

Utjecaj izoproturona na vodenu leću Lemna minor L. u kontinuiranom i pulsnom izlaganju

Moslavac, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:791664>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša

Marko Moslavac

**Utjecaj izoproturona na vodenu leću *Lemna minor* L. u kontinuiranom i
pulsnom izlaganju**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij: **Zaštita prirode i okoliša**
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Diplomski rad

Utjecaj izoproturona na vodenu leću *Lemna minor* L. u kontinuiranom i pulsnom izlaganju

Marko Moslavac

Rad je izrađen u: Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Janja Horvatić

Neposredni voditelj: Dr. sc. Martina Varga

Kratki sažetak diplomskog rada: Mala vodena leća (*Lemna minor* L.) izložena je djelovanju fenilurea herbicida izoproturona u hranjivoj otopini. Uspoređeno je djelovanje izoproturona na *L. minor* pri kontinuiranom izlaganju u periodu od 21 dan te pulsним izlaganjima (2d-puls: tri izlaganja sa po dva dana tretmana i pet dana oporavka te 3d-puls: tri dana tretmana izoproturonom i četiri dana oporavka u čistoj hranjivoj otopini). Tretman izoproturonom toksičan je za *L. minor*, što je za posljedicu imalo promjene u prirastu broja biljaka, akumulaciji svježe i suhe mase, koncentraciji fotosintetskih pigmenata i proteina te aktivnosti antioksidacijskih enzima kao ekotoksikoloških molekularnih biomarkera pojave oksidacijskog stresa. Vodena leća *L. minor* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje štetnog djelovanja herbicida na biljke u vodenim ekosustavima. Istraživanja utjecaja višestrukih pulsних izlaganja ne-ciljnih vrsta ksenobioticima, uz standardne testove toksičnosti mogu doprinijeti točnijoj procjeni rizika utjecaja na okoliš.

Broj stranica: 88

Broj slika: 31

Broj tablica: 13

Broj literaturnih navoda: 178

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Lemna minor*, herbicidi, izoproturon, kontinuirano i pulsno izlaganje

Datum obrane: 30. svibnja 2017.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predsjednica povjerenstva;
2. **Prof. dr. sc. Janja Horvatić**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor i član;
3. **Doc. dr. sc. Vesna Peršić**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
4. **Doc. dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, zamjena člana.

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

MS thesis

Department of Biology

Graduate university study programme in Nature and Environmental Protection

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

Effects of isoproturon on the duckweed *Lemna minor* L. in continuous and pulsed exposures

Marko Moslavac

Thesis performed at: Plant ecophysiology laboratory of the Department of Biology Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Janja Horvatić, PhD, Associate Professor

Assistant in charge: Martina Varga, PhD

Summary: Common duckweed (*Lemna minor* L.) plants were treated with different concentrations of phenylurea herbicide isoproturon in nutrient solution. The effect of isoproturon on *L. minor* in continuous exposure during 21 days and pulsed exposures (2d-puls: three exposures with two days of treatment and five days of recovery and 3d-puls: three days of isoproturon treatment as well as four days of recovery in pure nutrient solution) were compared. Isoproturon was toxic to *L. minor*, causing inhibition of plant growth, changes in fresh and dry mass accumulation, concentration of photosynthetic pigments and proteins, as well as antioxidative enzymes activity as ecotoxicological molecular biomarkers of oxidative stress. *L. minor* can be used as a model for further study of harmful herbicide effects on plants in aquatic ecosystems. Investigations on the effects of multiple pulse exposure of non-target species to xenobiotics parallel with standard toxicity tests can contribute to a more accurate environmental impact assessment.

Number of pages: 88

Number of figures: 31

Number of tables: 13

Number of references: 178

Original in: Croatian

Key words: *Lemna minor*, herbicides, isoproturon, continuous and pulsed exposures

Date of the thesis defense: 30th May 2017

Reviewers:

1. **Ivna Štolfa Čamagajevac**, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, commission president;
2. **Janja Horvatić**, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, supervisor and member;
3. **Vesna Peršić**, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, member;
4. **Dubravka Špoljarić Maronić**, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, substitute.

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek and National and university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek.

Najiskrenije se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Janji Horvatić što mi je omogućila izradu ovog rada, a time i stjecanje iskustva u znanstvenom radu.

Posebno se zahvaljujem dr. sc. Martini Varga, voditeljici diplomskog rada na stručnoj pomoći i mnogobrojnim korisnim savjetima prilikom odabira teme diplomskog rada. Hvala na ukazanom povjerenju, suradnji, nesebično prenesenom znanju i iskustvima, pomoći te vremenu i strpljenju koje ste mi posvetili tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Najveću zahvalnost upućujem svojim roditeljima. Hvala Vam na neizmjerne ljubavi, beskrajnom strpljenju, podršci, razumijevanju i ohrabrivanju te pomoći koju ste mi uvijek pružali tijekom svih ovih godina.

„Sve su supstance otrovi, nema nijedne koja nije otrov. Samo je prava doza ono što čini da neka supstanca nije otrov.“

Paracelsus

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Herbicidi	1
1.2. Fenilurea herbicidi	2
1.2.1. Izoproturon.....	3
1.2.1.1. Mehanizam djelovanja izoproturona	4
1.2.1.2. Upotreba herbicida izoproturona u zemljama Europske unije	5
1.3. Utjecaj herbicida na makrofite i druge ne-ciljne vrste u vodenim ekosustavima.....	6
1.4. Pulsna izloženost herbicidima	8
1.5. Značajke porodice <i>Lemnaceae</i>	10
1.5.1. Biologija i značajke vrste <i>Lemna minor</i> L.	11
1.6. Laboratorijski testovi toksičnosti (<i>Lemna</i> -test)	12
1.7. Ekotoksikološki molekularni biomarkeri u akvatičkim makrofitama	14
1.7.1. Antioksidacijski enzimi kao ekotoksikološki molekularni biomarkeri	16
1.8. Cilj istraživanja.....	18
2. Materijal i metode	19
2.1. Kultura vodene leće (<i>Lemna minor</i> L.)	19
2.2. Utjecaj herbicida izoproturona na vodenu leću	20
2.2.1. Utjecaj izoproturona na rast biljaka	21
2.2.1.1. Prirast broja biljaka	22
2.2.1.2. Određivanje inhibicije prirasta broja biljaka.....	22
2.2.1.3. Prirast svježe mase biljaka	23
2.2.1.4. Prirast suhe mase biljaka	23
2.2.2. Utjecaj izoproturona na koncentraciju fotosintetskih pigmenata, proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima	23
2.2.2.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata	24
2.2.3. Određivanje koncentracije proteina i aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	25
2.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina	25
2.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze....	26
2.2.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze ...	27
2.2.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima katalaze.....	27
2.3. Statistička obrada podataka	28

3. Rezultati	29
3.1. Utjecaj izoproturona na vodenu leću	29
3.1.1. Utjecaj izoproturona na rast biljaka	29
3.1.1.1. Utjecaj izoproturona na prirast broja biljaka.....	29
3.1.1.2. Utjecaj izoproturona na prirast svježe mase biljaka.....	35
3.1.1.3. Utjecaj izoproturona na prirast suhe mase biljaka	36
3.1.1.4. Utjecaj izoproturona na koncentraciju proteina	40
3.1.2. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju fotosintetskih pigmenata.....	43
3.1.2.1. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju klorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	43
3.1.2.2. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju klorofila <i>b</i> (Chl <i>b</i>)	44
3.1.2.3. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju ukupnih klorofila (Chl <i>a+b</i>)	47
3.1.2.4. Utjecaj herbicida izoproturona na omjer klorofil <i>a/b</i> (Chl <i>a/b</i>)	48
3.1.2.5. Utjecaj izoproturona na koncentraciju ukupnih karotenoida (Car)	52
3.1.3. IC ₅₀ vrijednosti na temelju mjerenih pokazatelja rasta biljaka	55
3.1.4. Utjecaj izoproturona na aktivnost antioksidacijskih enzima	56
3.1.4.1. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze	56
3.1.4.2. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze	60
3.1.4.3. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze.....	63
4. Rasprava	66
5. Glavni rezultati i zaključak	74
6. Literatura.....	75

1. Uvod

1.1. Herbicidi

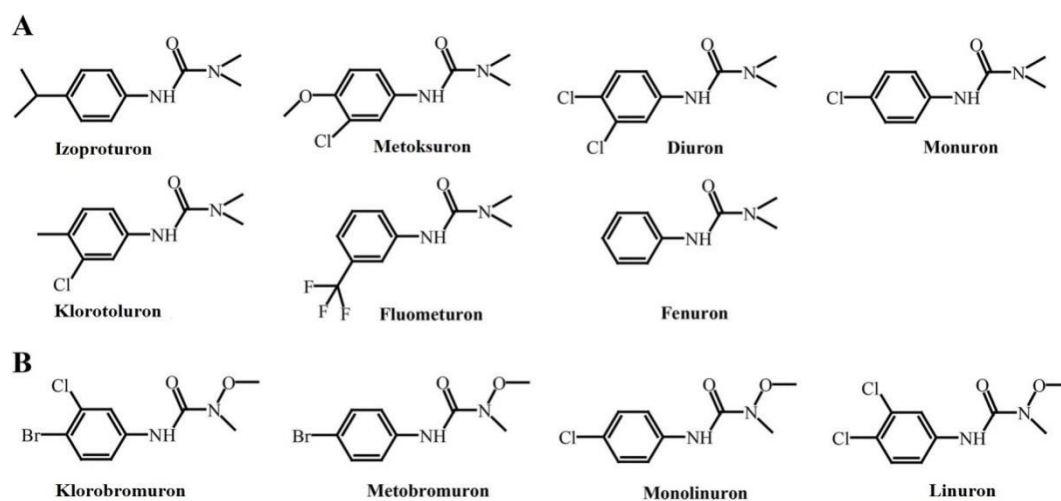
Herbicidi su skupina pesticida, a obuhvaćaju veliku grupu kemijskih spojeva koji različitim mehanizmima djelovanja služe suzbijanju nepoželjnih biljnih vrsta, alga, mahovina i lišajeva. Osnovni mehanizmi djelovanja herbicida uključuju inhibiciju sinteze aminokiselina, inhibiciju fotosinteze, biosinteze lipida, karotenoida, celuloze te folne kiseline, kao i inhibiciju diobe stanice te svjetlošću potpomognuto bijeljenje. Mehanizmi toksičnosti herbicida variraju te su i rasponi toksičnih koncentracija herbicida za određene vrste veliki i ovise o sposobnosti samog organizma za njihovu razgradnju i bioakumulaciju (DeLorenzo i sur., 2001).

Od ukupne količine primijenjenih pesticida u Europi, više od 35% se odnosi upravo na herbicide (NOVA, 2003). Na razini Europske unije herbicidi se najčešće upotrebljavaju za zaštitu poljoprivrednih kultura (Eurostat, 2007). Sukladno tome, ujedno su i najveći zagađivači voda u područjima s intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom te su često prisutni u izrazito visokim koncentracijama u površinskim i podzemnim vodama (Guzzella i sur., 2006). Koncentracija herbicida u površinskim vodama u nekim europskim zemljama često premašuje granične vrijednosti (Debenest i sur., 2010; Müller i sur., 2002). To je najčešće rezultat iznenadnih točkastih izvora onečišćenja ili pak obilnih kiša i poplava zbog kojih dolazi do pojave maksimalnih koncentracija herbicida (Vallotton i sur., 2008).

Postojanost herbicida u okolišu ovisi o brojnim čimbenicima, poput učestalosti njihove primjene, postojanosti herbicida u tlu i mobilnosti, oborinama, topografiji i klimi (Lin i sur., 1999). Nakon što određena količina primijenjenog herbicida dospije u terestrički ekosustav, dužina trajanja njenog aktivnog djelovanja i zadržavanja u tlu te intenzitet ispiranja i unosa u površinske i podzemne vode, ovise prvenstveno o svojstvima herbicida (Ng i Clegg, 1997). Herbicidi su u vodenim ekosustavima izloženi brojnim fizikalnim, kemijskim te mikrobiološkim procesima, poput fotolitičke razgradnje, volatizacije, sedimentacije, resuspenzije, adsorpcije/desorpcije, biorazgradnje, bioakumulacije te biotransformacije (Holvoet i sur., 2007).

1.2. Fenilurea herbicidi

Od otkrića i sinteze fenilurea herbicida, ubrzo nakon Drugog svjetskog rata, ova je grupa spojeva postala jedna od najznačajnijih i najviše upotrebljivanih skupina herbicida. Većina komercijalno dostupnih fenilurea herbicida su najčešće *N*-metoksi-*N*-metil-substituent (primjerice linuron i klorobromuron), ili *N*-*N*-dimetil-substituent spojevi (primjerice izoproturon i diuron). Strukturne formule najčešće korištenih fenilurea herbicida prikazane su na slici 1.



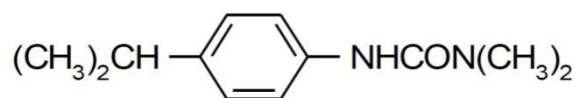
Slika 1. Strukturne formule fenilurea herbicida. (A) *N*-*N*-dimetil-substituent fenilurea herbicidi; (B) *N*-metoksi-*N*-metil-substituent fenilurea herbicidi (modificirano prema Gu i sur., 2013).

Fenilurea herbicidi uglavnom imaju relativno visoku stopu topivosti u vodi te nisku stopu sorpcije na tlo, što ih čini izuzetno mobilnim u terestričkim ekosustavima. Nekoliko skupina fenilurea herbicida i njihovih metabolita otkriveno je i svrstano u skupinu zagađivača podzemnih voda (Field i sur., 1997; Spliid i Køppen, 1998), rijeka i potoka (Field i sur., 1997; Stangroom i sur., 1998), jezera (Thurman i sur., 2000; Gerecke i sur., 2001) i morskih ekosustava u raznim dijelovima svijeta. Fenilurea herbicidi mogu dospjeti u okoliš na nekoliko različitih načina, primjerice onečišćenjem iz točkastih izvora, kao posljedica slučajnog izlivanja ili čišćenjem te pranjem opreme za tretiranje usjeva.

Međutim, veliki broj ovih herbicida u okoliš dospijeva difuznim putem kao rezultat tretiranja usjeva (Johnson i sur., 2001; Gooddy i sur., 2002). Prirodnu stopu razgradnje fenilurea herbicida, s posebnim naglaskom na mineralizaciju fenilne skupine do CO₂, gotovo je nemoguće detektirati, ili je ona veoma spora u površinskim i podzemnim vodama (Johnson, 1998; Kristensen, 2001).

1.2.1. Izoproturon

Izoproturon [3-(4-izopropilfenil)-1,1-dimetilurea] je selektivni, translokacijski i sistemski herbicid iz skupine fenilurea herbicida, molekulske formule C₁₂H₁₈N₂O i strukturne formule prikazane na slici 2 (Federal Environmental Protection Agency, 2000).



Slika 2. Strukturna formula herbicida izoproturona (Tomlin, 2009).

Koristi se za suzbijanje jednogodišnjih uskolisnih i nekih širokolisnih korova u žitaricama (pšenica, ječam, raž). Primjenjuje se prije i poslije faze nicanja usjeva, kada su korovi u fazi do 4 lista (SOeS, 2012). Jedan je od najčešće primjenjivanih herbicida u konvencionalnoj poljoprivredi Europske unije i često je otkriven u uzorcima površinskih i podzemnih voda. S obzirom na to da se koristi u značajnim količinama, ne iznenađuje podatak da su koncentracije u površinskim vodama visoke, a dosežu vrijednosti od 0,2 µg/L u vodi Dunava (ICPDR, 2015). Izoproturon ima nisku vrijednost koeficijenta lipofilnosti- K_{ow} koeficijenta: n oktanol/voda (log K_{ow}=2,5 pri pH 7 i 20 °C), dok je njegov bioakumulacijski potencijal zanemariv te se ne smatra perzistentnim (Tablica 1). Međutim, odlikuje ga sporija razgradnja (manja stopa biodegradacije, enzimska i mikrobiološka). Izoproturon je hidrolitički i fotolitički stabilan spoj. Prosječno vrijeme poluraspada u sustavu voda-sediment iznosi 20-61 dan u vodenoj fazi te između 44-276 dana u čitavom ekosustavu.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva herbicida izoproturona (web 1).

Tip pesticida	Herbicid
Hrvatski naziv	Izoproturon
Kemijski naziv prema IUPAC-u	[3-(4-izopropilfenil)-1,1-dimetilurea]
CAS naziv	<i>N,N</i> -dimetil- <i>N'</i> -[4-(1-metiletil)fenil]urea
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O
Molekularna masa (g/mol)	206,28
Podrijetlo	Sintetičko
Djelovanje	Selektivni, sistemični, translokacijski herbicid. Inhibitor PSII.
Agregatno stanje	Kristalinična sol
Boja	Bez boje
Miris	Bez mirisa
Vrelište	157,3 °C
Topivost u vodi (mg/L, 20 °C)	70,2; neovisno o pH
Topivost u metanolu (g/L, 20 °C)	75
Tlak para [Pa]	2,8-8,1 x 10 ⁻⁶ pri 20 °C
Log Pow	2,5 pri 25 °C; neovisno o pH
Konstanta Henryevog zakona [Pa x m ³ /mol]	1,46 x 10 ⁻⁵ pri 22 °C
Čistoća	970 g/kg
CAS broj	34123-59-6
CIPAC broj	336
Klasifikacija rezistentnosti herbicida (HRAC)	C2
Klasifikacija rezistentnosti herbicida (WSSA)	7
Primjeri zabilježene rezistencije	<i>Alopecurus myosuroides</i> Huds. <i>Phalaris minor</i> Retz.
LD ₅₀ oralno (mg/kg)	2100
LD ₅₀ derm. (mg/kg)	>2000
LC ₅₀ inhl. (mg/kg)	>2

1.2.1.1. Mehanizam djelovanja izoproturona

Izoproturon, kao i mnogi drugi fenilurea herbicidi uzrokuje inhibiciju fotosustava II inducirajući oksidacijski stres, što posljedično dovodi do oštećenja proteina, lipida i drugih staničnih komponenti, kao i do inhibicije rasta biljaka (Rutherford i Krieger-Liszkay, 2001). Izoproturon biljke apsorbiraju dominantno preko korijena, ali i nadzemnim dijelovima. Brzo se transportira preko ksilema u listove, gdje ispoljava svoje djelovanje (Glabgen i sur., 1999). Mehanizam toksičnosti navedenog herbicida temelji se na blokiranju fotosintetskog elektron transportnog lanca u tilakoidima kloroplasta na nivou fotosustava II (PSII) (Porsbring i sur., 2010).

