0,1 mM EDTA, 2 μM riboflavina te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu. Na 890 μl reakcijske otopine dodano je 100 μl ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimske otopine

koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (15, 30 i 60 μL). Riboflavin (10 μL) je dodan u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Uzorci su promiješani i stavljeni ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti (superoksidni radikali stvaraju se u prisutnosti fotoreaktivnog riboflavina) te se nakon 10 min mjerenja svjetlost ugasi. NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm. Postotak inhibicije mjeri se prema sljedećoj formuli: % inhibicije = (kontrola A560 – uzorak A560) / kontrola A560. Jedna jedinica aktivnosti SOD-a izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina.

Reakcijska otopina za KAT sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 10 mM H_2O_2 (Aebi, 1984) i uzorak (30 μL) i mjenen je pad apsorbcancije (zbog razgradnje vodikovog peroksida) svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost KAT izražena je kao količina potrošenog H_2O_2 u μmol / minuti (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina, a izračunata je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti APOD sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH7), 0.2 mM askorbinske kiseline, 0,1 mM EDTA, 12 mM H_2O_2 (Nakano i Asada, 1981) i supernatant (120 μL). Vodikov peroksid (10 μL) dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja te je praćen pad apsorbcancije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi. Aktivnost APOD izražena je kao količina potrošenog askorbata u μmol / minuti (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina, uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti glutation-S-transferaze (GST) sadržavala je 100 mM kalij fosfatni pufer (pH 6,5), 10 mM reducirani glutation, 1 mM EDTA, 100 mM 1-kloro-2,4-dintrobenzen (CDNB) i supernatant (10 μL) (Habig i Jacoby, 1981). Praćen je porast apsorbcancije zbog redukcije supstrata CDBN pomoću SH-grupe od glutationa svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 340 nm. Aktivnost GST izražena je kao količina nastalog produkta u μmol / minuti (jedna jedinica, 1 U) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika \pm standardna devijacija.

2.4. Određivanje sadržaja malondialdehida

Kako bi se odredio sadržaj malondialdehida (MDA) krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješano je 300 μL supernatanta sa 700 μL reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina (TBA) otopljena u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini). Kao slijepa proba korištena je reakcijska smjesa. Uzorci i slijepa proba prelivevani su u staklene semimikroeprevete te zagrijavani u sušioniku 30 min na 95 °C. Nakon toga uzorci su naglo ohlađeni na ledu te centrifugirani 10 min na 10 000 \times g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer, 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama $\text{nmol/g}_{\text{suhe tvari (su.tv.)}}$ uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost od sedam replika \pm standardna devijacija.

2.5. Određivanje sadržaja karbonila

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

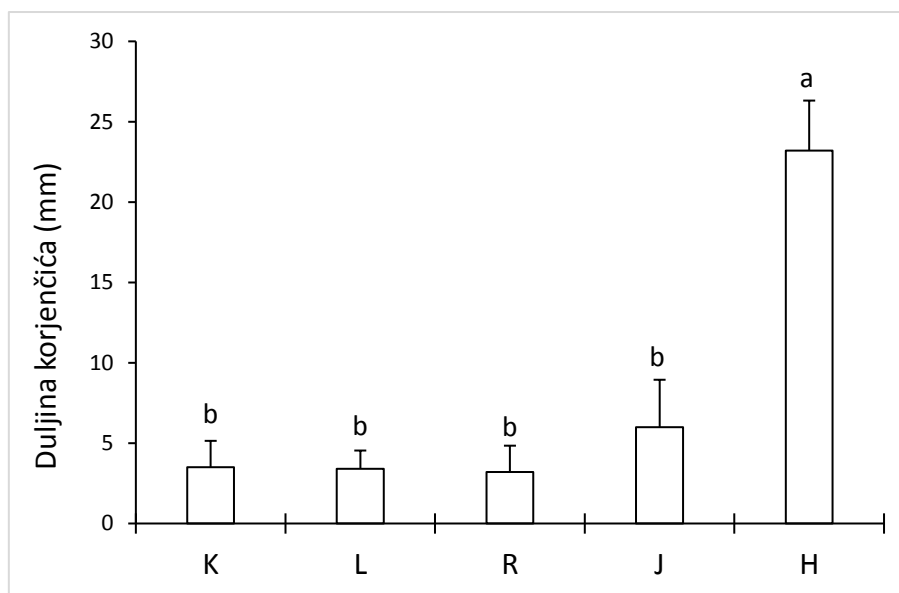
2.6. Statistička obrada podataka

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

3. Rezultati

3.1. Allium test – inhibicija rasta korjenčića

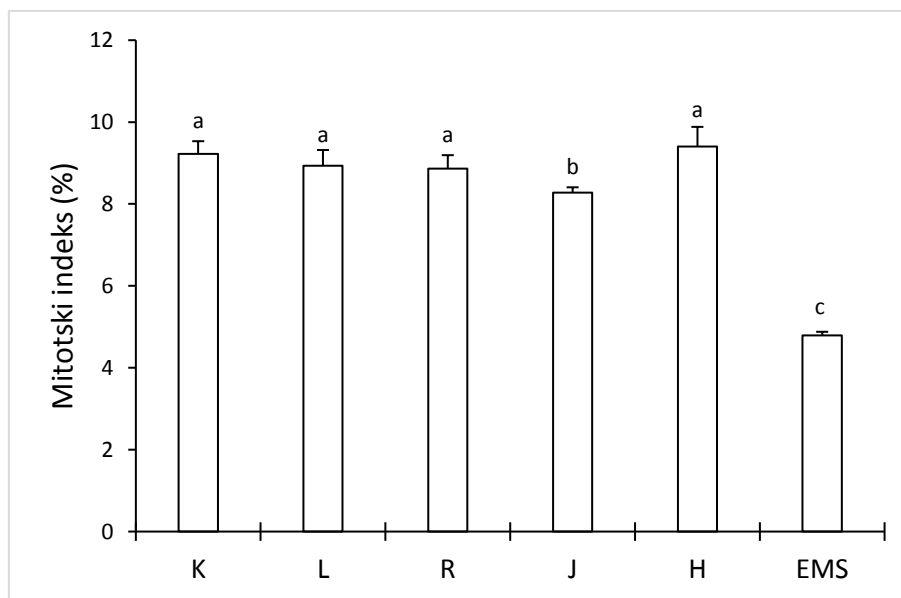
Duljina korjenčića luka, mjerenih nakon 72 h izlaganja, statistički je značajno povećana u odnosu na kontrolu kod uzorka vode s lokacije Hrušćica. Ostali uzorci nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 3).