Djelovanje izoproturona se ispoljava njegovim vezivanjem na D1 protein fotosustava II, blokirajući pritom transport elektrona od Q_A do Q_B plastokinonskog receptora, što sprječava normalno funkcioniranje elektron transportnog lanca (Backhaus i sur., 2004; Janjić, 2009). Navedeno dovodi do prekida sinteze ATP-a i nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfata ($NADPH_2$) te do oksidativnih oštećenja fotosintetskog aparata (Janjić, 1994).

1.2.1.2. Upotreba herbicida izoproturona u zemljama Europske unije

Svake se godine diljem Ujedinjenog Kraljevstva primjeni 3300 t izoproturona na 3 milijuna hektara poljoprivrednog zemljišta, što izoproturon čini najkorištenijim herbicidom u Velikoj Britaniji (Environment Agency, 2001). Zahvaljujući ekstenzivnoj upotrebi, izoproturon se svrstava u skupinu najznačajnijih onečišćivača rijeka, potoka, jezera, morskih ekosustava i podzemnih voda diljem Europe (Spliid i Køppen, 1998; Stangroom i sur., 1998; Gerecke i sur., 2001; Environment Agency, 2001). Kao rezultat njegovog opsežnog i intenzivnog korištenja, kao i njegove postojanosti te relativno niske adsorpcije, 2000. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu je 14% analiziranih uzoraka površinskih voda sadržavalo povišene koncentracije izoproturona, pri čemu su vrijednosti koncentracija prelazile dozvoljenih 0,1 $\mu\text{g/L}$ (Environment Agency, 2001), odnosno limitirane vrijednosti propisane Europskom direktivom o vodama. Štoviše, iste je godine izoproturon svrstan na 7. mjesto najznačajnijih onečišćivača detektiranih u površinskim i podzemnim vodama Ujedinjenog Kraljevstva (Environment Agency, 2001).

U Njemačkoj svake godine 30 t herbicida dospije u površinske vode, pri čemu prednjači izoproturon s 2 t godišnje. Da li će neki herbicid dospjeti u površinske vode ovisi o nekoliko glavnih čimbenika, poput karakteristika riječnog sliva i vodenih putova, pojavnosti i intenziteta oborina i naposljetku, količine herbicida koja se namjerava upotrijebiti (Berenzen i sur., 2005; Garmouma i sur., 1998). Koncentracije izoproturona mjerene u rijekama često fluktuiraju tijekom vremena. Müller i sur. (2002) navode kako se te vrijednosti koncentracija kreću između 0,05 i 23,18 $\mu\text{g/L}$, s medijanom od 0,21 $\mu\text{g/L}$. Visoke koncentracije herbicida obično su detektirane nakon obilnih i jakih kiša, kada se herbicid vrlo lako prenosi s oranica i poljoprivrednih površina u površinske vode, najčešće putem mehanizama površinskog otjecanja ili ispiranja (Kreuger, 1998).

Primjerice, koncentracije izoproturona u švicarskim rijekama dosežu vrijednosti od čak 8,4 µg/L, što uvelike premašuje dopuštenu vrijednost od 0,27 µg/L, postavljenu od strane švicarskog kriterija za kvalitetu vode za piće (CQC) (Chevre i sur., 2006; Balsiger i sur., 2007).

1.3. Utjecaj herbicida na makrofite i druge ne-ciljne vrste u vodenim ekosustavima

Tretiranjem usjeva, procesima oborinskog ispiranja, površinskog otjecanja te erozijom poljoprivrednog zemljišta, herbicidi s poljoprivrednih oranica mogu dospjeti u obližnje vodene ekosustave. Upravo su zbog toga slatkovodni ekosustavi često kontaminirani visokim koncentracijama herbicida (Mickelson i sur., 2001). Budući da je izoproturon jedan od najviše korištenih fenilurea herbicida u konvencionalnoj poljoprivrednoj proizvodnji, često je prisutan u vodenim ekosustavima i to u značajnim količinama. Povećane koncentracije izoproturona obično su zabilježene u proljeće, i to u periodu od ožujka do svibnja, kada se ovaj herbicid najčešće i upotrebljava, a oborine su česte i intenzivne (Nitschke i Schüssler, 1998). Isti su autori ukazali kako je herbicid izoproturon prisutan u više od $\frac{3}{4}$ uzoraka prikupljenih u postrojenjima za obradu otpadnih voda u ruralnim područjima te da njegova koncentracija doseže vrijednost od 42 µg/L. Međutim, samo je mali broj provedenih studija proučavao utjecaj i sudbinu izoproturona u slatkovodnim ekosustavima (Feurtet-Mazel i sur., 1996; Grollier i sur., 1997).

Vodena leća je vrlo pogodna ne-ciljna vrsta za proučavanje utjecaja herbicida na slatkovodne ekosustave. Ova je vrsta glavni predstavnik slatkovodnih plutajućih makrofita, a često je prisutna u malim vodenim tijelima. Biljke iz porodice *Lemnaceae* poznate su po toleriranju okolišnih stresnih čimbenika i iznimno velikoj sposobnosti akumulacije ksenobiotika. S druge strane, iznimno su osjetljive na različite parametre stresa (Mohan i Hosetti, 1999; Cleuvers i Ratte, 2002). Upravo su zbog tih osobina vodene leće pogodne vrste za brojna ekotoksikološka istraživanja (Hulsen i sur., 2002). Štoviše, poseban se naglasak stavlja na njihovu upotrebu u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda upravo zbog snažnog kapaciteta za uklanjanje organskih tvari i nutrijenata (Awuah i sur., 2004).

Za razliku od insekticida čiji je mehanizam toksičnosti na slatkovodne ekosustave dobro istražen i poznat, učinci herbicida i dalje su razmjerno nepoznati.

Vodene makrofite i alge najosjetljivija su skupina ne-ciljnih organizama, a imaju ključnu ulogu u normalnom funkcioniranju slatkovodnih ekosustava. Makrofite su ključne u stabilizaciji sedimenta, a njihova prisutnost utječe na brzinu sedimentacije čestica, protok vode, unos hranjivih tvari i recirkulaciju (Sand-Jensen i Krause-Jensen, 1997). Pružaju sklonište za vodene kukce, rakove i ribe, a ujedno služe kao hrana mikroorganizmima, puževima i ostalim vrstama. Makrofite i alge čine osnovu hranidbenih mreža i stoga su od ključne važnosti za funkcioniranje vodenih ekosustava (Wetzel, 1983).

Studije o učincima herbicida na ne-ciljne vrste u terestričkim ekosustavima su dokazale da čak i male doze herbicida u koncentraciji od 1% utječu na rast i reprodukciju biljaka (Boutin i sur., 2000; Bhatti i sur., 1995). Uzimajući u obzir da se raspon doze obično kreće od 1-10% na poljoprivrednim oranicama te 35% u voćnjacima unutar 10 m tretiranog područja te da se intenzivna poljoprivredna proizvodnja odvija na tlima koja su najčešće u blizini vodenih tijela, neizbježno je da će vodene makrofite biti izložene štetnim efektima herbicida. Međutim, dok su terestričke biljne vrste herbicidima izložene samo djelomično i najčešće tijekom definiranog perioda, vodene su makrofite izložene tijekom dugog vremenskog perioda, a osobito to vrijedi za biljke u stajaćim vodama. Upravo ovo povećanje područja izloženosti u kombinaciji s trajanjem perioda izloženosti herbicidu, čini vodene makrofite daleko više osjetljivijim od terestričkih biljaka (Cedergreen i Streibig, 2004).

Budući da se herbicid izoproturon vrlo brzo akumulira u akvatičkim makrofitama (Crum i sur., 1999), visoke stope bioakumulacije makrofita ukazuju na to kako i veoma niske koncentracije ovog herbicida pokazuju tendenciju zasićenja navedenih biljaka (Feurtet-Mazel i sur., 1996). Lipofilna svojstva navedenog herbicida rezultirala su većom stopom toksičnosti za akvatičke makrofite u odnosu na alge (Kirby i Sheahan, 1994).

Rezultati studija dobiveni izlaganjem algi roda *Chlorococcales* herbicidu monolinuronu, pokazuju kako EC₅₀ doseže vrijednost od 300 µg/L (Harrison i sur., 1987). Nadalje, Gatidou i Thomaidis (2007) su pokazali kako izloženost alge *Navicula forcipata* herbicidu diuronu u koncentraciji od 27 µg/L, uzrokuje inhibiciju rasta za 50%. Rezultati eksperimenta Tasmin i sur. (2013) dobiveni izlaganjem zelene alge *Pseudokirchneriella subcapitata* pokazuju kako EC₅₀ doseže vrijednost od 12,5 µg/L nakon 72 h izlaganja diuronu. Izloženost alge *Scenedesmus vacuolatus* herbicidu linuronu u koncentraciji od 22 µg/L, uzrokuje inhibiciju prirasta za 50% (Junghans i sur., 2006).

1.4. Pulsna izloženost herbicidima

Maksimalne koncentracije herbicida izmjerene u površinskim vodama često su prisutne samo u kratkom vremenskom periodu (Styczen i sur., 2003). Navedeni maksimumi koncentracija (pulsevi), obično su povezani s tretiranjem poljoprivrednih usjeva, površinskim otjecanjem (engl. *runoff*) i ispiranjem, pri čemu njihove koncentracije često mogu doseći vrijednosti od 1-10 $\mu\text{g/L}$. Vrijednosti koncentracija herbicida izmjerenih u stajaćim i podzemnim vodama kreću se u rasponu od 10-200 ng/L (Gilliom i sur., 1999; Sandbech, 2000). Vrlo je mali broj provedenih studija bio u mogućnosti otkriti potencijalno značajne učinke herbicida na ciljne organizme, pri koncentracijama manjim od 200 ng/L . Iznimke čine triazinski herbicid Irgarol[®] (Scarlett i sur., 1999), kao i potencijalni sulfonilurea herbicidi poput metsulfuron-metila, čiji se toksični učinak ispoljava i pri koncentracijama nižim od 1000 ng/L (Turgut i Fomin, 2002; Wendt-Rasch i sur., 2003). Koncentracije herbicida terbutilazina, metsulfuron-metila i linurona veće od 5 $\mu\text{g/L}$ snažno utječu na rast i proces fotosinteze u akvatičkim makrofitama i algama prilikom dugotrajnog izlaganja biljaka (4 dana ili više) (Cedergreen i sur., 2004; Kersting i Van Wijngaarden, 1999; Turgut i Fomin, 2002; Wendt-Rasch i sur., 2003). Stoga, pulsne koncentracije herbicida mogu dosegnuti razine potencijalno toksične za većinu akvatičkih makrofita. Dakle, postavlja se pitanje da li su pulsne koncentracije potencijalno štetne, ili je izloženost biljaka prekratka da bi značajnije utjecala na prirast i biomasu akvatičkih makrofita?

Do sada nisu načinjeni vremensko-ovisni toksikokinetički modeli metabolizma i kritičnih koncentracija herbicida u tkivima viših akvatičkih makrofita. Za razliku od procjene rizika učinkovitosti pulsne izloženosti herbicidima u animalnim tkivima (Reinert i sur., 2002), pretpostavlja se da učinak pulsne izloženosti biljaka herbicidima prvenstveno ovisi o: 1) stopi akumulacije herbicida u biljkama i 2) sposobnosti oporavka biljke nakon tretmana herbicidima. Herbicidi koji se brzo akumuliraju u biljnom tkivu pokazuju produženi učinak, za razliku od sporo-akumulirajućih herbicida, koji stoga ne bi mogli postići ravnotežno stanje između biljke i okoliša, prije nego pulsne koncentracije herbicida budu u opadanju.

Proces akumulacije herbicida uključuje 3 glavna mehanizma: 1) apsorpciju, 2) brzinu inaktivacije herbicida te 3) brzinu otpuštanja herbicida. Stopa inaktivacije i metabolizma svakog pojedinog herbicida je specifična (Komoša i sur., 1995). S druge strane, apsorpcija kao i brzine otpuštanja herbicida, prvenstveno ovise o lipofilnosti molekula samog spoja (Bromilow i Chamberlain, 1995).

Dakle, lipofilni će spojevi veoma lako i brzo difundirati u biljne stanice, za razliku od hidrofilnih spojeva, negativno nabijenih iona te neutraliziranih pozitivno nabijenih iona (Trapp, 1995; Trapp, 2000).

Drugi faktor koji se također smatra veoma važnim prilikom utvrđivanja učinkovitosti pulsne izloženosti herbicidima jest i stopa oporavka nakon pulsne izloženosti. Neke vrste staničnog oštećenja, poput raspada stanica uzrokovanog agresivnim ROS-om (engl. *Reactive Oxygen Species*), odvijaju se kontinuirano u biljnim tkivima. To je, dakle, svojevrsan primjer „ozljede“ za koje ne postoje učinkoviti mehanizmi popravka (Osmond, 1994). Nadalje, šteta uzrokovana neravnotežom koncentracija aminokiselina i akumulacije ugljikohidrata, javlja se kao posljedica djelovanja ALS-inhibitora (Royuela i sur., 2000), kao i posljedica dušičnog stresa. Međutim, unatoč poznavanju specifičnih mehanizama, kao i ciljnih mjesta djelovanja herbicida, kompletna kaskada učinka herbicida na fiziološke procese u akvatičkim makrofitama i dalje je nepoznata (Cobb, 1992; Devine i sur., 1993). Pretpostavlja se da vremenski period (trajanje izloženosti), kao i pulsna koncentracija imaju ključnu ulogu na učinkovitost pulsne izloženosti. Stoga je trajanje pulsne izloženosti fiksno, a samo koncentracije herbicida variraju. Postavljaju se stoga 2 ključna pitanja: 1) da li učinci pulsne izloženosti ovise o potencijalnoj stopi bioakumulacije i/ili mehanizmu djelovanja herbicida te 2) koliko je brzo vrijeme oporavka nakon nekoliko uzastopnih pulsne izloženosti?

Prijašnje su studije dokazale da je stopa rasta akvatičkih makrofita i algi tijekom pulsne izloženosti herbicidima izrazito smanjena. Međutim, uočeno je kako se stopa rasta blago povećava nakon samo jednog izlaganja (Cedergreen i sur., 2005; Drost i sur., 2003; Klaine i sur., 1997; Vallotton i sur., 2008). U potocima i rijekama, akvatičke makrofite, kao i ostala vodena flora nisu pod utjecajem jednog pulsne izlaganja. Upravo suprotno, biljke su izložene većem broju uzastopnih pulsne utjecaja (Müller i sur., 2002; Leu, 2003).

S druge strane, vrlo malo se zna o dugoročnim učincima uzastopnih pulsne izlaganja na akvatičke makrofite. Prema Reinert i sur. (2002), dugotrajni učinci izlaganja neciljnih organizama herbicidima mogu se opisati funkcijom čije su varijable: 1) šteta nastala nakon izlaganja, 2) kapacitet organizma za oporavak i 3) vremenski period trajanja oporavka između pulseva. Nadalje, sekvencijalna izloženost može dovesti do povećanog ili smanjenog učinka tijekom svakog narednog izlaganja, ovisno o ispitivanom organizmu i specifičnim mehanizmima djelovanja herbicida. Ako pulsna izloženost herbicidima ne utječe na odgovor narednog pulsa, uzastopna izloženost može se smatrati potpuno neovisnim procesom.

1.5. Značajke porodice *Lemnaceae*

Porodica *Lemnaceae* obuhvaća četiri roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*. Ova porodica je obično na margini botaničkih zanimljivosti budući da se ubrajaju u najjednostavnije i najmanje cvjetnice. Široko su rasprostranjene od tropskog do umjerenog klimatskog područja (Hillman, 1961), a služe kao hrana pticama močvaricama i malim životinjama te osiguravaju hranu, sklonište i sjenu vodenim organizmima (Wang, 1991). Filogenetski su jednosupnice. Porodica broji oko 40 kozmopolitski rasprostranjenih vrsta (Hillman i Culley, 1978), a odlikuju je tri važne karakteristike. Prva je poseban način vegetativnog razmnožavanja. Svaki listić ima dvije meristemske regije koje stvaraju nove listiće. Pri tome je važno naglasiti kako svaki listić može stvoriti 10–20 novih biljaka nakon čega tkivo matične biljke propada. Kao drugu karakteristiku treba istaknuti da listići ne ostaju trajno povezani s matičnom biljkom, već se odvajaju. Stoga kolonije vodene leće imaju svega nekoliko biljaka. Treća karakteristika uključuje značajnu progresivnu redukciju svih struktura koje nisu nužne za život na površini ili neposredno ispod površine vode te gotovo potpuno odsustvo drvenastog tkiva (Hillman i Culley, 1978). Za gotovo sve vrste iz porodice *Lemnaceae* poznato je da se razmnožavaju ne samo vegetativno, već i spolno, cvjetanjem i zametanjem plodova i sjemena u specifičnim uvjetima (Hillman i Culley, 1978). Vodene leće u prirodi žive na staništima čija se pH vrijednost vode kreće u rasponu od 3,5 do 10,5 (Landolt, 1986), međutim optimalna pH vrijednost ovisi o mnogim čimbenicima. Primjerice, da li je izvor dušika u obliku amonijaka ili nitrata te o dostupnosti mikroelemenata, što osim njihove koncentracije u hranjivoj otopini, ovisi i o nazočnosti helatnih tvari poput EDTA i Fe-citrata. Optimalna pH vrijednost kreće se u rasponu 6,5-7,8, dok je temperaturni optimum za većinu vrsta iz porodice *Lemnaceae* između 20 i 30 °C.

Vegetativnim razmnožavanjem osigurava se genetička homogenost organizama, a njihov brzi rast (30-40 h za novu biljku) te relativno jeftin i jednostavan način održavanja u kulturi *in vitro*, čini ovu porodicu pogodnim laboratorijskim subjektom u istraživanjima ekotoksikoloških učinaka raznih ksenobiotika. Najčešće se upotrebljavaju vrste *Lemna minor*, *Lemna gibba*, *Spirodela polyrrhiza* i *Wolffia arrhiza* (Les i sur., 2002).

1.5.1. Biologija i značajke vrste *Lemna minor* L.

Mala vodena leća (*Lemna minor* L.) je široko rasprostranjena (kozmpolitska), slobodno plutajuća jednosupnica, prisutna u mnogim slatkovodnim ekosustavima (Vidaković–Cifrek, 2007; Paczkowska i sur., 2007). Raste u vodi s visokom razinom nutrijenata, pH vrijednosti između 5 i 9 (optimalno 5,5–7,5) i temperaturi između 6 i 33 °C (Leng, 1999). Tolerira široki spektar ekoloških uvjeta čime se ubraja u eurivalentne vrste (Hillman i Culley, 1978). U prirodi je važna kao izvor hrane za mnoge ptice močvarice (posebice patke) i ribe (Wang, 1991). Jednostavne je građe. Jedna se biljka naziva članak (engl. *frond*). Nalikuje duguljastim listićima, duljine do 1 cm, a čine ga reducirana stabljika i list te korijen duljine do 5 cm, čije stanice sadrže kloroplaste. Uloga korijena je održavanje biljke u vodoravnom položaju. Sa svake strane užeg dijela članka, nalazi se reproduktivni džep unutar kojeg započinje proces vegetativnog razmnožavanja. Novonastale biljke mogu neko vrijeme ostati spojene s matičnom biljkom čineći koloniju. Hranjive tvari primaju se preko donje površine plutajućeg članka (Vidaković–Cifrek, 2007). Za potrebe laboratorijskih istraživanja, biljke se najčešće uzgajaju na tekućim hranjivim podlogama u kontroliranim uvjetima temperature i osvjetljenja (Slika 3).



Slika 3. Kultura *L. minor* u Erlenmeyerovoj tikvici (foto: M. Moslavac).

Svojstva zbog kojih je mala vodena leća pogodna za ekotoksikološka istraživanja su:

- jednostavna građa,
- brzo vegetativno razmnožavanje čime se osigurava genetička homogenost biljaka,
- lagan uzgoj na tekućim hranjivim podlogama,
- mali prostor potreban za uzgoj,
- malih je dimenzija, ali istodobno dovoljno velika da se morfološke promjene mogu promatrati golim okom,
- velika osjetljivost na razne ksenobiotike (Vidaković–Cifrek 2007; Wang, 1986; Radić i Pevalek–Kozlina, 2010; Scherr i sur., 2008).

1.6. Laboratorijski testovi toksičnosti (*Lemna*-test)

Vodne se leće veoma lako uzgajaju i održavaju u kulturi *in vitro*. Osim toga, malih su dimenzija i jednostavne građe te imaju vegetativni način razmnožavanja kojim nastaju genetički identične biljke (klonovi). Pri tome valja spomenuti da upijaju toksikante iz hranjive otopine ne samo korijenom, već cijelom donjom površinom listića. Zbog ovih se osobina često koriste kao modelne biljke u laboratorijskim istraživanjima (Naumann i sur., 2007; Zhang i sur., 2010). Tijekom izvođenja laboratorijskih testova biljke se uzgajaju na tekućim hranjivim podlogama u kontroliranim uvjetima temperature i osvjetljenja, a trajanje eksperimenta je od nekoliko sati do nekoliko dana.

Razvijeno je nekoliko standardiziranih protokola za testiranje štetnog djelovanja teških metala, herbicida, pesticida i organskih onečišćivača u kojima se koriste vrste iz porodice *Lemnaceae*. OECD *Lemna*-test (2006) protokol razvijen je za testiranje određenih tvari i proizvoda. S druge strane, ISO protokol razvijen je za testiranje okolišnih uzoraka u kojima se testira štetno djelovanje kombinacije onečišćivača. Oba se protokola temelje na inhibiciji rasta biljaka u periodu od sedam dana.

Prednosti laboratorijskih testova koji se izvode na biljkama koje rastu u kulturi su sterilni i dobro definirani uvjeti kultivacije te neovisnost o godišnjem dobu, klimi i temperaturi. Tvari čiji se učinak želi ispitati dodaju se u hranjivu otopinu i na temelju rasta i razvoja biljaka procjenjuje se učinak ili toksičnost ispitivanih tvari (Lewis, 1995; Wang 1990).

Najčešće mjereni parametar u *Lemna*-testu je prirast broja biljaka, gdje se u određenim vremenskim intervalima broji svaka vidljiva biljka (Wang, 1991). Štoviše, *Lemna*-testom procjenjuje se učinak testiranih tvari i na temelju morfoloških promjena biljaka.

Pri upotrebi vodene leće kao testnog organizma može se pratiti čitav niz pokazatelja učinaka istraživanih tvari kao što su stopa preživljavanja biljaka, duljina korjenčića, ultrastrukturne promjene, prirast mase svježe tvari, udio suhe tvari, ukupna površina biljaka, odnos površine biljaka i mase svježe tvari, stopa disanja, fotosintetska aktivnost, sadržaj fotosintetskih pigmenta, koncentracija ukupnih proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima kao i pojava stresnih proteina (Vidaković–Cifrek, 2007). Laboratorijski se testovi mogu izvoditi na tri načina: 1) kao statični (bez izmjene hranjive otopine), 2) test s periodičnim obnavljanjem hranjive otopine i 3) kao protočni testovi (uz kontinuiranu izmjenu hranjive otopine tijekom eksperimenta). Statični su testovi jednostavniji i ekonomičniji (Wang, 1990).

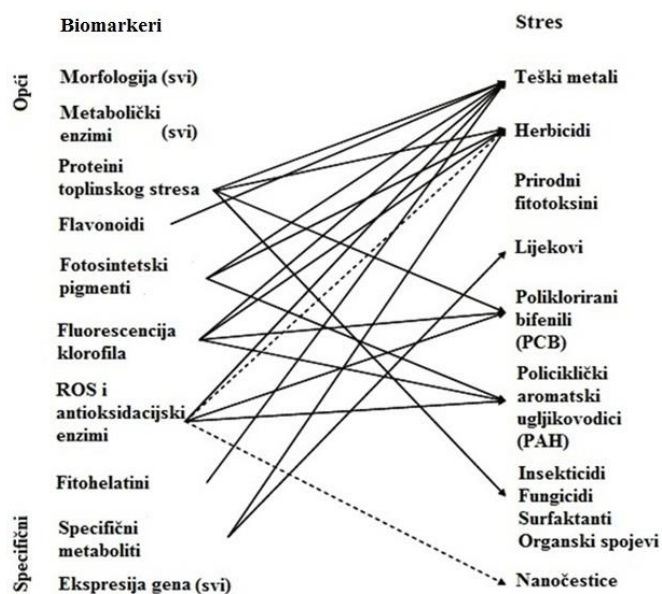
Standardni laboratorijski testovi toksičnosti temelje se na konstantnim uvjetima izlaganja ciljnih organizama s različitim periodima trajanja izloženosti ksenobioticima. Stoga, ovakav pristup ne može pružiti izrazito točnu i pravu procjenu učinkovitosti nekog ksenobiotika na ciljne akvatičke organizme u „stvarnom“ ekosustavu. Trenutno je u upotrebi nekoliko različitih pristupa za procjenu učinaka izloženosti organizama ksenobioticima u stvarnim uvjetima okoliša. Navedeni pristupi uključuju formiranje i proučavanje organizama u svojevrsnom mikrokozmosu, ili upotrebu jednog ciljnog organizma s ciljem oponašanja scenarija izloženosti ksenobioticima kakav postoji u stvarnom okolišu ili ekosustavu (Boxall i sur., 2002).

1.7. Ekotoksikološki molekularni biomarkeri u akvatičkim makrofitama

Definicija, terminologija, kao i primjena molekularnih biomarkera u kontekstu procjene rizika za okoliš, i dalje nije u potpunosti posve jasna. Biomarkeri izloženosti definirani su kao bilo koja funkcionalna mjera izloženosti karakterizirana na nivou organizacije sub-organizama, a predstavljaju mjerljivi biološki odgovor potaknut izloženošću organizma tvarima u okolišu (Adams i sur., 2001). Nasuprot tome, biomarkeri djelovanja obuhvaćaju biokemijske, fiziološke ili ekološke strukture i mehanizme koji su međusobno povezani ili su uzročno povezani s biološkim učincima definiranim na jednom ili više nivoa biološke organizacije (McCarty i Munkittrick, 1996). Ekotoksikološki biomarkeri ključni su za procjenu rizika u akvatičkim ekosustavima (Ernst i Peterson, 1994). Međutim, biomarkeri sami po sebi ne mogu ponuditi cjelovito rješenje problema. Samo multiparametarski pristup, kao i upotreba nekih fizioloških biomarkera, biomarkera stresa te specifičnih biomarkera mogu primjereno doprinijeti ekotoksikološkoj dijagnostici (Ferrat i sur., 2003). Forbes i sur. (2006) naglašavaju kako su biomarkeri potencijalno korisni za testiranje hipoteza o mehanizmima djelovanja ksenobiotika na različitim razinama biološke organizacije. Budući da se ekotoksikologija isključivo temelji na procjeni rizika od ksenobiotika na populacije organizama te njihove zajednice i ekosustave, a samo u rijetkim slučajevima obuhvaća pojedinačne vrste, odgovor biomarkera mora biti čvrsto i dosljedno povezan s odgovorima organizama na višim nivoima biološke organizacije, i to osobito ako se biomarkeri koriste kao pokazatelji učinka (Forbes i sur., 2006). Biomarkeri kao predmeti istraživanja u akvatičkim makrofitama su relativno malo zastupljeni u znanstvenoj literaturi (Ernst i Peterson, 1994; Ferrat i sur., 2003). Bez obzira na to, biljni biomarkeri pokazali su se kao izrazito korisni agensi biomonitoringa. Akutno stanje, brzina rasta i prirast suhe ili svježe biomase, morfološki simptomi poput kloroze ili nekroze tkiva, samo su neki od pokazatelja toksičnosti testiranih ksenobiotika (Davy i sur., 2001). Međutim, budući da se toksičnost u biljkama najprije očituje na molekularnoj razini, a tek kasnije i na razini cijelog organizma, parametri biokemijskih učinaka mogu biti raniji pokazatelji stresa uzrokovanog ksenobioticima (Davy i sur., 2001). Efekti na molekularnoj razini obično su više osjetljiviji, iako njihova ekološka važnost i korelacija s drugim parametrima, poput biomase, ne mora uvijek biti izražena (Davy i sur., 2001). Ernst i Peterson (1994) naglašavaju kako se biomarkeri trebaju temeljiti na morfološkim parametrima koji omogućuju rano otkrivanje ksenobiotičkog stresa u ovisnosti o dozi ili periodu izlaganja. Štoviše, za točnu percepciju metaboličkih signala od ključne je važnosti upravo poznavanje mehanizama djelovanja ksenobiotika (Ernst i Peterson, 1994).

Prema tome, odabir biomarkera u ekotoksikološkim istraživanjima treba se temeljiti upravo na molekularnim ili fiziološkim procesima potaknutim od strane toksikanta (Ernst i Peterson, 1994). Uobičajena procjena biokemijskih mehanizama ključan je pokazatelj biološke relevantnosti u cijelom spektru bioloških sustava. Ako biokemijski učinak ne može biti povezan s učincima na morfološkoj razini, upitna je njegova vrijednost za daljnju ekotoksikološku dijagnostiku.

Budući da biljke sintetiziraju organske spojeve apsorpcijom svjetlosne energije u procesu fotosinteze, čak i veoma slabi poremećaji u radu fotosintetskog sustava mogu potaknuti aktivaciju pobuđenih elektrona. Takvo stanje rezultirat će stvaranjem ROS-a i aktivacijom odgovarajućih antioksidacijskih enzima. Stvaranje ROS-a direktno utječe na koncentraciju fotosintetskih pigmenata u kloroplastima i fotosintetsku učinkovitost koja je temeljna za rast biljaka. Upravo se zbog toga učinak ksenobiotika i toksičnog stresa na biljke može mjeriti promjenama u aktivnosti enzimskih komponenti antioksidacijskog sustava. Na slici 4 nalazi se popis biomarkera prikladnih za procjenu stresa uzrokovanog pojedinim ksenobioticima.



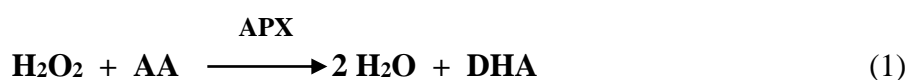
Slika 4. Dendrogramski prikaz biomarkera prikladnih za procjenu ksenobiotičkog stresa. Pуне strelice sugeriraju na jaku, dok točkaste strelice ukazuju na slabu povezanost. Ovaj dendrogramski prikaz ne uključuje sva područja primjene biomarkera, već se temelji na prikazu specifične skupine onečišćivača koji se najčešće otkrivaju pomoću pogodnog biomarkera. Oznaka (svi) označava da je biomarker potencijalno prikladan za sve tipove ksenobiotičkih stresora (modificirano prema Brain i Cedergreen, 2009).

Budući da različiti ksenobiotički stresori mogu utjecati na stvaranje specifičnih metaboličkih produkata, analizom metabolita nastalih u poremećenim biokemijskim mehanizmima, moguće je dobiti više informacija o prirodi samog ksenobiotika, a time i omogućiti i bolje shvaćanje korelacije između ciljnog biomarkera i biološkog učinka (Ernst i Peterson, 1994). Prilikom procjene učinaka onečišćenja ksenobiotikom na metaboličke putove u biljkama, izravno određivanje aktivnosti ciljnog enzima ili promjene koncentracije metabolita pružaju najveću dijagnostičku razlučivost. Štoviše, promjene koncentracija metabolita predstavljaju osnovu za određivanje svih ostalih učinaka induciranih stresorom. Eksperimenti temeljeni na ispitivanju učinaka herbicida na biljke najbolje ilustriraju korisnost antioksidacijskih enzima ili metabolita kao specifičnih bioloških biomarkera osjetljivosti.

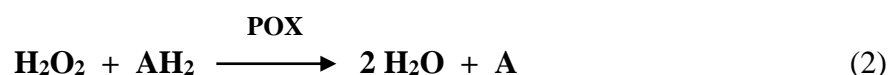
Diferencijalni antioksidacijski odgovori na specifične tretmane ksenobiotikima ukazuju kako stvaranje različitih ROS-a može uvelike varirati između pojedinih onečišćivača. Indukcija ili smanjenje aktivnosti određenih antioksidacijskih enzima može ukazivati koje su vrste ROS-a odgovorne za određeni učinak u biljkama. Procjena stvaranja ROS-a i antioksidacijskih enzima ujedno može pridonijeti boljem shvaćanju specifičnih mehanizama djelovanja ksenobiotika.

1.7.1. Antioksidacijski enzimi kao ekotoksikološki molekularni biomarkeri

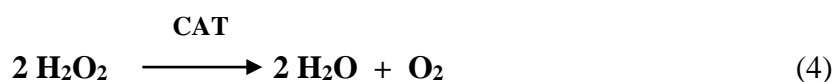
Askorbat-peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase* – APX, EC 1.11.1.11) jedan je od ključnih antioksidacijskih enzima te ima esencijalnu ulogu u uklanjanju ROS-a i zaštiti stanica kod viših biljaka, algi, euglena i drugih organizama. APX je uključena u reakcije uklanjanja H₂O₂ u askorbat-glutationskom ciklusu koristeći pritom askorbat kao elektron donor (Gill i Tuteja, 2010). Reakcija koju katalizira je prijenos elektrona s askorbata na peroksid, stvarajući dehidroaskorbat i vodu kao produkte (Raven, 2000) (1). APX ima veći afinitet za H₂O₂ nego CAT (μM raspon koncentracije) i GPOX (mM raspon koncentracije) i zbog toga ima ključnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru i pri nižim koncentracijama H₂O₂ (Gill i Tuteja, 2010).



Gvajakol-peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase* – GPOX, EC 1.11.1.7) pripada biljnim peroksidazama skupine III (Mathé i sur., 2010). Peroksidaze III imaju važnu ulogu u obrani biljnih stanica od štetnoga djelovanja ROS-a. Ovi su enzimi glikoproteini koji sadrže hem u strukturi i sudjeluju u brojnim fiziološkim procesima u biljkama: katabolizam auksina, promjene stanične stijenke (lignifikacija, suberinizacija), zacjeljivanje rana, sustav obrane (Gaspar i sur., 1991, Asada 1999). Peroksidaza također sudjeluje i u nadziranju razine H₂O₂ i štite stanice od štetnoga utjecaja oksidacijskoga stresa (del Rio i sur., 1998). Peroksidaze kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije između H₂O₂ i različitih reduktanata (2). GPOX razgrađuje indol-3-ocetenu kiselinu (IAA) te ima ulogu u biosintezi lignina i obrani biljnih stanica od biotičkoga stresa (Asada, 1999). GPOX preferira aromatske elektron donore kao što su gvajakol i pirogalol (Asada, 1999). Oksidacijom gvajakola u prisutnosti H₂O₂ i GPOX nastaje tetragvajakol, spoj žuto-smeđe boje (3). Aktivnost GPOX značajno varira ovisno o biljnim vrstama te stanju stresa (Milone i sur., 2003).