Slika 3. Duljina korjenčića luka (mm) nakon 72 h izlaganja vodama rijeke Save uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili na destiliranoj vodi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

3.2. Allium test – mitotski indeks i kromosomske nepravilnosti

Mitotski indeks korjenčića luka izloženih uzorku vode s lokacije Jesenice statistički je značajno smanjen u odnosu na kontrolu i korjenčice izložene ostalim uzorcima vode. Ostali uzorci ne pokazuju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Mitotski indeks meristemskih stanicama luka izloženih pozitivnoj kontroli (5 mM EMS) statistički je značajno smanjen u odnosu na kontrolu. (Slika 4).



Slika 4. Mitotski indeks (%) vršnih stanica korjenčića luka nakon 24 h izlaganja vodama rijeke Save uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili destiliranoj vodi (K). Kao pozitivna kontrola korišten je 5 mM etilmetansulfonat (EMS). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

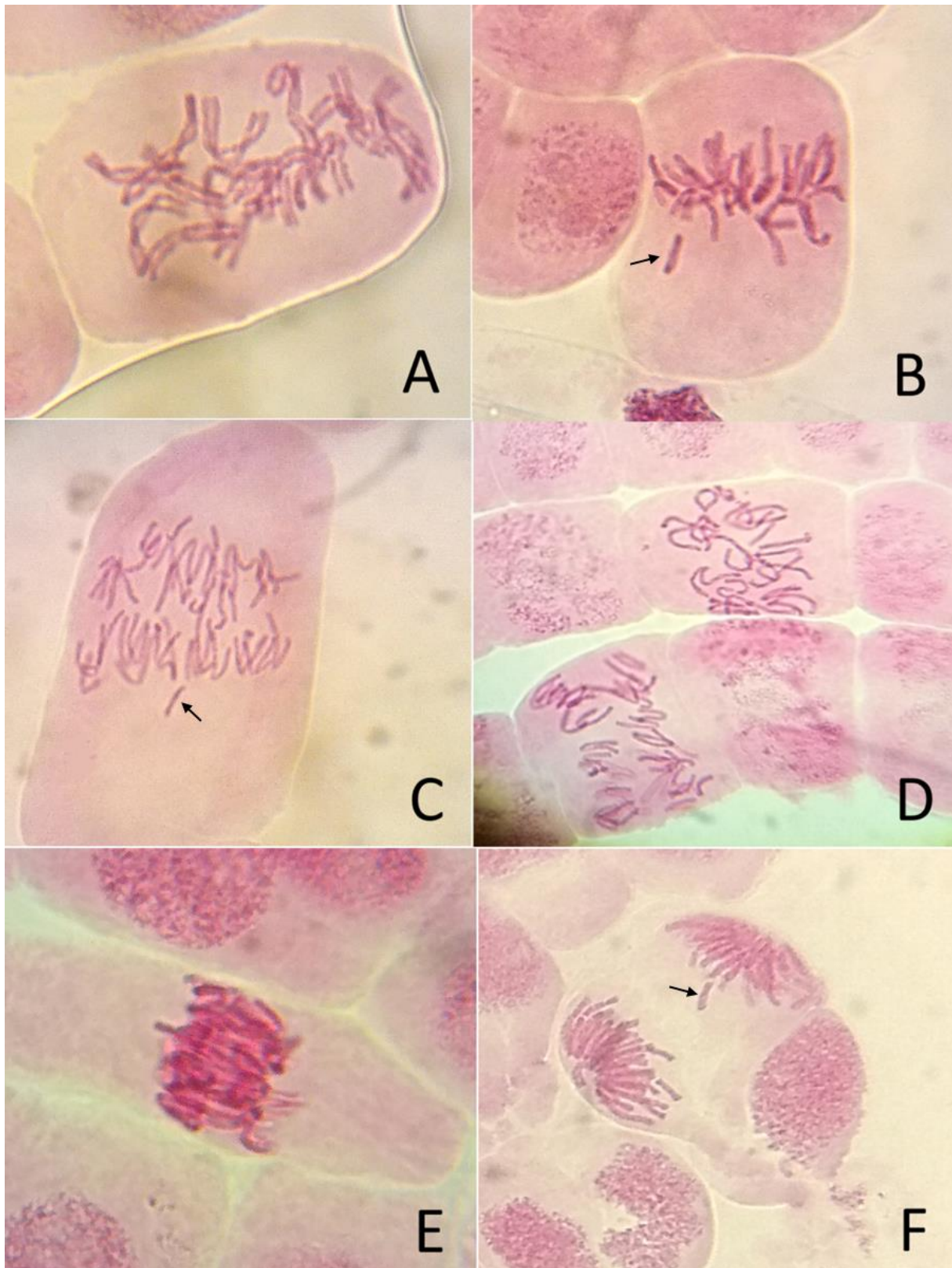
Za analizu kromosomskih aberacija pregledano je najmanje 100 diobenih stanica vrškova korjenčića luka po uzorku (kontrola, EMS, uzorci voda). Tipovi promatranih mitotičkih i kromosomskih nepravilnosti uključuju: lomove, anafazne mostove i sljepljivanje, c-mitozu, zaostale kromosome i anafaze s multipolarnim vretenom.

U Tablici 2 prikazane su mitotske i kromosomske nepravilnosti u stanicama korijena luka izloženih uzorcima testnih voda 24 sata. Najveći postotak kromosomskih aberacija u stanicama korijena luka izazvao je uzorak vode s lokacije Jesenice (16,4%), dok je najmanji postotak kromosomskih aberacija izazvao uzorak vode s lokacije Lukavec (10,7%). Zabilježeno je 42,8% kromosomskih aberacija u pozitivnoj kontroli (5 mM EMS). Najčešći tip aberacija u stanicama korjenčića luka je C-mitoza (Slika 5A i 5B), potom sljepljeni kromosomi (Slika 5C), zaostali kromosomi (Slika 5F), multipolarno vreteno (Slika 5D) te lomovi kromosoma (Slika 5B i 5C). Najrjeđi tip aberacija u stanicama korjenčića luka su anafazni mostovi (Slika 5C).

Tablica 2. Mitotske i kromosomske nepravilnosti u stanicama korijena luka izloženog uzorcima testnih voda: kontrola (K), Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H). Kao pozitivna kontrola korišten je 5 mM etilmetansulfonat (EMS).

Uzorak	Broj stanica u diobi	Poremećena funkcija diobenog vretena			Promjene u strukturi kromosoma	Promjene u strukturi kromatina		% aberacija
		C-mitoza	Zaostali kromosomi	Multipolarno vreteno	Lomovi	Anafazni mostovi	Sljepljeni kromosomi	
K	278	3	2	2	0	0	0	2.5
L	271	13*	4	4	1	0	7	10.7
R	269	13*	5	6	5	1	5	13.1
J	250	10*	6	5	6	1	13*	16.4
H	285	10*	4	1	3	6*	11*	12.3
EMS	145	15**	8*	4	11*	6*	18**	42.8

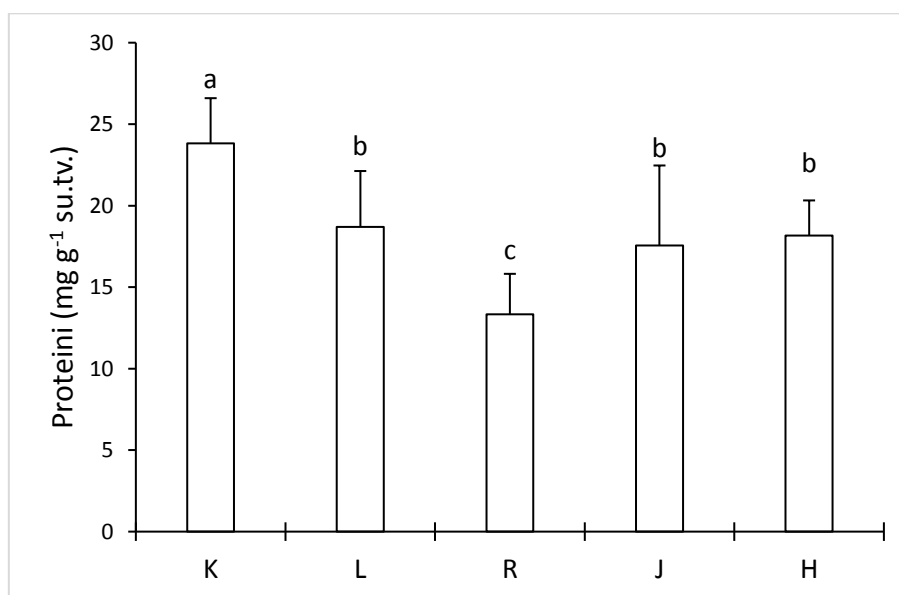
Stupci označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).



Slika 5. Citogenetički učinci uzoraka vode rijeke Save u meristemskim stanicama vrškova korijena luka: (A) c-metafaza, (B) metafaza s lomom (označen strelicom), (C) anafazni most s lomom (označen strelicom), (D) anafaza s multipolarnim diobenim vretenom (stanica – dolje, lijevo), (E) sljepljivanje u anafazi, (F) anafaza sa zaostalim kromosomom (označen strelicom) .

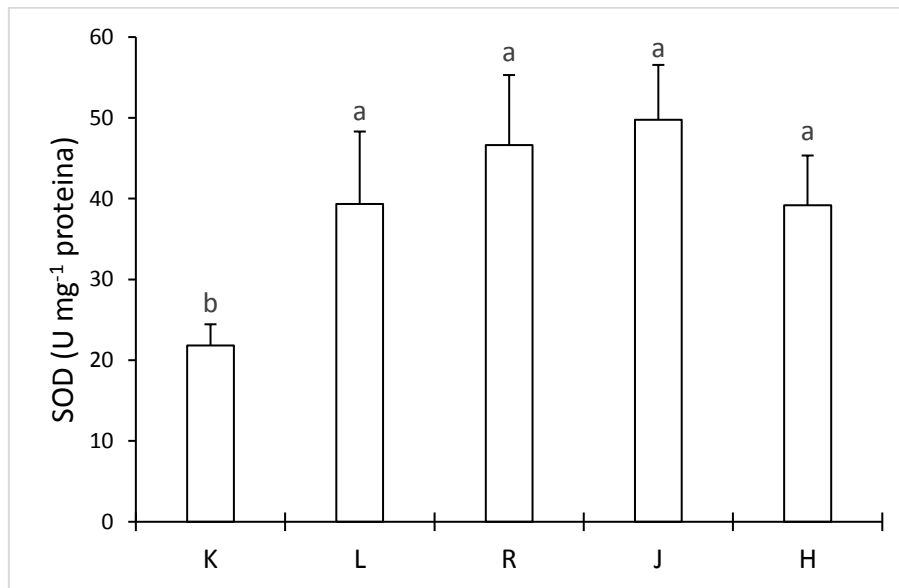
3.3. Sadržaj topivih proteina i aktivnost enzima

Na Slici 6. prikazana je ukupna količina topivih proteina mjenjenih nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save. Uzorci vode s lokacija Lukavec, Jesenice i Hrušćica uzrokovali su statistički značajno i međusobno podjednako smanjenje količine topivih proteina u odnosu na kontrolu. Uzorak vode s lokacije Rugvica izazvao je statistički značajno smanjenje količine topivih proteina u odnosu na kontrolu i ostale uzorke.