Katalaza (engl. *catalase* – CAT, EC 1.11.1.6) ili H₂O₂-oksidoreduktaza je tetramerni enzim, građen od četiriju polipeptidnih lanaca, svaki sadrži preko 500 aminokiselina i ima molekularnu masu od 60 kDa (Halliwell i Gutteridge, 2007). Svaki lanac sadrži atom Fe u svom aktivnom mjestu. U većini eukariotskih stanica CAT je primarno lokalizirana u peroksisomima (Subramani, 1993) u kojima se odvija nekoliko ključnih metaboličkih procesa kao što su β-oksidacija masnih kiselina, sinteza kolesterola, metabolizam purina, poliamina, aminokiselina (Singh, 1997). CAT katalizira razlaganje vodikovoga peroksida (H₂O₂) na vodu (H₂O) i kisik (O₂) neophodna za detoksikaciju ROS-a (Mittler, 2002) (4). Jedna molekula CAT može reducirati oko 6 milijuna molekula H₂O₂ u jednoj minuti stoga ovaj enzim predstavlja neizostavnu komponentu antioksidacijskoga obrambenog sustava (Gill i Tuteja, 2010).



1.8. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj različitih koncentracija herbicida izoproturona na rast male vodene leće *Lemna minor* L., zatim na koncentraciju fotosintetskih pigmenata i proteina te na aktivnost antioksidacijskih enzima kao ekotoksikoloških biomarkera štetnog djelovanja ksenobiotika. Također je uspoređeno djelovanje herbicida izoproturona na malu vodenu leću pri kontinuiranom izlaganju u periodu od 21 dan te pulsnim izlaganjima (tri izlaganja sa po dva dana tretmana i pet dana oporavka te tri dana tretmana izoproturonom i četiri dana oporavka u čistoj hranjivoj otopini).

2. Materijal i metode

2.1. Kultura vodene leće (*Lemna minor* L.)

Mala vodena leća, *Lemna minor* korištena u ovom eksperimentu uzorkovana je u drenažnim kanalima istočne Hrvatske. Prilikom uvođenja vodene leće u kulturu *in vitro* 2006. godine, biljke su sterilizirane etanolom i živinim kloridom postupkom po Krajnčić i Devidé (1980) i dalje kultivirane u sterilnim uvjetima u Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Za dugotrajnu kultivaciju vodene leće korištena je Pirson-Seidel (PS) hranjiva otopina (Pirson i Seidel, 1950) čiji je sastav prikazan u tablici 2. Nakon pripreme, hranjivoj je otopini podešena pH na vrijednost 4,55 te su otopine sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,1 MPa. Biljke su uzgajane u uvjetima dugog dana pri fotoperiodu od 16 sati svjetla i 8 sati tame, količini svjetlosti od 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i temperaturi od 25 ± 1 °C u uzgojnoj odnosno klimakomori. Kulture su održavane redovnim presađivanjem u razmaku od četrnaest dana uz praćenje broja biljaka, da bi se osiguralo vrijeme udvostručenja broja biljaka manje od 60 h (OECD, 2006). Prilikom presađivanja biljaka prebačena je jedna zdrava kolonija u Erlenmeyerovu tikvicu sa svježom sterilnom hranjivom otopinom.

Tablica 2. Sastav modificirane tekuće hranjive otopine po Pirsonu i Seidlu (1950).

Makroelementi	mg/L	mmol/L
KNO ₃	445	4,41
KH ₂ PO ₄	200	1,47
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	300	1,21
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	804	5,46
Mikroelementi	mg/L	mmol/L
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,3	0,0015
H ₃ BO ₃	0,5	0,0081
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	18,6	0,049
Fe-citrat	5	0,02
Organski dodaci	mg/L	mmol/L
Saharoza	10	29,2
Asparagin	0,1	0,66

2.2. Utjecaj herbicida izoproturona na vodenu leću

Za određivanje utjecaja izoproturona na vodenu leću, pojedinačne zdrave kolonije s 3-4 listića (engl. *frond*) presađene su na hranjivu otopinu po Steinbergu (1946) čiji je sastav prikazan u tablici 3. Period prilagodbe biljaka na novu hranjivu otopinu trajao je 14 dana pri čemu su biljke uzgajane u uvjetima temperature od 25 ± 1 °C te količini svjetlosti od $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tablica 3. Sastav modificirane tekuće hranjive otopine po Steinbergu (1946).

Makroelementi	mg/L	mmol/L
KNO ₃	350	3,46
KH ₂ PO ₄	90	0,66
K ₂ HPO ₄	12,6	0,072
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	100	0,41
Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	295	1,25
Mikroelementi	mg/L	mmol/L
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	180	0,91
H ₃ BO ₃	120	1,94
Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O	1500	4,03
Fe-citrat	760	2,81
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	44	0,18
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	180	0,63

Za utvrđivanje utjecaja herbicida izoproturona na malu vodenu leću, korišten je pripravak Isoproturon PESTANAL[®] (Sigma-Aldrich, čistoća 99,8%). Biljke su tretirane herbicidom u koncentracijama 50, 100, 150 i 200 $\mu\text{g/L}$. Kontrolne biljke uzgajane su u istim uvjetima, ali bez tretmana herbicidom. Za pripremu svih testnih otopina herbicida izoproturona korištena je matična otopina pripremljena u metanolu. S ciljem utvrđivanja potencijalnog fitotoksičnog utjecaja navedenog organskog otapala pripremljene su kontrolne otopine metanola bez dodatka herbicida te su testirane u istim uvjetima.

Istražena su tri eksperimentalna uvjeta izloženosti biljaka herbicidu izoproturonu:

2d-puls - na početku eksperimenta biljke su izložene herbicidu u periodu od dva dana, nakon čega su presađene na čistu hranjivu otopinu. Zatim je slijedio oporavak biljaka u vremenu od pet dana. Isti je postupak ponovljen još dva puta tijekom čitavog perioda trajanja eksperimenta,

3d-puls - na samom početku eksperimenta biljke su izložene izoproturonu u periodu od tri dana, nakon čega su prebačene na čistu hranjivu otopinu bez dodatka herbicida. Nakon toga uslijedio je oporavak biljaka u trajanju od 4 dana,

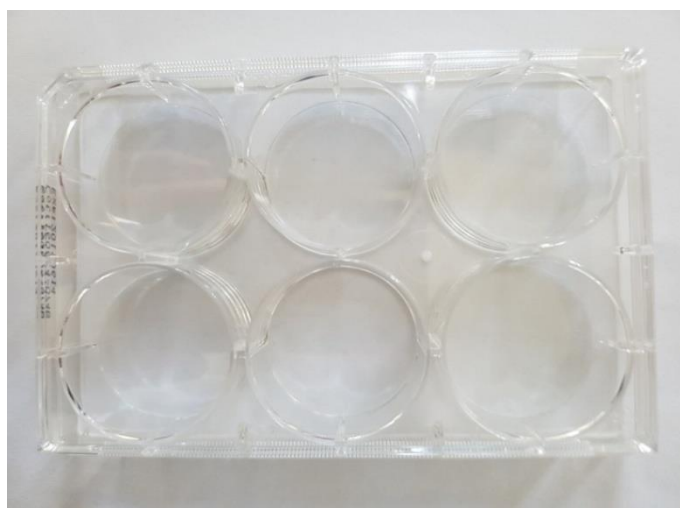
kontinuirano izlaganje - biljke su izložene herbicidu izoproturonu kontinuirano tijekom čitavog perioda trajanja eksperimenta.

Za sva tri uvjeta izloženosti male vodene leće herbicidu izoproturonu, ukupni period trajanja eksperimenta iznosio je 21 dan.

S ciljem sprječavanja moguće limitiranosti prostorom, čime bi se povećala stopa kompetitivnosti biljaka za osvjetljenje, od ključne je važnosti bilo tjedno uvođenje subkulture presađivanjem istog broja biljaka kao i na početku eksperimenta na svježe pripremljene testne otopine. Time se eksperiment mogao i dalje nesmetano odvijati.

2.2.1. Utjecaj izoproturona na rast biljaka

Za praćenje utjecaja herbicida izoproturona na rast *L. minor*, biljke su uzgajane i tretirane u plastičnim komoricama (Jet Bio-Filtration) sa šest jažica. Pritom je u svaku pojedinu jažicu dodano 10 mL hranjive otopine svih testnih koncentracija herbicida (Slika 5).



Slika 5. Plastična komorica za uzgoj biljaka (foto: M. Moslavac).

2.2.1.1. Prirast broja biljaka

Prirast (μ) broja biljaka određivao se svakodnevnim prebrojavanjem svih biljaka koje su vidljive golim okom. Dobiveni podatci uvršteni su u jednadžbu br. (5) (OECD, 2006):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (5)$$

pri čemu je:

μ_{i-j} - specifični prirast u vremenskom intervalu od i do j (dan^{-1})

N_i - broj biljaka u trenutku i

N_j - broj biljaka u trenutku j

t_i - početni trenutak eksperimenta (0)

t_j - konačni dan mjerenja (1,2,3..., 21).

2.2.1.2. Određivanje inhibicije prirasta broja biljaka

Inhibicija prirasta broja biljaka (%) izračunata je za svaku testnu koncentraciju izoproturona u hranjivoj otopini prema jednadžbi br. (6) (OECD, 2006):

$$\% I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100 \quad (6)$$

pri čemu je:

$\% I_r$ – postotak inhibicije prirasta broja biljaka (za svaki mjereni pokazatelj rasta)

μ_c – srednja vrijednost prirasta broja biljaka u kontrolnoj skupini

μ_T – srednja vrijednost prirast broja biljaka u tretmanu.

2.2.1.3. Prirast svježe mase biljaka

Ukupna svježa masa biljaka određena je vaganjem ukupnog uzorka biljaka iz jedne jažice nakon 21 dan tretmana biljaka različitim koncentracijama izoproturona. Neposredno prije vaganja biljke su posušene papirnatim ubrusom. Dobiveni su podatci potom uvršteni u jednadžbu br. (7) (OECD, 2006):

$$\mu_m = \frac{\ln(m_j) - \ln(m_i)}{t_j - t_i} \quad (7)$$

pri čemu je:

μ_m - specifični prirast svježe ili suhe mase biljaka (dan^{-1})

m_i - svježa ili suha masa biljaka na početku tretmana (0. dan)

m_j - svježa ili suha masa biljaka na kraju tretmana (21. dan)

t_i - početni trenutak eksperimenta (0. dan)

t_j - konačni dan mjerenja (21. dan)

2.2.1.4. Prirast suhe mase biljaka

Suha masa biljaka određena je vaganjem mase svježe tvari koja je zatim sušena 24 sata u sušioniku na $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ te nakon sušenja ponovno izvagana. Dobivene su vrijednosti mase potom uvrštene u jednadžbu br. (3).

2.2.2. Utjecaj izoproturona na koncentraciju fotosintetskih pigmenata, proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima

Za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata, enzimskih antioksidansa te proteina, biljke su uzgajane i tretirane u Petrijevim zdjelicama. Pri tome je u svaku zdjelicu dodano 50 mL hranjive otopine svih testnih koncentracija herbicida izoproturona, a korišteno je 12 replika po tretmanu.

U svaku su Petrijevu zdjelicu presađene pojedinačne zdrave kolonije s 3-4 fronda *L. minor*. Pri tome je važno naglasiti kako su biljke uzgajane u klima-komori u uvjetima temperature od 25 ± 1 °C te količini svjetlosti od $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2.2.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata biljno je tkivo usitnjeno do finoga praha u tekućem dušiku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (MgHCO_3). Oko 0,1 g usitnjenog tkiva odvagano je u prethodno izvagane i označene plastične kivete volumena 2 mL te je određena točna masa. Pigmenti su potom ekstrahirani 15 minuta na ledu uz dodatak 1 mL hladnog acetona. Nakon ekstrakcije centrifugirani su 10 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4 °C. Supernatant je potom dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom na navoj, a na talog je ponovno dodano 1 mL acetona. Postupak reekstrakcije ponovljen je još nekoliko puta, do potpunoga obezbojenja biljnog tkiva u talogu. Volumen supernatanata izmjeren je menzutom. Ekstrakt je pretočen u staklenu kivetu te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri valnim duljinama od 470, 644,8 te 661,6 nm. Koncentracije fotosintetskih pigmenata izračunate su prema formulama (8, 9, 10 i 11) uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaler-u (1987) te su izražene u mg/g svježe tvari:

$$Chla = \frac{(11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) \times V}{m \times 10^3} \quad (8)$$

$$Chlb = \frac{(20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}) \times V}{m \times 10^3} \quad (9)$$

$$Chla+b = \frac{(7,05 \times A_{661,6} + 18,09 \times A_{644,8}) \times V}{m \times 10^3} \quad (10)$$

$$Car = \frac{[103 \times A_{470} - 1,9(11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) - 63,14(20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6})] \times V}{214 \times m \times 10^3} \quad (11)$$

pri čemu je:

A_{470} - apsorbancija uzorka pri 470 nm

$A_{644,8}$ - apsorbancija uzorka pri 644,8 nm

$A_{661,6}$ - apsorbancija uzorka pri 661,6 nm

V - ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u mL

m - masa uzorka za ekstrakciju u gramima.

2.2.3. Određivanje koncentracije proteina i aktivnosti antioksidacijskih enzima

2.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina

Biljni je materijal, nakon ispiranja destiliranom vodom i sušenja papirnatim ubrusima, prebačen u porculanski tarionik te usitnjen u tekućem dušiku uz dodatak polivinil piroolidona (PVP). PVP u ekstrakciji veže polifenole koji bi mogli stvarati probleme prilikom mjerenja aktivnosti enzima. Usitnjeno tkivo prebačeno je u prethodno izvaganu plastičnu kivetu. Masa svježe tvari potrebna za ekstrakciju topljivih proteina iznosila je oko 0,2 g. Biljno je tkivo potom ekstrahirano dodatkom 1 mL ekstrakcijskog pufera (0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 , 5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA; pH 7,0) tijekom 15 minuta na ledu. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 20000 g pri temperaturi 4 °C. Nakon toga je supernatant odvojen u čistu kivetu, a preostali talog reekstrahiran dodatkom 1 mL istog pufera. Spojeni supernatanti korišteni su kao sirovi ekstrakt za određivanje koncentracije proteina te aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze i katalaze. Za svaki je tip uzoraka proteinski ekstrakt pripremljen u 3 ponavljanja. Koncentracija proteina u uzorcima određena je spektrofotometrijskom metodom prema Bradford-u (1976). Navedena se metoda temelji na pomaku maksimuma apsorbancije od 465 do 595 nm zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Coomassie Brilliant Blue*, CBB) na proteine. Koncentracija proteina svakog pojedinog uzorka izračunata je pomoću baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrijeđenja albumina iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija. Konačna koncentracija proteina izražena je u jedinici mg/g sv. tv.. Bradford radna otopina sastoji se od 95%-tnog etilnog alkohola, 88%-tne ortofosforne kiseline, Bradford matične otopine i destilirane vode. Za Bradford matičnu otopinu 87,5 mg CBB G-250 otopi se u 25 mL 95%-tnog etilnog alkohola i doda 50 mL 88%-tne ortofosforne kiseline.

2.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze

Aktivnost enzima askorbat-peroksidaza (APX; EC 1.11.1.11) određena je metodom prema Nakano i Asada (1981). Reakcijska je smjesa sadržavala 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA, 5 mM askorbinske kiseline i 12 mM H_2O_2 (pH 7,0). U kivetu od kvarcnog stakla dodano je pritom 1790 μL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA, 20 μL askorbinske kiseline, 180 μL proteinskog ekstrakta i 10 μL H_2O_2 . Smanjenje apsorbancije praćeno je pri 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Svaki uzorak izmjeren je u triplikatu te je za konačan izračun aktivnosti prema priloženoj jednadžbi (12) korištena srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost enzima (APX_u) prikazana je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježje tvari.

$$\Delta A_{290} = \frac{X \times Y \times V_u}{m \times V_a [\text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{sv.tv.}]} \quad (12)$$

pri čemu je:

X - srednja vrijednost razlika u promjeni apsorbancije u određenom vremenskom intervalu

Y - faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije u minuti

V_u - ukupni volumen proteinskog ekstrakta

m - masa svježje tvari (izražena u gramima)

V_a - volumen mjerenog alikvota proteinskog ekstrakta.