Slika 6. Sadržaj proteina nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili na destilirnoj vodi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

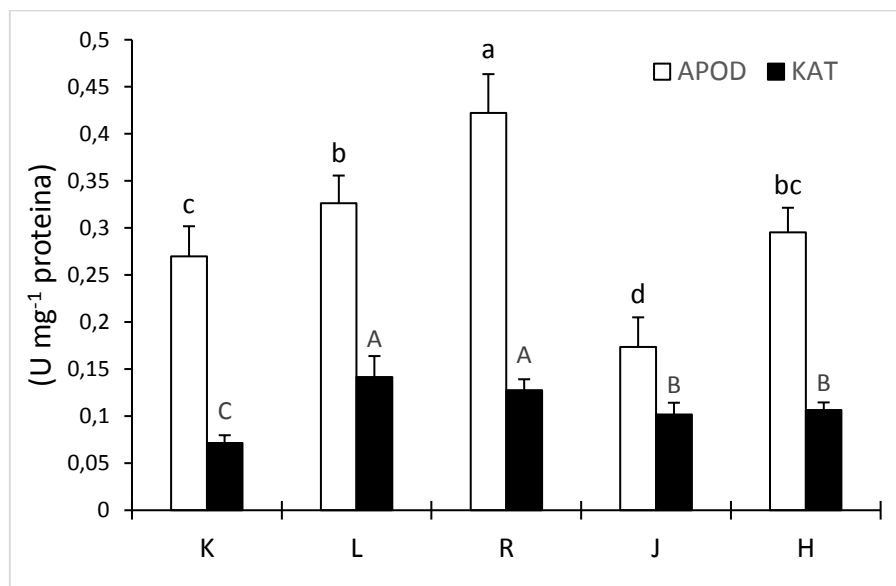
Aktivnost superoksid dismutaze, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save, statistički je značajno povećana u svim uzorcima u odnosu na kontrolu (Slika 7).



Slika 7. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hruščica (H) ili na destiliranoj vodi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

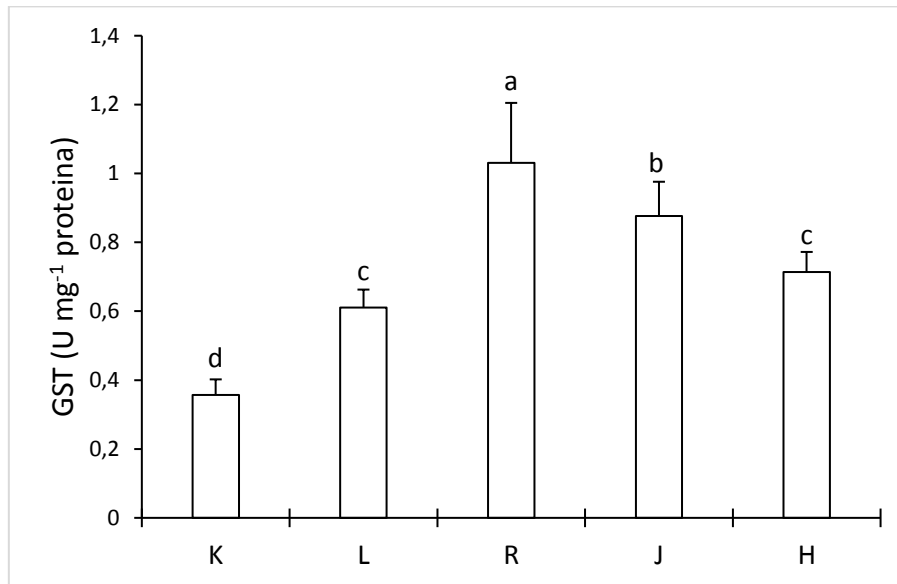
Aktivnost askorbat peroksidaze, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save, statistički je značajno povećana u uzorcima vode s lokacija Lukavec i Rugvica u odnosu na kontrolu. U korjenčićima luka izloženim uzorku vode s lokacije Rugvica zabilježena je najveća aktivnost askorbat peroksidaze u odnosu na ostale uzorke. Uzorak vode s lokacije Jesenice izazvao je statistički značajno smanjenje aktivnosti askorbat peroksidaze u korjenčićima luka u odnosu na kontrolu (Slika 8).

Aktivnost katalaze, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save, statistički je značajno povećana u svim uzorcima u odnosu na kontrolu. Aktivnost tog enzima bila je posebice povećana u korjenčićima luka izloženim uzorcima vode s lokacija Lukavec i Rugvica (povećanje od 98 odnosno 79% u odnosu na kontrolu) (Slika 8).



Slika 8. Aktivnost katalaze (KAT) i askorbat peroksidaze (APOD) nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili na destiliranoj vodi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

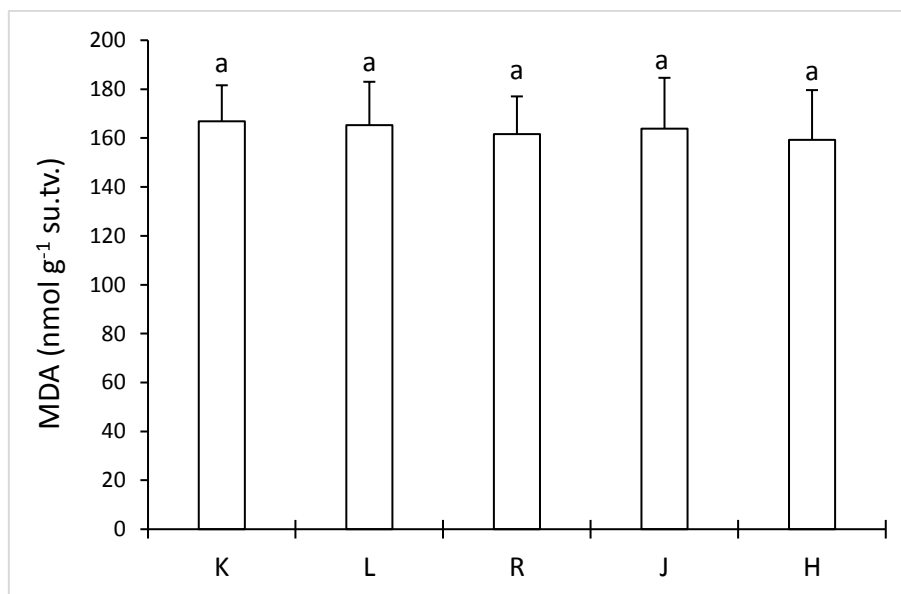
Aktivnost glutation-S-transferaze, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save, statistički je značajno povećana u svim uzorcima u odnosu na kontrolu i to u slijedu od najveće prema najmanjoj vrijednosti aktivnosti: $R > J > H > L$ (Slika 9).