Specifična aktivnost askorbat-peroksidaze (APX_s) određena je kao kvocijent APX_u i koncentracije proteina te je izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$

2.2.3.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPOX; EC 1.11.1.7) određena je metodom prema Siegel i Galston (1967). Reakcijska je smjesa sadržavala 5 mM gvajakola, 0,2 M KH_2PO_4 , 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i 5 mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. Na 980 μL reakcijske smjese dodano je 20 μL ekstrakta proteina te je povećanje apsorbancije mjereno pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom dvije minute. Svaki uzorak mjereno je u triplikatu i za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije (12). Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOX_u) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GPOX_s) određena je kao kvocijent GPOX_u te koncentracije proteina i pritom je izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.2.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima katalaze

Aktivnost enzima katalaze (CAT; EC 1.11.1.6) određena je praćenjem promjene apsorbancije zbog smanjenja količine H_2O_2 metodom prema Aebi (1984). Reakcijska se smjesa sastojala od 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 i 0,01 M H_2O_2 . Reakcija je započeta dodatkom 50 μL sirovog ekstrakta proteina u 1950 μL reakcijske smjese te je promjena apsorbancije mjerena pri valnoj duljini od 240 nm svakih 10 sekundi tijekom jedne minute. Svaki uzorak mjereno je u triplikatu, a za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost enzima katalaze (CAT_u) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari (12). Specifična aktivnost (CAT_s) određena je kao kvocijent CAT_u i koncentracije proteina te izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.3. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Prilikom statističke obrade podataka korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA). Značajnost razlike primijenjenih tretmana herbicidom u odnosu na kontrolu ispitana je LSD *post hock* testom (engl. *least significant difference*). Kontrolu predstavljaju biljke koje su rasle u hranjivoj otopini s odgovarajućom koncentracijom metanola. Za izračun IC₅₀ vrijednosti, za svaki mjereni pokazatelj rasta, koristile su se doza odgovor krivulje na kojima su prikazani odnosi inhibicije rasta i logaritamske vrijednosti testiranih koncentracija izoproturona. Za statističku obradu podataka korišten je računalni program STATISTICA 12 (StatSoft Inc., SAD).

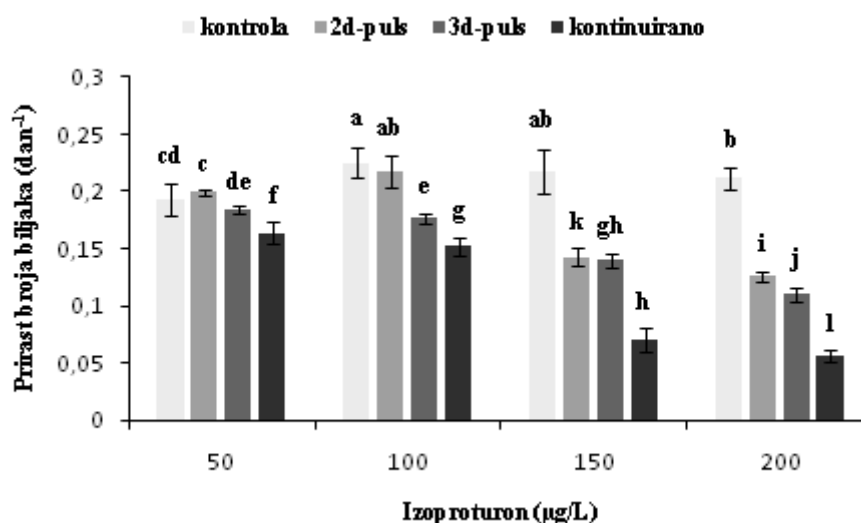
3. Rezultati

3.1. Utjecaj izoproturona na vodenu leću

3.1.1. Utjecaj izoproturona na rast biljaka

3.1.1.1. Utjecaj izoproturona na prirast broja biljaka

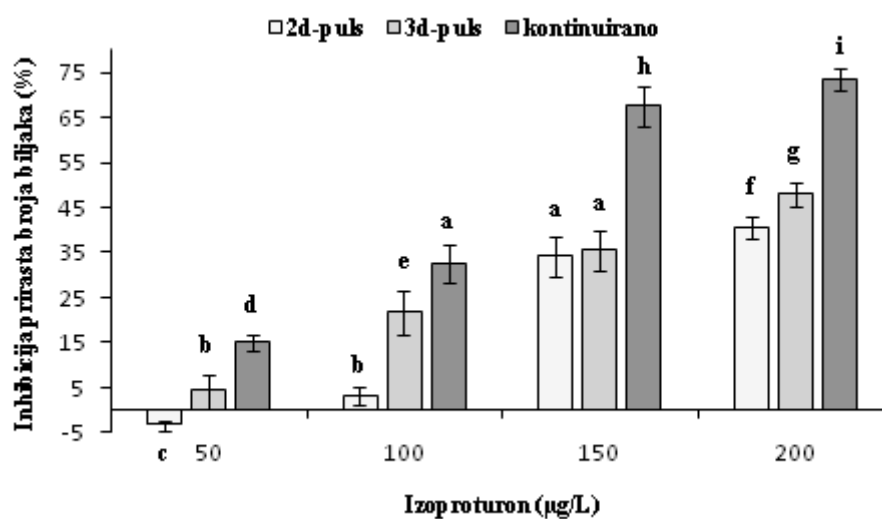
Prema rezultatima analize varijance ($F=170,05$; $P<0,01$) prirast broja biljaka *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u hranjivoj otopini, značajno se razlikovao od prirasta kontrolnih biljaka (Tablica 4). Statistički značajne razlike u prirastu broja biljaka nisu utvrđene samo kod biljaka tretiranih s 50 i 100 $\mu\text{g/L}$ izoproturona u 2d-pulsu. Nadalje, jednosmjerna analiza varijance je također pokazala statistički značajne razlike smanjenja prirasta broja biljaka u 3d-puls i kontinuiranom tretmanu izlaganja (Slika 6). Najznačajnije djelovanje svih testiranih koncentracija izoproturona utvrđeno je upravo pri kontinuiranoj izloženosti biljaka.



Slika 6. Prirast broja biljaka (dan^{-1}) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti biljaka (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Maksimalna inhibicija prirasta broja biljaka dosegla je vrijednost od $73,31 \pm 2,40\%$ u kontinuiranom tretmanu pri koncentraciji od $200 \mu\text{g/L}$ ispitivanog herbicida. Ista je koncentracija izoproturona uzrokovala statistički značajnu inhibiciju prirasta broja biljaka u 2d-pulsu ($40,60 \pm 2,51\%$), kao i u 3d-pulsu ($47,94 \pm 2,69\%$) u odnosu na pripadajuću kontrolu.

Međutim, važno je naglasiti kako je ta inhibicija bila značajno manja od inhibicije prirasta broja biljaka u tretmanu kontinuirane izloženosti (Slika 7).



Slika 7. Inhibicija prirasta broja biljaka (%) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tablica 4. Prirast (dan^{-1}) i inhibicija prirasta (%) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Tretman		Broj biljaka	Prirast (dan^{-1})	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	73,83 \pm 11,63 ^{cd}	0,19 \pm 0,01 ^{cd}	
	100 $\mu\text{L/L}$	102,83 \pm 21,29 ^a	0,23 \pm 0,01 ^a	
	150 $\mu\text{L/L}$	97,5 \pm 28,27 ^{ab}	0,22 \pm 0,02 ^{ab}	
	200 $\mu\text{L/L}$	85,83 \pm 9,37 ^b	0,21 \pm 0,01 ^b	
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	80,67 \pm 18,06 ^c	0,20 \pm 0,00 ^c	-3,42 \pm 1,06 ^c
	100 $\mu\text{g/L}$	100,50 \pm 20,08 ^{ab}	0,22 \pm 0,01 ^{ab}	3,17 \pm 1,98 ^b
	150 $\mu\text{g/L}$	135,00 \pm 35,13 ^k	0,14 \pm 0,01 ^k	34,24 \pm 4,50 ^a
	200 $\mu\text{g/L}$	115,67 \pm 20,14 ⁱ	0,13 \pm 0,00 ⁱ	40,60 \pm 2,51 ^f
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	300,67 \pm 15,17 ^{de}	0,18 \pm 0,00 ^{de}	4,13 \pm 3,78 ^b
	100 $\mu\text{g/L}$	297,33 \pm 9,50 ^e	0,18 \pm 0,00 ^e	21,48 \pm 4,88 ^e
	150 $\mu\text{g/L}$	138,33 \pm 25,28 ^{gh}	0,14 \pm 0,01 ^{gh}	35,36 \pm 4,50 ^a
	200 $\mu\text{g/L}$	79,50 \pm 25,00 ^j	0,11 \pm 0,01 ^j	47,94 \pm 2,69 ^g
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	237,67 \pm 57,43 ^f	0,16 \pm 0,01 ^f	14,98 \pm 1,79 ^d
	100 $\mu\text{g/L}$	177,83 \pm 20,93 ^g	0,15 \pm 0,01 ^g	32,47 \pm 4,16 ^a
	150 $\mu\text{g/L}$	33,17 \pm 6,46 ^h	0,07 \pm 0,01 ^h	67,53 \pm 4,39 ^h
	200 $\mu\text{g/L}$	29,00 \pm 4,33 ^l	0,06 \pm 0,01 ^l	73,31 \pm 2,41 ⁱ
F		170,05	170,05	411,81
P		<0,01	<0,01	<0,01

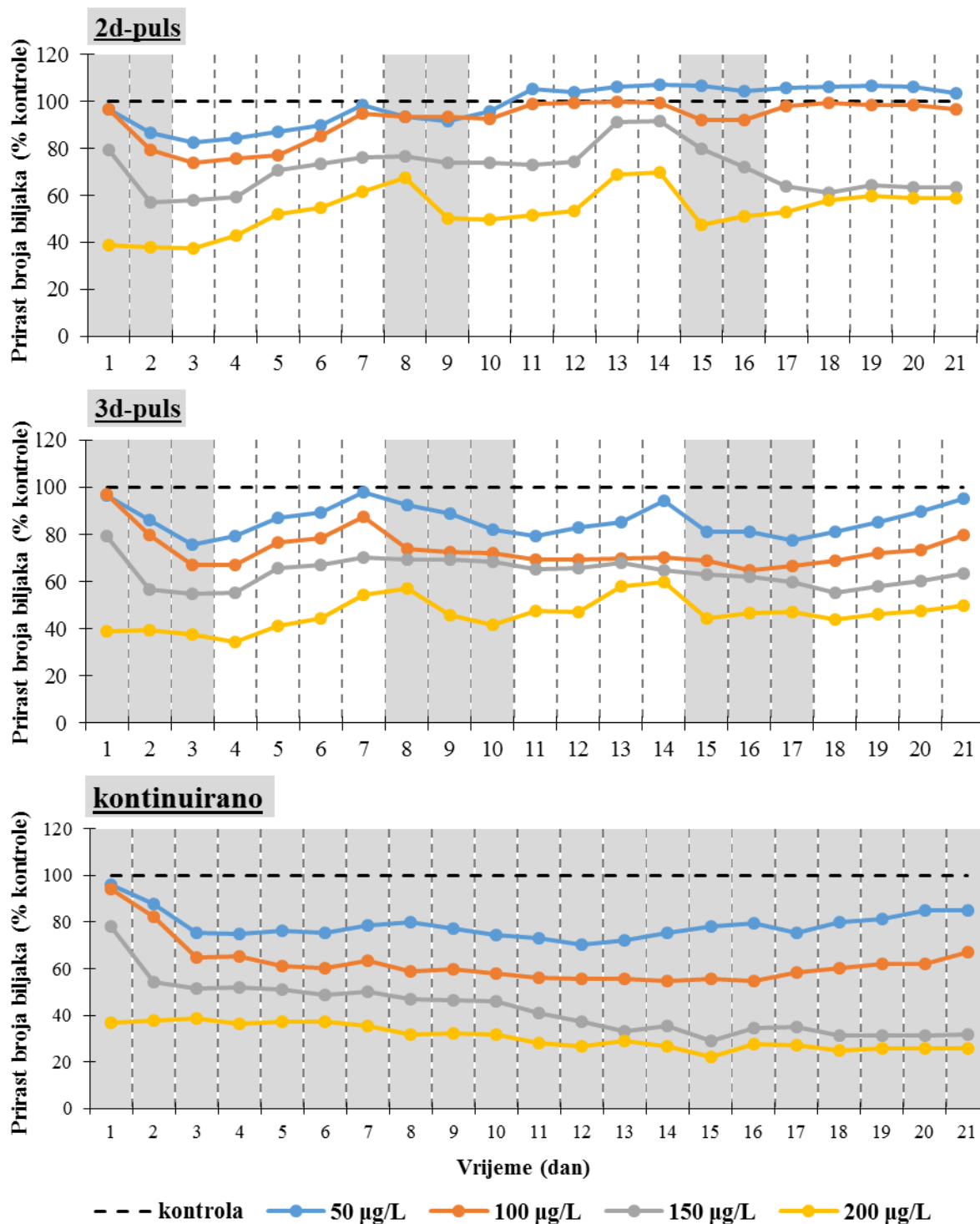
Na slici 8 prikazan je prirast broja biljaka pri svim testiranim koncentracijama izoproturona ovisno o vremenu trajanja eksperimenta za sva tri uvjeta izloženosti biljaka vrste *L. minor*.

Kada su biljke tretirane izoproturonom u 2d-pulsu, prirast broja biljaka smanjivao se do trećeg dana tretmana nakon čega je uslijedilo povećanje prirasta broja biljaka. Pri tretmanu s 50 µg/L biljke su sedmog dana eksperimenta postigle prirast od 98,6% kontrolne vrijednosti. Novi puls herbicida smanjio je prirast broja biljaka na 92% kontrolne vrijednosti devetog dana eksperimenta. Biljke su se u tretmanu ovom koncentracijom herbicida oporavile već jedanaestog dana tretmana kada su postigle prirast broja biljaka veći od kontrolnog i te su vrijednosti zadržane sve do kraja tretmana, čak i za vrijeme trećeg pulsog dodatka herbicida u hranjivu otopinu. Slična krivulja promjene prirasta broja biljaka ovisno o vremenu utvrđena je i u tretmanu sa 150 µg/L pri čemu su biljke oporavak postigle nakon drugog pulsa postižući isti prirast kao kontrolne biljke. Treći puls ponovno je inhibirao stopu rasta, ali vrlo brzo prirast je vraćen na vrijednosti rasta kontrole. Iako je utvrđeno povećanje prirasta broja biljaka nakon prestanka pulsog izlaganja u tretmanu i s dvije najveće koncentracije herbicida, nije utvrđen potpuni oporavak biljaka s obzirom da nije postignut prirast kao u kontrolnim skupinama tijekom trajanja eksperimenta (Slika 8).

Kada su biljke izoproturonu izlagane u 3d-pulsu, nakon prvog pulsa prirast broja biljaka počeo se oporavljati petog dana tretmana. Samo u tretmanu s najmanjom koncentracijom izoproturona utvrđene su vrijednosti prirasta slične kontrolnim vrijednostima zadnjeg dana perioda oporavka (98% kontrolne vrijednosti sedmog dana i 94% kontrolne vrijednosti prirasta četrnaestog dana), nakon čega je uslijedilo smanjenje stope rasta novom pulsnom dozom herbicida. Slično kao u 2d-pulsu, utvrđeno je povećanje prirasta broja biljaka nakon prestanka pulsog izlaganja u tretmanu s većim koncentracijama herbicida, međutim nije utvrđen potpuni oporavak biljaka s obzirom da nije postignut prirast kao u kontrolnim skupinama tijekom trajanja cijelog testa (Slika 8).

Pri kontinuiranom izlaganju najmanjoj koncentraciji herbicida izoproturona prirast broja biljaka smanjivao se do dvanaestog dana tretmana kada je iznosio 70% kontrolne vrijednosti. S daljnjim izlaganjem biljka ovoj koncentraciji izoproturona, uslijedio je blagi porast prirasta do 85% prirasta kontrole zadnjeg dana eksperimenta.

Slična krivulja promjene prirasta broja biljaka tijekom testa utvrđena je i pri tretmanu sa 100 i 150 $\mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivoj otopini. Najniže vrijednosti prirasta utvrđene su sredinom perioda izlaganja nakon čega je uslijedio blagi porast do konačnih 67% kontrolne vrijednosti pri 100 $\mu\text{g/L}$ i 32% kontrolne vrijednosti pri 150 $\mu\text{g/L}$. Kada su biljke tretirane s 200 $\mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivoj otopini prirast broja biljaka već prvog dana tretmana bio je smanjen na 37% kontrolne vrijednosti i postupno se smanjivao do konačnih 25,6% kontrolne vrijednosti zadnjeg dana eksperimenta (Slika 8).

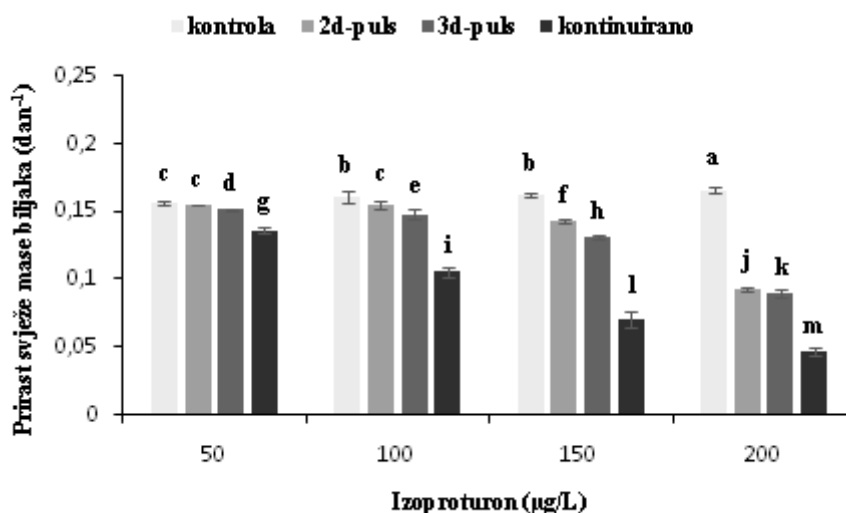


Slika 8. Prirast broja biljaka po danima izražen kao % kontrole. Siva polja predstavljaju period izlaganja izoproturonu, bijela polja predstavljaju period oporavka. Prikazani rezultati su srednja vrijednost prirasta broja biljaka ($n=12$) tijekom 21 dan trajanja tretmana s 50, 100, 150 i 200 $\mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivoj otopini. Kontrola (0 $\mu\text{g/L}$) predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajućeg volumena metanola.