Slika 9. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili na destiliranoj vodi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

3.4. Sadržaj malondialdehida

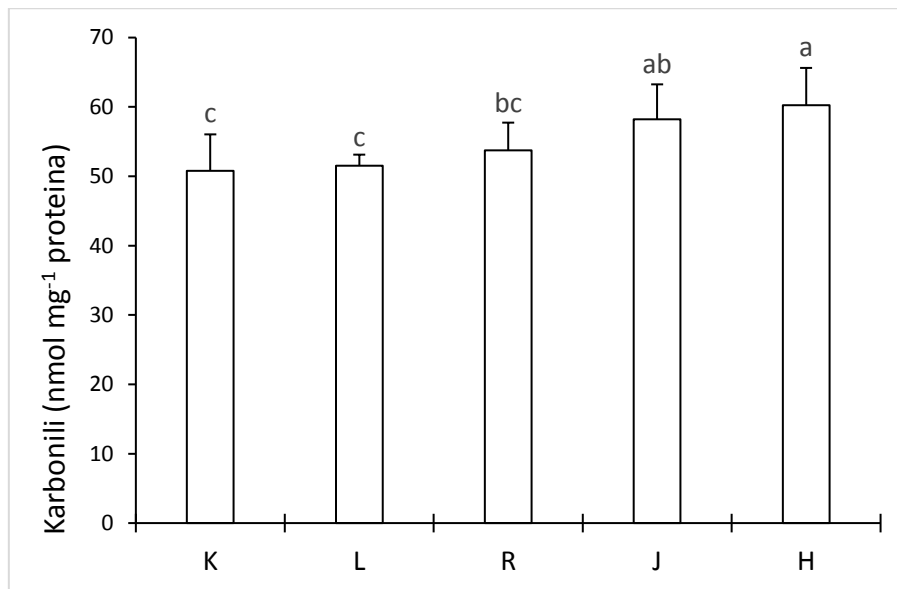
Sadržaj malondialdehida, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka uzorcima voda rijeke Save, ne pokazuje statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 10).



Slika 10. Sadržaj malondialdehida (MDA) nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hruščica (H) ili na kontrolnoj podlozi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

3.5. Sadržaj karbonila

Sadržaj karbonila, nakon 72 h izlaganja korjenčića luka uzorcima voda rijeke Save, statistički je značajno povećan u uzorcima vode s lokacija Hrušćica i Jesenice u odnosu na kontrolu. Uzorci vode s lokacija Lukavec i Rugvica nisu uzrokovali statistički značajnu razliku u sadržaju karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 11).



Slika 11. Sadržaj karbonila nakon 72 h izlaganja korjenčića luka vodama rijeke Save; uzorkovanim na lokacijama: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H) ili na kontrolnoj podlozi (K). Na stupcima je označena standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p < 0,05$).

3.6. Pearsonov koeficijent korelacije

Pearsonov koeficijent korelacije je izračunat za sve varijable mjerene u uzorcima korjenčića luka (Tablica 3). Proteini pokazuju umjerenu negativnu korelaciju s aktivnošću SOD i GST, a umjerenu korelaciju s APOD. Aktivnost SOD je u jakoj negativnoj korelaciji s KAT, a u umjerenoj korelaciji s GST. Aktivnost APOD je u umjerenoj korelaciji s KAT, a u umjereno negativnoj korelaciji s GST. Aktivnost KAT je u umjereno negativnoj korelaciji s GST.

Tablica 3. Pearsonov koeficijent korelacije za varijable mjerene u uzorcima korjenčića luka izloženim uzorcima voda rijeke Save: Lukavec (L), Rugvica (R), Jesenice (J), Hrušćica (H).

Variable	duljina	proteini	SOD	APOD	KAT	GST	MDA	C=O
duljina	1.000							
proteini	-0.136	1.000						
SOD	0.045	-0.445	1.000					
APOD	0.390	0.346	-0.299	1.000				
KAT	0.055	0.568	-0.572	0.411	1.000			
GST	-0.060	-0.679	0.492	-0.281	-0.504	1.000		
MDA	0.257	0.023	-0.350	0.348	0.130	0.177	1.000	
C=O	0.152	-0.278	0.093	0.184	-0.064	0.451	0.192	1.000

Korelacije označene crvenom bojom su statistički značajne ($p < 0,05$).

4. Rasprava

Rijeka Sava je izložena organskim i anorganskim onečišćenjima iz različitih izvora kao što su domaćinstva, industrijski pogoni te različite poljoprivredne djelatnosti. Takva onečišćenja prijete bioraznolikosti vodenog ekosustava i uzrokuju stres biljnim i životinjskim vrstama koja žive u tim ekosustavima (Simonović i sur., 2017). Kvaliteta vode rijeke Save (uzorkovane na četiri lokacije) procijenjena je putem Allium-testa u kombinaciji s biokemijskim pokazateljima (sadržaj proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima – superoksid dismutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i glutation-S-transferaze te sadržaja malondialdehida i karbonila). U uzorkovanoj vodi rijeke Save određen je niz organskih zagađivača pomoću tekućinskog kromatografa UHPLC-QTOF-MS (engl. liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry) u Glavnom vodnogospodarskom laboratoriju Hrvatskih voda te su ti podatci korišteni u ovom radu.