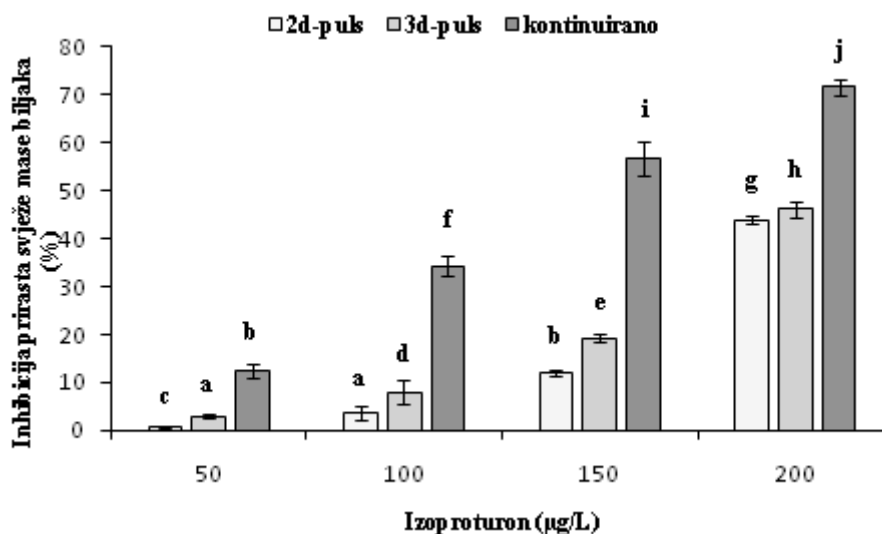
3.1.1.2. Utjecaj izoproturona na prirast svježe mase biljaka

Utjecaj različitih koncentracija izoproturona na prirast svježe mase biljaka nakon 21 dan trajanja eksperimenta prikazan je u tablici 5. Prirast svježe mase biljaka u tretmanu s izoproturonom ovisio je o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini, ali i o uvjetima izloženosti ($F=1042,7$; $P<0,01$). Statistički značajna razlika u prirastu svježe mase biljaka nije utvrđena samo kod biljaka koje su tretirane s $50 \mu\text{g/L}$ izoproturona u 2d-pulsu. Ista koncentracija herbicida u 3d-pulsu i kontinuiranom tretmanu, uzrokovala je statistički značajno smanjenje prirasta svježe mase biljaka u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Ostale koncentracije uzrokovale su statistički značajno smanjenje prirasta svježe mase biljaka pri svim uvjetima tretmana (Slika 9).

Najizraženije djelovanje svih testiranih koncentracija herbicida na prirast svježe mase biljka utvrđeno je pri kontinuiranom izlaganju. Najveća inhibicija prirasta svježe mase iznosila je $71,46 \pm 1,59\%$ u kontinuiranom izlaganju izoproturonu u koncentraciji $200 \mu\text{g/L}$. Ista koncentracija herbicida uzrokovala je statistički značajnu inhibiciju prirasta i u 2d i 3d-pulsu u odnosu na odgovarajuću kontrolu, međutim ta inhibicija prirasta bila je značajno manja od inhibicije u kontinuiranom izlaganju (Slika 10).



Slika 9. Prirast svježe mase biljaka (dan^{-1}) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).



Slika 10. Inhibicija prirasta svježe mase biljaka (%) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

3.1.1.3. Utjecaj izoproturona na prirast suhe mase biljaka

Prema rezultatima analize varijance ($F=40,766$; $P < 0,01$) prirast suhe mase biljaka *L. minor* nakon 21 dan tretmana s različitim koncentracijama herbicida izoproturona u hranjivoj otopini značajno se razlikovao od prirasta kontrolnih biljaka (Tablica 5).

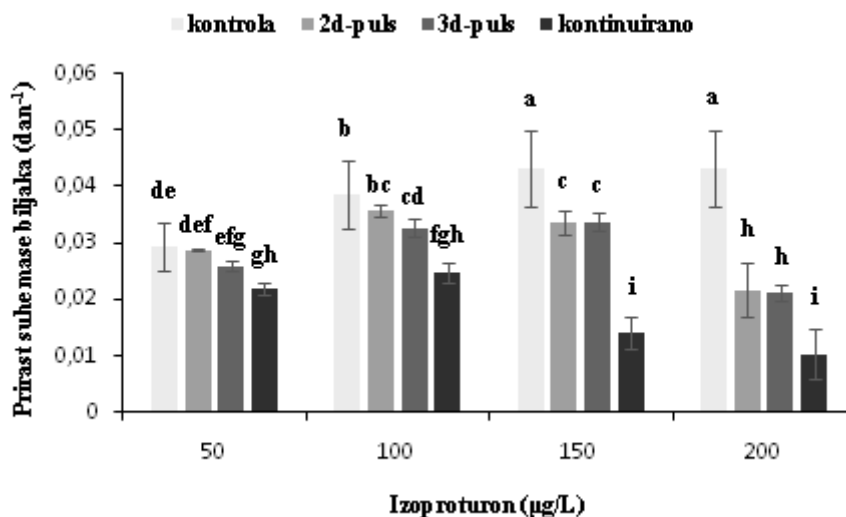
Kada su biljke izoproturonu izlagane u uvjetima 2d-pulsa, samo su dvije najveće koncentracije herbicida uzrokovale značajno smanjenje prirasta suhe mase u usporedbi s odgovarajućim kontrolama. Inhibicija prirasta iznosila je $22,10 \pm 4,88\%$ pri $150 \mu\text{g/L}$ te $43,91 \pm 0,82\%$ pri koncentraciji od $200 \mu\text{g/L}$ testiranog herbicida (Slika 12).

Kada su biljke izoproturonu izlagane u 3d-pulsu, suha masa biljaka bila je manja u usporedbi s kontrolnim vrijednostima u tretmanu s 100, 150 i 200 $\mu\text{g/L}$, dok najmanja koncentracija izoproturona nije imala značajan utjecaj na prirast suhe mase.

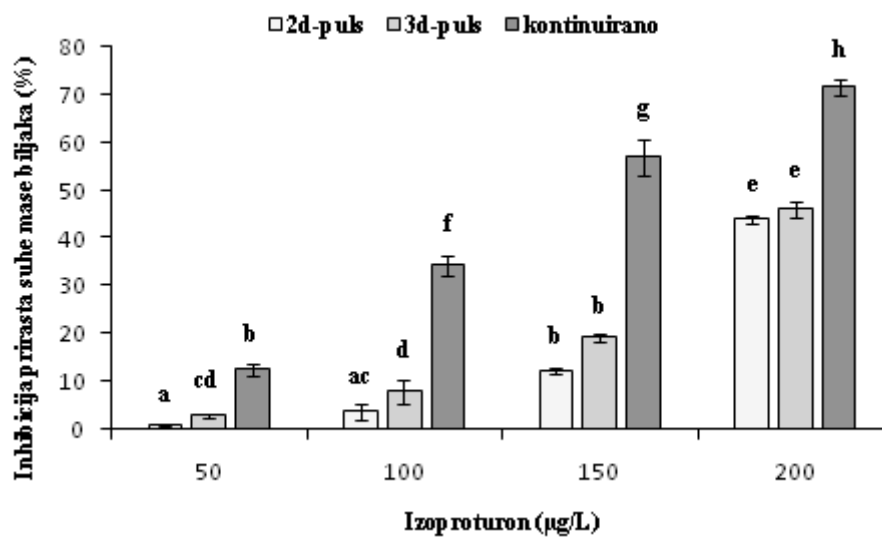
Usporedbom djelovanja iste koncentracije izoproturona u 2d i 3d-pulsu nije utvrđena statistički značajna razlika (Tablica 5, Slika 11).

Slično kao i prirast svježe mase, i prirast suhe mase bio je inhibiran pri djelovanju svih testiranih koncentracija izoproturona u kontinuiranom izlaganju (Slika 12). Inhibicija prirasta suhe mase iznosila je $25,33 \pm 3,24\%$ pri 50 $\mu\text{g/L}$, $35,97 \pm 4,58\%$ pri 100 $\mu\text{g/L}$, $67,44 \pm 6,53\%$ pri 150 $\mu\text{g/L}$, dok je u tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ inhibicija prirasta iznosila maksimalnih $75,85 \pm 10,02\%$.

Važno je naglasiti da je, slično kao i u slučaju prirasta svježe mase, pri svim koncentracijama izoproturona inhibicija prirasta suhe mase bila je značajno veća pri kontinuiranom izlaganju u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije u 2d i 3d-pulsu (Slika 12).



Slika 11. Prirast suhe mase biljaka (dan^{-1}) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).



Slika 12. Inhibicija prirasta suhe mase biljaka (%) *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

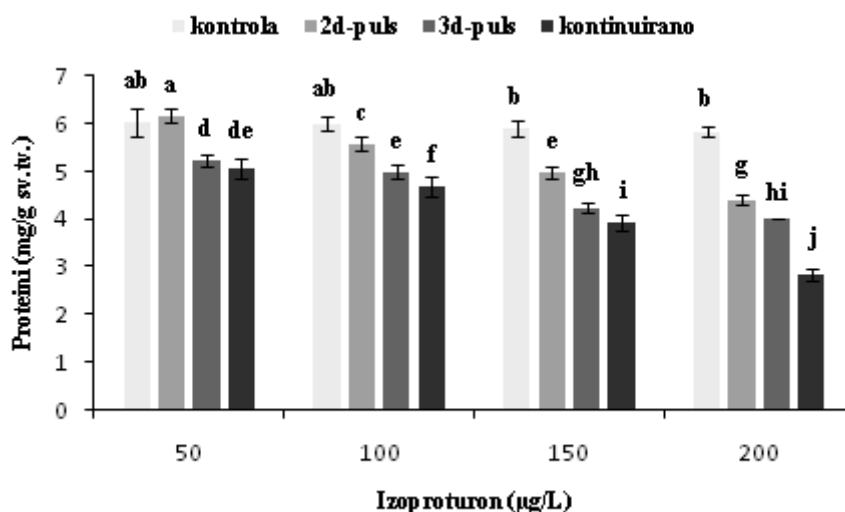
Tablica 5. Masa svježe tvari i masa suhe tvari *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Masa svježe tvari			Masa suhe tvari		
		(mg)	Prirast (dan^{-1})	Inhibicija (%)	(mg)	Prirast (dan^{-1})	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	203,52 \pm 5,44	0,16 \pm 0,01 ^c		49,67 \pm 4,18	0,03 \pm 0,00 ^{de}	
	100 $\mu\text{L/L}$	224,43 \pm 18,63	0,16 \pm 0,00 ^b		60,00 \pm 7,54	0,04 \pm 0,01 ^b	
	150 $\mu\text{L/L}$	232,25 \pm 6,16	0,16 \pm 0,01 ^b		65,83 \pm 9,02	0,04 \pm 0,01 ^a	
	200 $\mu\text{L/L}$	247,90 \pm 12,28	0,17 \pm 0,01 ^b		65,83 \pm 9,02	0,04 \pm 0,01 ^a	
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	199,48 \pm 1,44	0,16 \pm 0,01 ^c	0,63 \pm 0,23 ^c	48,93 \pm 0,10	0,03 \pm 0,00 ^{def}	2,00 \pm 0,36 ^a
	100 $\mu\text{g/L}$	198,55 \pm 10,06	0,16 \pm 0,01 ^c	3,75 \pm 1,58 ^a	56,33 \pm 1,21	0,04 \pm 0,00 ^{bc}	7,38 \pm 2,78 ^{ac}
	150 $\mu\text{g/L}$	156,17 \pm 3,17	0,14 \pm 0,01 ^f	12,18 \pm 0,63 ^b	54,00 \pm 2,28	0,03 \pm 0,00 ^c	22,10 \pm 4,88 ^b
	200 $\mu\text{g/L}$	57,58 \pm 1,55	0,09 \pm 0,01 ^j	43,91 \pm 0,82 ^g	42,67 \pm 4,13	0,02 \pm 0,00 ^h	43,91 \pm 0,82 ^e
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	195,35 \pm 3,08	0,15 \pm 0,01 ^d	2,98 \pm 0,53 ^a	46,33 \pm 0,82	0,03 \pm 0,00 ^{efg}	11,30 \pm 3,01 ^{cd}
	100 $\mu\text{g/L}$	173,67 \pm 13,87	0,15 \pm 0,01 ^e	7,96 \pm 2,54 ^d	53,00 \pm 1,79	0,03 \pm 0,00 ^{cd}	15,30 \pm 4,32 ^d
	150 $\mu\text{g/L}$	123,77 \pm 3,50	0,13 \pm 0,01 ^h	19,32 \pm 0,86 ^e	54,00 \pm 1,67	0,03 \pm 0,00 ^c	22,06 \pm 3,63 ^b
	200 $\mu\text{g/L}$	53,58 \pm 3,28	0,09 \pm 0,01 ^k	46,13 \pm 1,79 ^h	42,17 \pm 1,17	0,02 \pm 0,00 ^h	50,64 \pm 3,19 ^e
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	137,52 \pm 6,24	0,14 \pm 0,01 ^g	12,56 \pm 1,44 ^b	42,67 \pm 0,82	0,02 \pm 0,00 ^{gh}	25,33 \pm 3,24 ^b
	100 $\mu\text{g/L}$	74,35 \pm 5,09	0,11 \pm 0,01 ⁱ	34,26 \pm 2,18 ^f	45,17 \pm 1,60	0,02 \pm 0,00 ^{fgh}	35,97 \pm 4,58 ^f
	150 $\mu\text{g/L}$	36,67 \pm 4,31	0,07 \pm 0,01 ^l	56,82 \pm 3,67 ⁱ	36,50 \pm 2,07	0,01 \pm 0,00 ⁱ	67,44 \pm 6,53 ^g
	200 $\mu\text{g/L}$	23,07 \pm 1,22	0,05 \pm 0,01 ^m	71,46 \pm 1,59 ^j	34,00 \pm 3,10	0,01 \pm 0,00 ⁱ	75,85 \pm 10,02 ^h
F			1042,7	1096,3		40,766	107,13
P			<0,01	<0,01		<0,01	<0,01

3.1.1.4. Utjecaj izoproturona na koncentraciju proteina

Utjecaj različitih koncentracija izoproturona na koncentraciju proteina u biljkama nakon 21 dan trajanja eksperimenta prikazan je u tablici 6. Koncentracija proteina u *L. minor* ovisila je o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini za uzgoj biljaka, ali i o scenarijima tretmana ($F=147,16$; $P<0,01$). Statistički značajna razlika u koncentraciji nije utvrđena samo kod biljaka tretiranih s 50 $\mu\text{g/L}$ herbicida u 2d-pulsu (Slika 13).

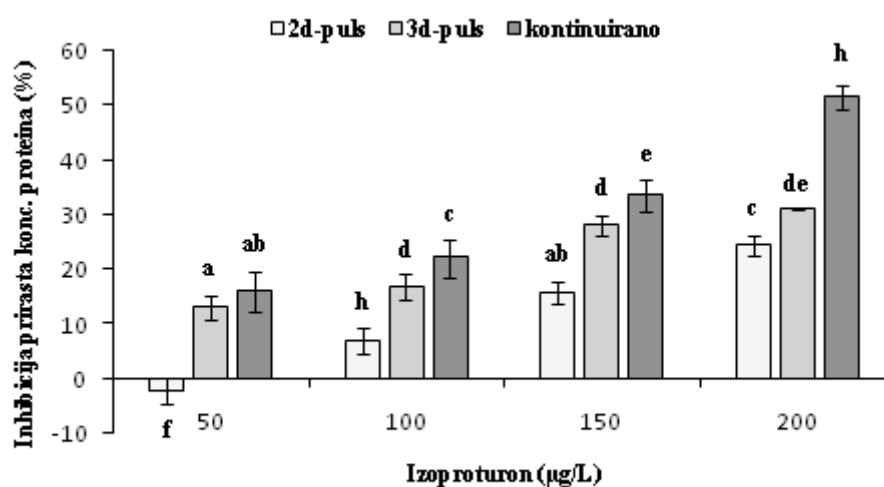
Međutim, najizraženije djelovanje svih testiranih koncentracija izoproturona na koncentraciju proteina utvrđeno je pri kontinuiranom izlaganju biljaka.



Slika 13. Koncentracija proteina (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Prema rezultatima analize varijance ($F=131,98$; $P<0,01$) najveća inhibicija prirasta koncentracije proteina iznosila je $51,49 \pm 2,13\%$ u kontinuiranom izlaganju izoproturonu u koncentraciji od $200 \mu\text{g/L}$.

Nadalje, ista je koncentracija herbicida uzrokovala statistički značajnu inhibiciju prirasta koncentracije, kako u 2d, tako i u 3d-pulsu u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Međutim, ta je inhibicija bila značajno manja od inhibicije u kontinuiranom izlaganju *L. minor* (Slika 14).



Slika 14. Inhibicija prirasta koncentracije proteina (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

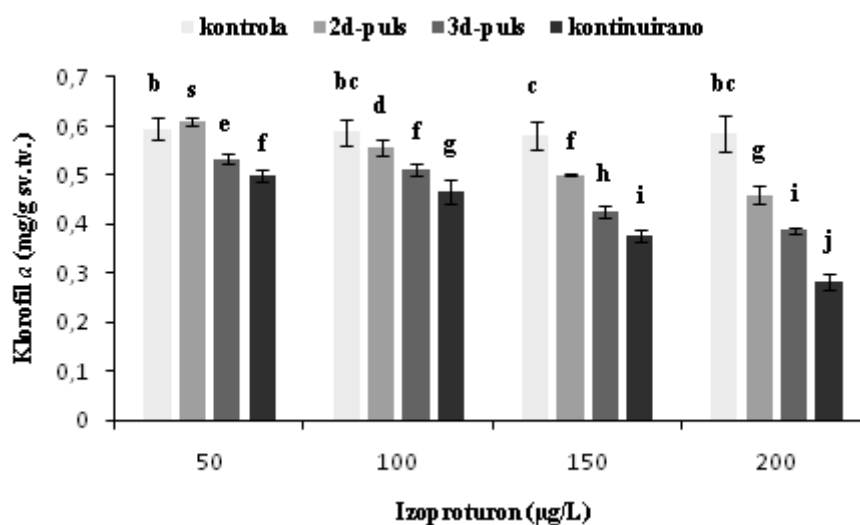
Tablica 6. Prirast (dan^{-1}) i inhibicija prirasta koncentracije proteina (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Tretman		Prirast (dan^{-1})	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	$6,03 \pm 0,30^{\text{ab}}$	
	100 $\mu\text{L/L}$	$6,00 \pm 0,14^{\text{ab}}$	
	150 $\mu\text{L/L}$	$5,90 \pm 0,15^{\text{b}}$	
	200 $\mu\text{L/L}$	$5,84 \pm 0,08^{\text{b}}$	
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$6,17 \pm 0,14^{\text{a}}$	$-2,22 \pm 2,41^{\text{f}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$5,58 \pm 0,13^{\text{c}}$	$6,98 \pm 2,28^{\text{h}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$4,98 \pm 0,12^{\text{e}}$	$15,67 \pm 2,05^{\text{ab}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$4,41 \pm 0,10^{\text{g}}$	$24,44 \pm 1,84^{\text{c}}$
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$5,24 \pm 0,12^{\text{d}}$	$13,09 \pm 2,11^{\text{a}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$4,99 \pm 0,14^{\text{e}}$	$16,80 \pm 2,32^{\text{d}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$4,24 \pm 0,10^{\text{gh}}$	$28,07 \pm 1,72^{\text{d}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$4,02 \pm 0,00^{\text{hi}}$	$31,16 \pm 0,02^{\text{de}}$
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	$5,06 \pm 0,22^{\text{de}}$	$16,12 \pm 3,69^{\text{ab}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$4,67 \pm 0,20^{\text{f}}$	$22,12 \pm 3,43^{\text{c}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$3,92 \pm 0,17^{\text{i}}$	$33,60 \pm 2,92^{\text{e}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$2,83 \pm 0,12^{\text{j}}$	$51,49 \pm 2,13^{\text{h}}$
F		147,16	131,98
P		<0,01	<0,01

3.1.2. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju fotosintetskih pigmenata

3.1.2.1. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju klorofila *a* (Chla)

Utjecaj različitih koncentracija izoproturona na koncentraciju Chla nakon 21 dan trajanja eksperimenta prikazan je u tablici 7. Koncentracija Chla u *L. minor* ovisila je prvenstveno o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini, kao i o uvjetima tretmana biljaka. Prema rezultatima analize varijance ($F=274,37$; $P<0,01$) statistički značajna razlika u koncentraciji Chla uočena je kod biljaka tretiranih svim koncentracijama herbicida u 2d-pulsu (Slika 15).

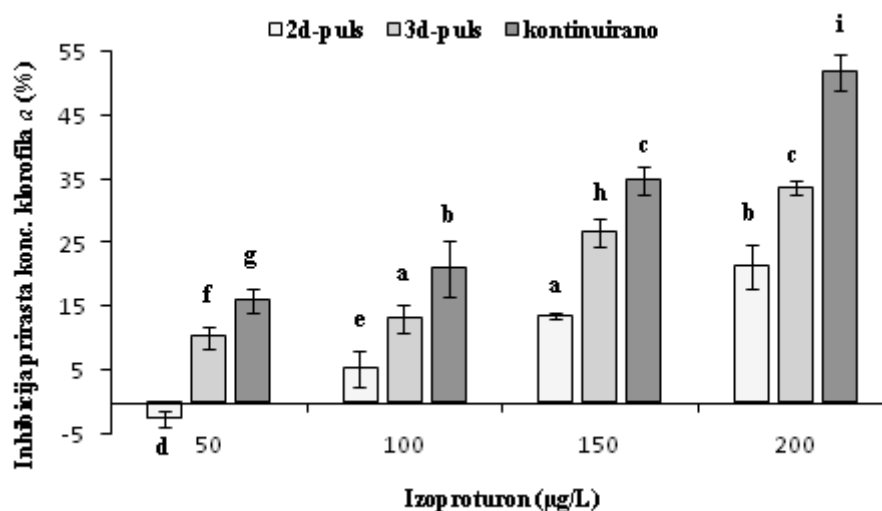


Slika 15. Koncentracije klorofila *a* (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Statistički značajno smanjenje koncentracije Chla uočeno je kod biljaka tretiranih svim koncentracijama izoproturona u 3d-pulsu, kao i u uvjetima kontinuiranog izlaganja biljaka (Slika 15).

S druge strane, najznačajnije djelovanje svih ispitivanih koncentracija izoproturona na prirast koncentracije Chla utvrđeno je upravo pri kontinuiranom izlaganju biljaka. Najveća inhibicija prirasta iznosila je $51,87 \pm 2,76\%$ pri tretmanu s 200 µg/L herbicida.

Navedena je koncentracija također uzrokovala statistički značajno povećanje inhibicije prirasta koncentracije Chla u 2d i 3d-pulsu u odnosu na kontrolne biljke (Slika 16).

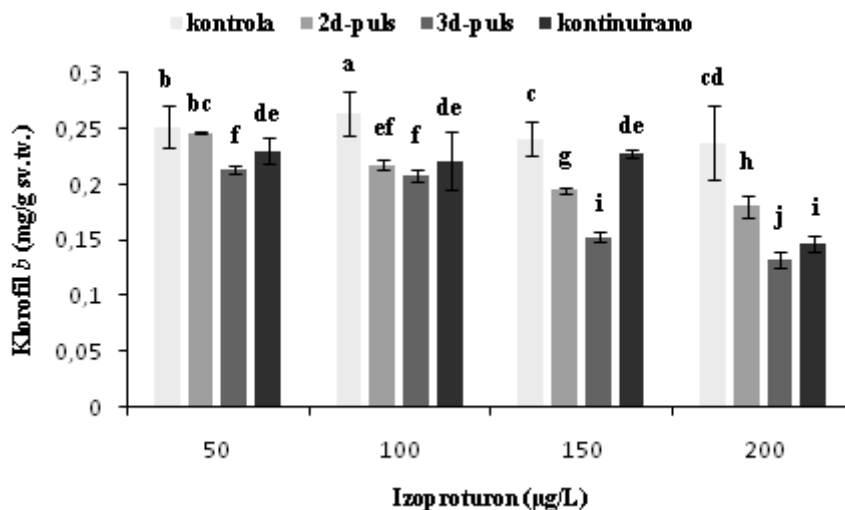


Slika 16. Inhibicija prirasta koncentracije klorofila *a* (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

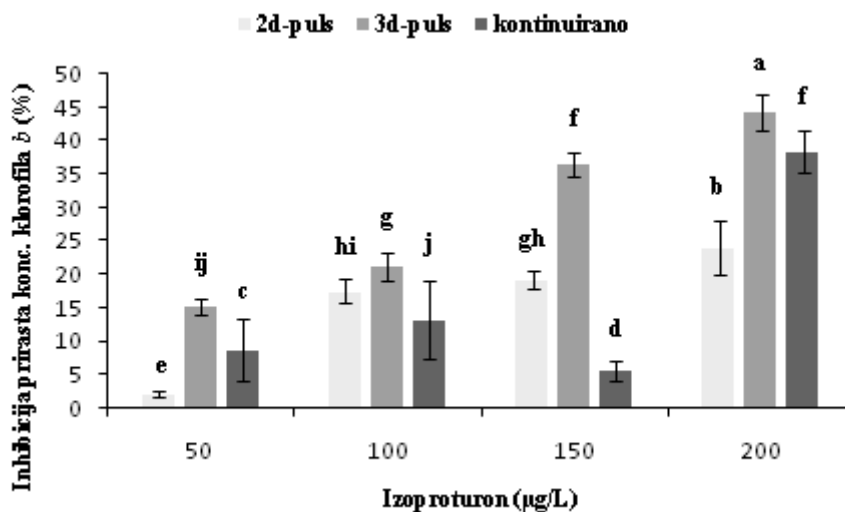
3.1.2.2. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju klorofila *b* (Chlb)

Rezultati analize varijance ($F=90,378$; $P<0,01$) pokazuju kako se koncentracija Chlb u biljkama nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u hranjivoj otopini statistički značajno razlikovala od koncentracije Chlb kontrolnih biljaka (Tablica 7). Nakon 2d-pulsa statistički značajna razlika u koncentraciji Chlb nije uočena samo kod biljaka tretiranih najmanjom koncentracijom izoproturona (Slika 17).

Kada su biljke izoproturonu izlagane u uvjetima 3d-pulsa, statistički značajna razlika u koncentraciji Chlb utvrđena je pri svim koncentracijama herbicida. Inhibicija prirasta koncentracije Chlb iznosila je $36,47 \pm 1,92\%$ pri $150 \mu\text{g/L}$, dok je u tretmanu s $200 \mu\text{g/L}$ inhibicija prirasta Chlb iznosila maksimalnih $44,31 \pm 2,68\%$ (Slika 18).



Slika 17. Koncentracije klorofila *b* (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).



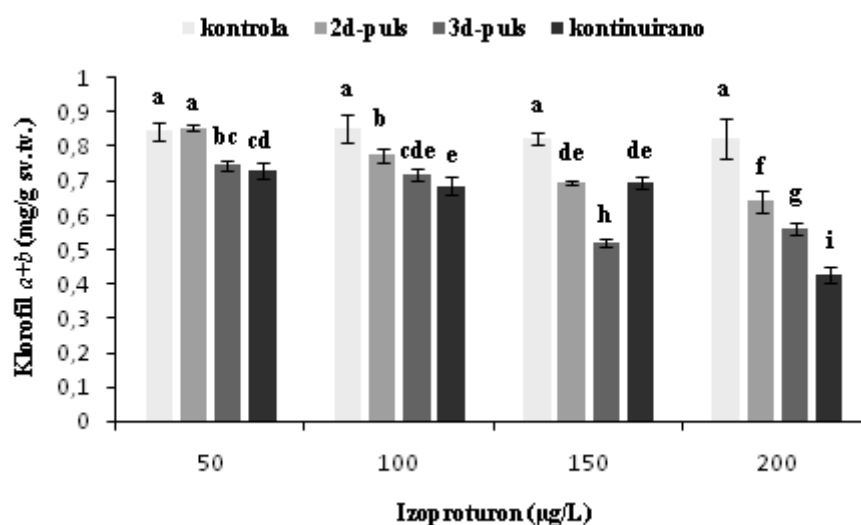
Slika 18. Inhibicija prirasta koncentracije klorofila *b* (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tablica 7. Koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Chla			Chlb		
		mg/g sv.tv.	Prirast (dan ⁻¹)	Inhibicija (%)	mg/g sv.tv.	Prirast (dan ⁻¹)	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 µL/L	0,59 \pm 0,02 ^b	0,06 \pm 0,00 ^b		0,25 \pm 0,02 ^b	0,08 \pm 0,00 ^b	
	100 µL/L	0,59 \pm 0,03 ^{bc}	0,06 \pm 0,00 ^{bc}		0,26 \pm 0,02 ^a	0,08 \pm 0,00 ^a	
	150 µL/L	0,58 \pm 0,03 ^c	0,06 \pm 0,00 ^c		0,24 \pm 0,02 ^c	0,08 \pm 0,00 ^c	
	200 µL/L	0,59 \pm 0,04 ^{bc}	0,06 \pm 0,00 ^{bc}		0,24 \pm 0,03 ^{cd}	0,07 \pm 0,01 ^{cd}	
2d-puls	50 µg/L	0,61 \pm 0,01 ^s	0,06 \pm 0,00 ^s	-2,51 \pm 1,23 ^d	0,25 \pm 0,00 ^{bc}	0,08 \pm 0,00 ^{bc}	2,14 \pm 0,32 ^e
	100 µg/L	0,56 \pm 0,02 ^d	0,06 \pm 0,00 ^d	5,33 \pm 2,68 ^e	0,22 \pm 0,00 ^{ef}	0,07 \pm 0,00 ^{ef}	17,50 \pm 1,80 ^{hi}
	150 µg/L	0,50 \pm 0,00 ^f	0,05 \pm 0,00 ^f	13,64 \pm 0,55 ^a	0,20 \pm 0,00 ^g	0,06 \pm 0,00 ^g	19,15 \pm 1,27 ^{gh}
	200 µg/L	0,46 \pm 0,02 ^g	0,05 \pm 0,00 ^g	21,36 \pm 3,39 ^b	0,18 \pm 0,01 ^h	0,06 \pm 0,00 ^h	24,07 \pm 4,14 ^b
3d-puls	50 µg/L	0,53 \pm 0,01 ^e	0,05 \pm 0,00 ^e	10,30 \pm 1,73 ^f	0,21 \pm 0,00 ^f	0,07 \pm 0,00 ^f	15,16 \pm 1,29 ^{ij}
	100 µg/L	0,51 \pm 0,01 ^f	0,05 \pm 0,00 ^f	13,19 \pm 2,21 ^a	0,21 \pm 0,00 ^f	0,07 \pm 0,00 ^f	21,12 \pm 2,10 ^g
	150 µg/L	0,42 \pm 0,01 ^h	0,04 \pm 0,00 ^h	26,80 \pm 2,16 ^h	0,15 \pm 0,00 ⁱ	0,05 \pm 0,00 ⁱ	36,47 \pm 1,92 ^f
	200 µg/L	0,39 \pm 0,01 ⁱ	0,04 \pm 0,00 ⁱ	33,76 \pm 0,97 ^c	0,13 \pm 0,01 ^j	0,04 \pm 0,00 ^j	44,31 \pm 2,68 ^a
kontinuirano	50 µg/L	0,50 \pm 0,01 ^f	0,05 \pm 0,00 ^f	15,98 \pm 1,86 ^g	0,23 \pm 0,01 ^{de}	0,07 \pm 0,00 ^{de}	8,73 \pm 4,68 ^c
	100 µg/L	0,47 \pm 0,03 ^g	0,05 \pm 0,00 ^g	21,01 \pm 4,27 ^b	0,22 \pm 0,03 ^{de}	0,07 \pm 0,00 ^{de}	13,17 \pm 5,86 ^j
	150 µg/L	0,38 \pm 0,01 ⁱ	0,04 \pm 0,00 ⁱ	34,88 \pm 2,09 ^c	0,23 \pm 0,00 ^{de}	0,07 \pm 0,00 ^{de}	5,55 \pm 1,46 ^d
	200 µg/L	0,28 \pm 0,02 ^j	0,03 \pm 0,00 ^j	51,87 \pm 2,76 ⁱ	0,15 \pm 0,01 ⁱ	0,04 \pm 0,00 ⁱ	38,38 \pm 3,08 ^f
F		274,37	274,37	460,97	90,378	90,378	237,63
P		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

3.1.2.3. Utjecaj herbicida izoproturona na koncentraciju ukupnih klorofila (Chl $a+b$)

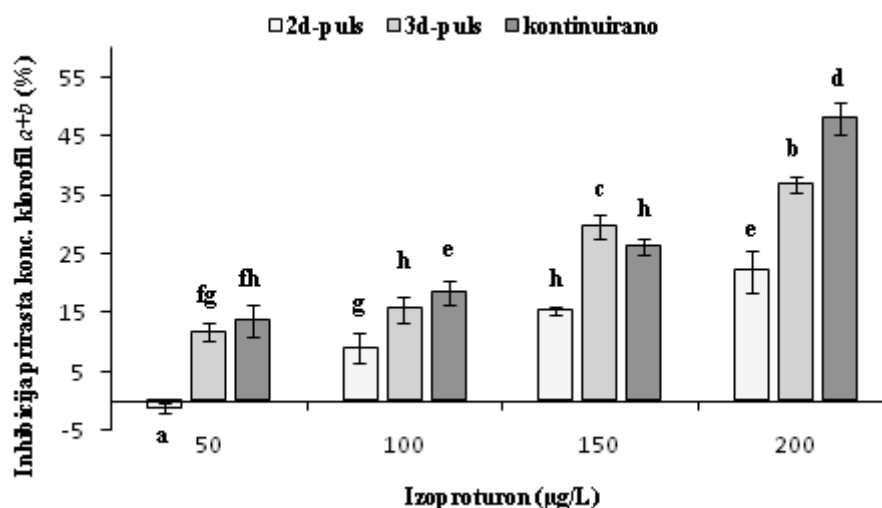
Prema rezultatima analize varijance ($F=279,49$; $P<0,01$) koncentracija ukupnih klorofila biljaka *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u hranjivoj otopini, značajno se razlikovala od koncentracije ukupnih klorofila kontrolnih biljaka (Tablica 8). Statistički značajna razlika koncentracije ukupnih klorofila nije utvrđena samo kod biljaka tretiranih najmanjom koncentracijom herbicida u 2d-pulsu. Statistički značajne razlike smanjenja koncentracije ukupnih klorofila također su utvrđene u 3d-pulsu i kontinuiranom tretmanu biljaka (Slika 19).



Slika 19. Koncentracije ukupnih klorofila (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

Najizraženije djelovanje svih ispitivanih koncentracija herbicida na prirast koncentracije ukupnih klorofila utvrđeno je upravo pri kontinuiranom izlaganju. Najveća je inhibicija prirasta koncentracije iznosila $47,97 \pm 2,63\%$ u kontinuiranom izlaganju izoproturonu pri koncentraciji od 200 µg/L.

S druge strane, ista je koncentracija herbicida uzrokovala statistički značajnu inhibiciju prirasta koncentracije u 2d i 3d-pulsu u odnosu na pripadajuću kontrolu, međutim ta inhibicija bila je značajno manja od inhibicije prirasta koncentracije ukupnih klorofila u kontinuiranom izlaganju biljaka (Slika 20).