Različiti parametri luka poput rasta i oblika korjenčića, mitotskog indeksa i kromosomskih abnormalnosti mogu se koristiti pri određivanju citotoksičnosti, genotoksičnosti i ukupne toksičnosti uzrokovanih različitim zagađivačima u okolišu (Khanna i Sharma, 2013; Radić i sur., 2014). U Allium-testu inhibicija rasta korjenčića te pojava zakržljalih korjenčića upućuje na citotoksičnost, dok venuće korjenčića upućuje na toksičnost izazvanu zagađivačima (Khanna i Sharma, 2013). Uzorak vode s lokacije Hrušćica je uzrokovao povećani rast korjenčića u odnosu na kontrolu, dok ostali uzorci vode nisu statistički značajno utjecali na rast korjenčića. To upućuje na zaključak da nije došlo do sveukupnog toksičnog učinka testiranih otopina na rast korjenčića luka.

Citotoksičnost se može odrediti smanjenjem ili povećanjem mitotskog indeksa (Leme i Marin-Morales, 2009). Mitotski indeks korjenčića luka izloženih uzorku vode s lokacije Jesenice statistički je značajno smanjen u odnosu na kontrolu i korjenčiće izložene ostalim uzorcima vode rijeke Save. Smanjeni mitotski indeks, u odnosu na negativnu kontrolu, upućuje na promjene nastale kemijskim djelovanjem tokom rasta i razvoja korjenčića luka (Leme i Marin-Morales, 2009).

Kromosomske aberacije mogu se opisati kao promjene u broju ili strukturi kromosoma i dobar su indikator genotoksičnosti. Anafazni mostovi i lomovi kromosoma su indikatori klastogenog djelovanja, dok su zaostali kromosomi i sljepljivanje kromosoma, anafaze s multipolarnim

vretenom i c-mitoza rezultati aneugenog djelovanja (Leme i Marin-Morales, 2009). U svim uzorcima je zabilježen porast kromosomskih aberacija, u stanicama korijena luka, u odnosu na kontrolu. Najveći postotak kromosomskih aberacija zabilježen je u uzorku vode s lokacije Jesenice (16,4%). Najčešći tip aberacija u tom uzorku i uzorku s lokacije Hrušćica su sljepljeni kromosomi i c-mitoza. U uzorcima s lokacija Rugvica i Lukavec najzastupljenija je c-mitoza. Takvi rezultati upućuju na zaključak da onečišćivači u vodama rijeke Save imaju jače izraženo aneugeno djelovanje.

Uzorak vode s lokacije Jesenice je jedini koji je uzrokovao citotoksični i genotoksični učinak na meristemske stanice korjenčice luka, dok su ostali uzorci vode pokazali samo genotoksično djelovanje, pa možemo zaključiti da uzorak s lokacije Jesenice sadrži najviše zagađivača, uključivo i organske zagađivače.

Najveći ukupni broj različitih organskih zagađivača utvrđen je u uzorku vode s postaje Jesenice (396), zatim s postaja Hrušćica (390), Rugvica (386) te Lukavec (381). Najveći broj organskih zagađivača je zabilježen u skupini pesticida u svim uzorcima vode rijeke Save. Pesticide čini široka grupa kemikalija uobičajeno korištena u poljoprivredi. Iako je utjecaj na proizvodnju usjeva pozitivan i profitabilan, zaostali pesticidi zagađuju tlo i vodu, te tako štete vodenim i kopnenim ekosustavima (Mesi i Koplíkua, 2013). Iako je brojnost vrsta pesticida najveća, njihova koncentracija je niža u usporedbi s farmaceuticima, što se može objasniti uzorkovanjem vode u rano proljeće. Tokom zime korištenje pesticida je smanjeno, a njihova ponovna upotreba kreće kasnije u proljeće (Babić i sur. 2018). U skupini pesticida u najvećoj mjeri su zastupljeni insekticidi, potom herbicidi te fungicidi. Istraživanja su pokazala da herbicidi, insekticidi i fungicidi smanjuju mitotski indeks i uzrokuju kromosomske aberacije (Leme i Marin-Morales, 2009; Mesi i Koplíkua, 2013). Herbicidi na bazi triazina uzrokuju kromosomske aberacije poput sljepljivanja kromosoma, anafaznih mostova i c-metafaza te veliki broj lomova, zbog čega ovi herbicidi imaju klastogeno djelovanje (Leme i Marin-Morales, 2009; Papeš i sur., 1989). Klastogeno djelovanje se pripisuje herbicidu pentaklorfenolu dok butaklor djeluje aneugeno (Leme i Marin-Morales, 2009). Herbicid diklofop-metil uzrokuje u najvećoj mjeri c-mitozu i sljepljivanje kromosoma te ponešto zaostalih kromosoma, mostova i lomova, dok je insekticid lindan primarno utjecao na pojavu c-anafaze (Mesi i Koplíkua, 2013).

Najveća ukupna koncentracija organskih zagađivača u svim uzorcima pripada farmaceutskim kemikalijama. Najveća koncentracija farmaceutika je zabilježena u uzorcima vode s lokacije

Hrušćica i Rugvica, a nešto manja u uzorcima s lokacije Lukavec i Jesenice. Sustavno i cjelovito praćenje ukupne potrošnje lijekova na razini cijele Hrvatske provodi se od 2004. godine. Prema izvještaju Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) o korištenju lijekova od 2005. do 2017., u Hrvatskoj je u prošlom desetljeću došlo do povećanja upotrebe farmaceutika za oko 60 % (HALMED, 2018). Antibiotici su bili prisutni u velikom postotku u svim uzorcima vode rijeke Save u rasponu od 19 (Lukavec) do 32% (Hrušćica). U visokim koncentracijama su izmjereni h/s/n (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Rugvica, pa zatim Lukavec i Hrušćica), zatim analgetici (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Jesenice, Lukavec i Rugvica), h/a/a (visoke u uzorcima vode s lokacije Lukavec, Rugvica i Hrušćica), i steroidni hormoni (najviša koncentracija u uzorcima vode s lokacije Jesenice). Istraživanja su pokazala da hipnotici, poput alprazolama, djeluju citotoksično i gentoksično na meristemske stanice korijena luka uzrokujući smanjenje mitotskog indeksa i sljepljivanje kromosoma (Nefić, 2013), dok analgetici, poput acetaminofena, samo smanjuju mitotski indeks (Rathore i Choubey, 2005).

Industrijske kemikalije su brojem organskih zagađivača najmanje zastupljene (29-30), dok su prema ukupnim koncentracijama zastupljenije od pesticida. U uzorku vode s lokacije Jesenice je zabilježena najveća koncentracija industrijskih kemikalija. Otpadne vode iz industrijskih postrojenja uzrokuju smanjenje mitotskog indeksa, fragmentaciju, sljepljivanje i c-mitozu (Khanna i Sharma, 2013).

Biljke posjeduju efikasne antioksidacijske sustave kako bi se zaštitile od ROS. Povećano stvaranje ROS odnosno oksidacijski stres mogu uzrokovati organski i anorganski zagađivači prisutni u uzorcima voda. Povećanjem stresa povećava se broj radikala u stanicama što dovodi do aktivacije antioksidacijskih obrambenih mehanizama. Stoga se antioksidacijski enzimi mogu koristiti kao biokemijski biomarkeri stresa (Arora i sur., 2002; Valavanidis i sur. 2006). Izlaganje biljaka velikim koncentracijama teških metala može povećati proizvodnju ROS i promijeniti antioksidacijski odgovor na način da inhibira neke enzime ili im poveća aktivnost (Caverzan i sur., 2012; Van Assche i Clijsters, 1990).

Superoksid dismutaza uklanja superoksidne radikale te tako smanjuje rizik od formiranja hidroksilnog radikala iz superoksidnog radikala (Arora i sur., 2002). Aktivnost SOD je povećana u svim uzorcima voda rijeke Save u odnosu na kontrolu, što upućuje na povećanu produkciju superoksidnih iona uzrokovanu zagađivačima u vodi.

Biljke posjeduju različite enzime kojima metaboliziraju perokside, poput vodikovog peroksida. Ti enzimi uključuju katalazu i askorbat peroksidazu (Mhamdi i sur., 2010), čija je aktivnost mjerena u ovom radu. Vodikov peroksid nastaje dismutacijom superoksidnog radikala u reakciji najčešće kataliziranom superoksid dismutazom (Arora i sur., 2002).

Askorbat peroksidaza razgrađuje vodikov peroksid (Caverzan i sur., 2012), a povećana aktivnost APOD u uzorcima vode s lokacija Lukavec i Rugvica, u odnosu na kontrolu, ukazuje na povećano stvaranje vodikovog peroksida u korjenčićima luka. Kao odgovor na okolišni stres aktivnost APOD se u pravilu povećava zajedno s SOD i KAT (Caverzan i sur., 2012), što nije slučaj s uzorkom s lokacije Jesenice zbog smanjenja aktivnosti APOD, a povećane aktivnosti KAT i SOD. Uzrok smanjenoj aktivnosti APOD može biti prisutnost teških metala čija koncentracija nije mjerena u uzorcima vode rijeke Save.

Peroksisomi sadrže velike količine katalaze, no njena svojstva sugeriraju da enzim nije učinkovit pri niskim koncentracijama H_2O_2 , kao što je to APOD (Arora i sur., 2002). Aktivnost KAT je bila povećana u svim uzorcima voda rijeke Save u odnosu na kontrolu, posebice u uzorcima s lokacija Lukavec i Rugvica, što upućuje na to da je KAT dominantna u razgradnji vodikovog peroksida u korjenčićima luka izloženim vodama rijeke Save. Povećana aktivnost SOD i KAT, te APOD na pojedinim lokacijama sugeriraju da je izvor vodikovog peroksida redukcija superoksidnih radikala.

Glutation-S-transferaza je enzim uključen u detoksikaciju mnogih ksenobiotika i ima važnu ulogu u zaštiti od oksidacijskog stresa (Edwards i sur., 2000). Aktivnost GST je povećana u svim uzorcima voda rijeke Save, u odnosu na kontrolu. Ekspresija GST u biljkama je povećana kao odgovor na oksidacijski stres uzrokovan herbicidima i kemijskim toksikantima (Kumar i Trivedi, 2018). Iako je aktivnost GST najviše povećana u uzorku s lokacije Rugvica, na toj lokaciji nije zabilježen najveća koncentracija herbicida, što upućuje na to da herbicidi nisu glavni uzrok povećanja aktivnosti GST u uzorcima vode rijeke Save.

MDA je pouzdani biomarker oksidacijskog stresa i jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije (Ayala i sur., 2014). Korjenčići luka, izlagani 72 h uzorcima voda rijeke Save, nisu pokazali statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu, te stoga možemo zaključiti da nije došlo do lipidne peroksidacije i oštećenja lipida.

Upotreba karbonilnih skupina kao biomarkera ima prednosti u odnosu na lipidnu peroksidaciju zbog relativno ranog nastajanja i stabilnosti oksidiranih proteina (Dalle-Donne i sur., 2003). Proteini podliježu brojnim promjenama u strukturi velikim brojem različitih oksidativnih reakcija, no karbonilacija je najštetniji tip oštećenja proteina čija se razina povećava tijekom oksidacijskog stresa (Nystrom, 2005). Sadržaj karbonila, u odnosu na kontrolu, je bio povećan u uzorcima vode s lokacije Jesenice i Hrušćica, što upućuje na to da je došlo do oksidacije proteina kod navedenih uzoraka.

Zaključno rezultati pokazuju da mikrozagađivači prisutni u vodi rijeke Save imaju genotoksični učinak te mogu izazvati oksidacijski stres i uzrokovati oštećenja proteina.

5. Zaključak

Povećana urbanizacija, upotreba raznih farmaceutika, pesticida i industrijskih kemikalija dovodi do sve većeg onečišćenja rijeke Save i potrebe za pročišćavanjem otpadnih voda prije ispuštanja u rijeku Savu te redoviti monitoring na svim njezinim postajama. Rezultati Allium-testa i biokemijskih parametara pokazuju da su u vodi rijeke Save prisutne genotoksične tvari, koje su uzrokovale povećanu produkciju reaktivnih oblika kisika u korjenčićima luka što je utvrđeno temeljem povećane karbonilacije proteina i promjenom aktivnosti antioksidacijskih enzima. Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju može se zaključiti da je *Allium cepa* L. dovoljno osjetljiv i pogodan modelni organizam za ispitivanje toksičnosti u vodenom okolišu.

6. Literatura

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

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

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

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

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

Baek K.-H., Skinner D. (2012): Production of reactive oxygen species by freezing stress and the protective roles of antioxidant enzymes in plants. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 1: 34-40

Bailey-Serres J., Mittler R. (2006): The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology* 141: 311.

Bradford MM (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

Caverzan A., Passaia G., Rosa S. B., Werner Ribeiro C., Lazzarotto F., Margis-Pinheiro M. (2012): Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1011-1019

Chauhan L.K.S., Saxena P.N., Gupta S.K. (1999): Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Environmental and Experimental Botany* 42: 181–189

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 aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1-31

Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: Enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193 – 198

- Fiskesjö G. (1985): The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102: 99-112
- Fiskesjö G. (1988): The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* 197: 241-260
- Fredotović Ž., Šprung M., Soldo B., Ljubenkov I., Budić-Leto I., Bilušić T., Vedrana Čikeš-Čulić V., Puizina J. (2017): Chemical composition and biological activity of *Allium cepa* L. and *Allium x cornutum* (Clementi ex Visiani 1842) methanolic extracts. *Molecules* 22: 1-13
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977): Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314
- Habig, W. H., Jacoby, W. B. (1981): Assays for differentiation of glutathione-s-transferases. *Methods of Enzymology* 77: 398 – 405
- Heath RL, Packer L (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I - Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125:189-198
- Khanna N., Sharma S. (2013): *Allium Cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 1: 105-119
- Kumar S., Trivedi P. K. (2018): Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Front Plant Science* 9: 751
- Lapworth D. J., Baran N., Stuart M. E., Ward R. S. (2012): Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution* 163: 287-303
- Leme D.M., Marin-Morales M.A. (2009): *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research* 682: 71–81
- Levan A. (1938): The effect of colchicine on root mitoses in Allium. *Hereditas* 24: 471-486
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186: 464-478
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4(8): 118–126
- Mesi A., Koplíkua D. (2013): Cytotoxic and genotoxic potency screening of two pesticides on *Allium cepa* L.. *Procedia Technology* 8: 19 – 26
- Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S, Van Breusegem F., Noctor G. (2010): Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197–4220

- Nakano Y, Asada K (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880
- Nam T. (2011): Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological Research* 27: 1-6
- Nefić H., Musanović J., Metović A., Kurteshi A. (2013): Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by alprazolam. *Medical Archives* 67: 388–392
- Nikolić T. (2013): *Sistematska botanika*. Alfa, Zagreb.
- Nyström T. (2005): Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal* 24: 1311-1317
- Pal, A., Yew – Hoong Gin, K., Yu – Chen Lin, A., Reinhard, M. (2010): Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408: 6062 – 6069
- Papeš D., Besendorfer V., Bosiljevac V. (1989): The *Allium*-test response to cyanazine. *Acta Botanica Croatica* 48: 39-46, 1989.
- Pareek S, Sagar A. N., Sharma S., Kumar V. (2018): Onion (*Allium cepa* L.). U: Yahia E. M. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*. Wiley Blackwell, John Wiley & Sons Limited, str. 1145-1156.
- Perrone S., Tataranno M. L., Stazzoni G., Buonocore G. (2012): Oxidative stress and free radicals related diseases of the newborn. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 3: 1043-1050
- Radić S., Vujčić V., Cvetković Ž., Cvjetko P., Oreščanin V. (2014): The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. *Science of the Total Environment* 466–467: 84–89
- Rathore H.S., Choubey P. (2005): Prevention of acetaminophen induced mito depression with myrobalan in *Allium cepa* model. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 4:100-104
- Schmidt R. R., Weits D. A., Feulner C. F. J., van Dongen J. T. (2018): Oxygen Sensing and Integrative Stress Signaling in Plants. *Plant Physiology* 176: 1131-1142
- Simonović P., Piria M., Zuliani T., Ilić M., Marinković N., Kračun-Kolarević M., Paunović M. (2017): Characterization of sections of the Sava River based on fish community structure. *Science of the Total Environment* 574: 264–271
- Stipaničev D. (2011): *Ekotoksikološko istraživanje rijeke Ilove*. Doktorska disertacija, PMF, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Štefan L., Tepšić T., Zavidic T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43: 84-93

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006): Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64: 178 – 189

Van Assche F., Clijsters H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13: 195–206

Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal* 16: 4806-4816

Životopis

Rođena sam u Karlovcu, gdje završavam OŠ Grabrik (2010.) i gimnaziju Karlovac te tečaj DSD-a u sklopu škole (2014.). 2014. godine upisujem PMF u Zagrebu, studij biologije i kemije. Za vrijeme studija sam sudjelovala na tri smotre sveučilišta, predstavljajući biološki odsjek 2015. godine i kemijski odsjek 2016. i 2017. godine. Sudjelovala sam na dvije „Noći biologije“ (2018. i 2019.), te na dva „Otvorena dana kemijskog odsjeka“ (2017. i 2018.). Tokom studija sam bila član Hrvatskog kemijskog društva i „Znanstvenih čarolija“ studentske sekcije HKD-a (2016.-2018.). U sklopu „Znanstvenih čarolija“ sudjelovala sam na festivalu znanosti 2017. godine. 2019. godine sam dobila priznanje fakulteta za izniman uspjeh tokom studija. Tokom srednje škole i fakulteta, povremeno sam volontirala u udruzi „Jak kao Jakov“.