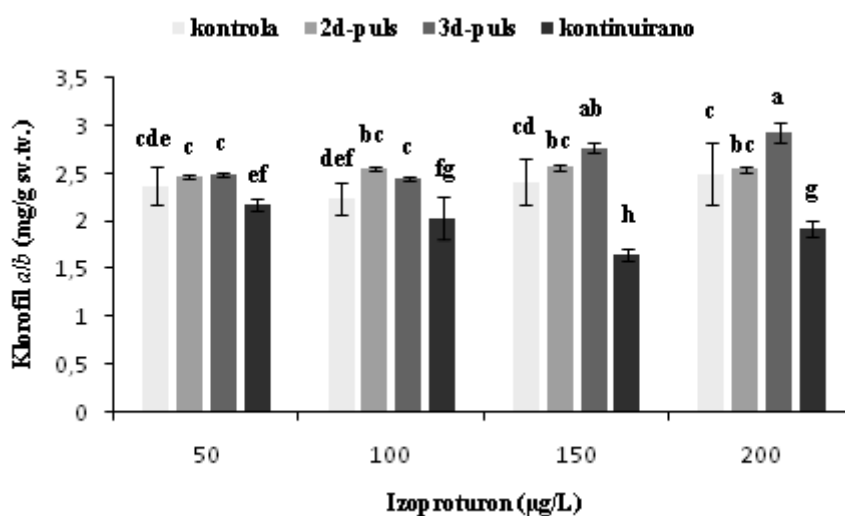


Slika 20. Inhibicija prirasta koncentracije ukupnih klorofila (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).

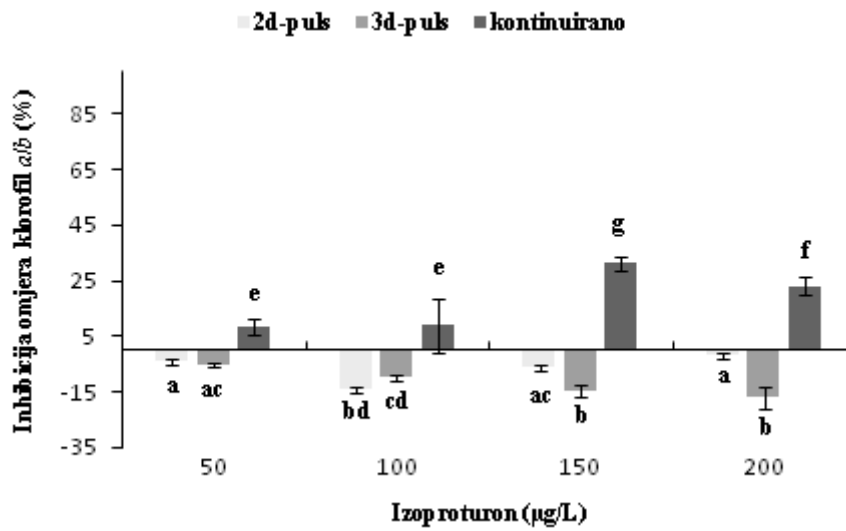
3.1.2.4. Utjecaj herbicida izoproturona na omjer klorofil *a/b* (*Chla/b*)

Vrijednosti omjera *Chla/b* prikazane su u tablici 8. Navedene su vrijednosti ovisile prvenstveno o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini za uzgoj biljaka, kao i o uvjetima tretmana. Prema rezultatima analize varijance ($F=47,786$; $P<0,01$) statistički značajna razlika u vrijednostima omjera *Chla/b* utvrđena je samo kod biljaka tretiranih s 100 µg/L herbicida u 2d-pulsu (Slika 21).

Kada su biljke izlagane izoproturonu u 3d-pulsu, statistički značajne razlike u vrijednostima omjera utvrđene su pri koncentracijama od 100, 150 i 200 $\mu\text{g/L}$ herbicida (Slika 21). S druge strane, od ključne je važnosti naglasiti kako je minimalna vrijednost omjera $\text{Chl}a/b$ utvrđena pri koncentraciji od 150 $\mu\text{g/L}$ herbicida tijekom kontinuiranog tretmana biljaka. Štoviše, pri navedenoj je koncentraciji utvrđena i najveća vrijednost inhibicije omjera $\text{Chl}a/b$ ($31,38 \pm 2,54\%$) (Slika 22).



Slika 21. Omjer klorofil a/b (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).



Slika 22. Inhibicija omjera klorofil *a/b* (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

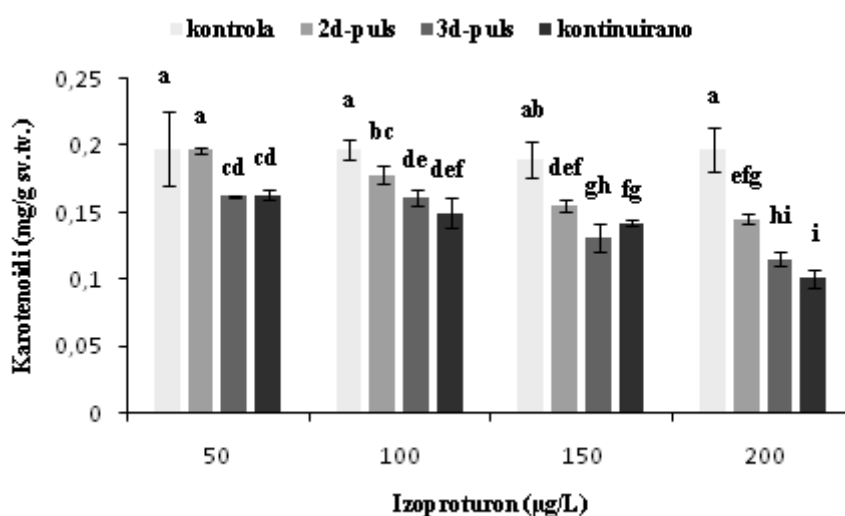
Tablica 8. Koncentracije Chla+b i omjer Chla/b (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Chla+b			Chla/b		
		mg/g sv.tv.	Prirast (dan ⁻¹)	Inhibicija (%)	mg/g sv.tv.	Prirast (dan ⁻¹)	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 µL/L	0,85 \pm 0,03 ^a	0,07 \pm 0,00 ^a		2,37 \pm 0,20 ^{cde}	0,03 \pm 0,00 ^{cde}	
	100 µL/L	0,85 \pm 0,04 ^a	0,07 \pm 0,00 ^a		2,24 \pm 0,17 ^{def}	0,03 \pm 0,00 ^{def}	
	150 µL/L	0,82 \pm 0,02 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a		2,42 \pm 0,25 ^{cd}	0,03 \pm 0,00 ^{cd}	
	200 µL/L	0,82 \pm 0,06 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a		2,50 \pm 0,32 ^c	0,03 \pm 0,00 ^c	
2d-puls	50 µg/L	0,86 \pm 0,01 ^a	0,07 \pm 0,00 ^a	-1,12 \pm 0,94 ^a	2,47 \pm 0,02 ^c	0,03 \pm 0,00 ^c	-4,14 \pm 1,03 ^a
	100 µg/L	0,78 \pm 0,02 ^b	0,06 \pm 0,00 ^b	9,10 \pm 2,40 ^g	2,55 \pm 0,02 ^{bc}	0,03 \pm 0,00 ^{bc}	-14,23 \pm 0,97 ^{bd}
	150 µg/L	0,70 \pm 0,01 ^{de}	0,05 \pm 0,00 ^{de}	15,28 \pm 0,71 ^h	2,57 \pm 0,03 ^{bc}	0,04 \pm 0,00 ^{bc}	-6,31 \pm 1,25 ^{ac}
	200 µg/L	0,64 \pm 0,03 ^f	0,05 \pm 0,00 ^f	22,14 \pm 3,61 ^e	2,55 \pm 0,03 ^{bc}	0,03 \pm 0,00 ^{bc}	-2,00 \pm 1,19 ^a
3d-puls	50 µg/L	0,75 \pm 0,01 ^{bc}	0,06 \pm 0,00 ^{bc}	11,74 \pm 1,59 ^{fg}	2,49 \pm 0,02 ^c	0,03 \pm 0,00 ^c	-5,10 \pm 0,68 ^{ac}
	100 µg/L	0,72 \pm 0,02 ^{cde}	0,06 \pm 0,00 ^{cde}	15,65 \pm 2,14 ^h	2,45 \pm 0,02 ^c	0,03 \pm 0,00 ^c	-9,57 \pm 1,06 ^{cd}
	150 µg/L	0,52 \pm 0,01 ^h	0,04 \pm 0,00 ^h	29,65 \pm 2,02 ^c	2,77 \pm 0,05 ^{ab}	0,04 \pm 0,00 ^{ab}	-14,68 \pm 1,98 ^b
	200 µg/L	0,56 \pm 0,02 ^g	0,04 \pm 0,00 ^g	36,81 \pm 1,46 ^b	2,93 \pm 0,10 ^a	0,04 \pm 0,00 ^a	-17,24 \pm 3,84 ^b
kontinuirano	50 µg/L	0,73 \pm 0,02 ^{cd}	0,06 \pm 0,00 ^{cd}	13,83 \pm 2,70 ^{fh}	2,18 \pm 0,07 ^{ef}	0,03 \pm 0,00 ^{ef}	8,35 \pm 2,78 ^e
	100 µg/L	0,69 \pm 0,02 ^e	0,05 \pm 0,00 ^e	18,58 \pm 2,02 ^e	2,04 \pm 0,22 ^{fg}	0,03 \pm 0,00 ^{fg}	8,84 \pm 9,86 ^e
	150 µg/L	0,69 \pm 0,02 ^{de}	0,05 \pm 0,00 ^{de}	26,29 \pm 1,49 ^h	1,66 \pm 0,06 ^h	0,02 \pm 0,00 ^h	31,38 \pm 2,54 ^g
	200 µg/L	0,43 \pm 0,02 ⁱ	0,03 \pm 0,00 ⁱ	47,97 \pm 2,63 ^d	1,92 \pm 0,08 ^g	0,03 \pm 0,00 ^g	23,09 \pm 3,37 ^f
F		279,49	279,49	418,12	47,786	47,786	226,05
P		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

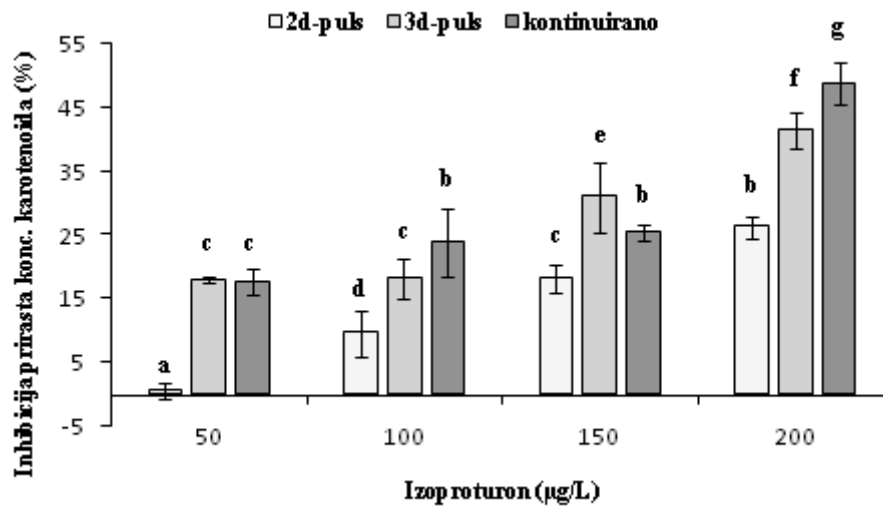
3.1.2.5. Utjecaj izoproturona na koncentraciju ukupnih karotenoida (Car)

Utjecaj različitih koncentracija herbicida izoproturona na koncentraciju ukupnih karotenoida nakon 21 dan trajanja eksperimenta prikazan je u tablici 9. Slično kao i prirast Chla, prirast ukupnih karotenoida ovisio je o koncentraciji navedenog herbicida u hranjivoj otopini, kao i o uvjetima tretmana biljaka ($F=92,699$; $P<0,01$). Jednosmjerna analiza varijance nije pokazala statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnih karotenoida samo kod biljaka tretiranim s $50 \mu\text{g/L}$ herbicida u 2d-pulsu.

Nadalje, smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida također je utvrđeno pri djelovanju svih testiranih koncentracija izoproturona u 3d-pulsu (Slika 23). Inhibicija prirasta koncentracije ukupnih karotenoida iznosila je $17,98 \pm 0,41\%$ pri $50 \mu\text{g/L}$, $18,31 \pm 3,12\%$ pri $100 \mu\text{g/L}$, $31,04 \pm 5,50\%$ pri $150 \mu\text{g/L}$ te $41,46 \pm 2,90\%$ pri $200 \mu\text{g/L}$ navedenog herbicida. Važno je naglasiti kako je pri koncentraciji od $200 \mu\text{g/L}$ izoproturona inhibicija prirasta koncentracije ukupnih karotenoida bila značajno veća pri kontinuiranom izlaganju u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije u 2d te 3d-pulsu (Slika 24).



Slika 23. Koncentracija ukupnih karotenoida (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke u hranjivoj otopini s odgovarajućim koncentracijama metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,01$).



Slika 24. Inhibicija prirasta koncentracije ukupnih karotenoida (%) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tablica 9. Koncentracija ukupnih karotenoida (mg/g sv.tv.) u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		mg/g sv.tv.	Prirast (dan ⁻¹)	Inhibicija (%)
kontrola (metanol)	50 μ L/L	0,20 \pm 0,03 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	
	100 μ L/L	0,20 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	
	150 μ L/L	0,19 \pm 0,01 ^{ab}	0,06 \pm 0,00 ^{ab}	
	200 μ L/L	0,20 \pm 0,02 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	
2d-puls	50 μ g/L	0,20 \pm 0,00 ^a	0,06 \pm 0,00 ^a	0,63 \pm 1,32 ^a
	100 μ g/L	0,18 \pm 0,01 ^{bc}	0,06 \pm 0,00 ^{bc}	9,62 \pm 3,59 ^d
	150 μ g/L	0,16 \pm 0,00 ^{def}	0,05 \pm 0,00 ^{def}	18,29 \pm 2,12 ^c
	200 μ g/L	0,15 \pm 0,00 ^{efg}	0,05 \pm 0,00 ^{efg}	26,32 \pm 1,69 ^b
3d-puls	50 μ g/L	0,16 \pm 0,00 ^{cd}	0,05 \pm 0,00 ^{cd}	17,98 \pm 0,41 ^c
	100 μ g/L	0,16 \pm 0,01 ^{de}	0,05 \pm 0,00 ^{de}	18,31 \pm 3,12 ^c
	150 μ g/L	0,13 \pm 0,01 ^{gh}	0,04 \pm 0,00 ^{gh}	31,04 \pm 5,50 ^e
	200 μ g/L	0,12 \pm 0,01 ^{hi}	0,04 \pm 0,00 ^{hi}	41,46 \pm 2,90 ^f
kontinuirano	50 μ g/L	0,16 \pm 0,00 ^{cd}	0,05 \pm 0,00 ^{cd}	17,60 \pm 2,03 ^c
	100 μ g/L	0,15 \pm 0,01 ^{def}	0,05 \pm 0,00 ^{def}	23,82 \pm 5,41 ^b
	150 μ g/L	0,14 \pm 0,01 ^{fg}	0,04 \pm 0,00 ^{fg}	25,45 \pm 1,18 ^b
	200 μ g/L	0,10 \pm 0,01 ⁱ	0,03 \pm 0,00 ⁱ	48,78 \pm 3,28 ^g
F		92,699	92,699	209,44
P		<0,01	<0,01	<0,01

3.1.3. IC₅₀ vrijednosti na temelju mjerenih pokazatelja rasta biljaka

Tablica 10. IC₅₀ vrijednosti izračunate na temelju prirasta mjerenih pokazatelja rasta *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama herbicida izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje).

Parametar	IC ₅₀ (µg/L)		
	2d-puls	3d-puls	kontinuirano
Prirast broja biljaka	249,1 ± 25,18	227,4 ± 18,7	117,7 ± 4,3
Masa svježe tvari	259,8 ± 6	254,5 ± 13,4	127,6 ± 2,95
Masa suhe tvari	240,5 ± 56,9	221,7 ± 22,6	108,56 ± 9,14
Koncentracija Ch _{1a}	816,64 ± 67,5	460,7 ± 40,7	208,84 ± 11,7
Koncentracija Ch _{1b}	816,9 ± 180,1	260,9 ± 24,8	236 ± 25,2
Koncentracija Ch _{1a+b}	1275 ± 616,8	341,5 ± 43,7	245 ± 17,7
Omjer Ch _{1a/b}	126,05 ± 0,19	121,94 ± 1,31	122,72 ± 1,85
Koncentracija Car	703,7 ± 30,6	320,5 ± 68,05	235,6 ± 31,5
Koncentracija proteina	818,05 ± 54,22	681,4 ± 56,66	217,5 ± 16,99

Vrijednost kojom se iskazuje osjetljivost neke vrste na testiranu tvar je IC₅₀, odnosno ona koncentracija (µg/L) koja uzrokuje inhibiciju rasta u 50% testirane populacije. Vrijednosti IC₅₀ izračunate na temelju pokazatelja rasta nakon 21 dan tretmana *L. minor* različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje) prikazane su u tablici 10.

Budući da je prirast broja biljaka bio značajno inhibiran djelovanjem herbicida izoproturona, prema izračunatim IC₅₀ vrijednostima akumulacija svježe i suhe mase biljaka bila je osjetljivija na djelovanje navedenog herbicida. Prirast suhe mase bio je najosjetljiviji parametar rasta s IC₅₀ vrijednostima u rasponu od 108,56 ± 9,14 µg/L u kontinuiranom izlaganju do 240,5 ± 56,9 µg/L u 2d-pulsu. Međutim, najizraženije djelovanje herbicida izoproturona utvrđeno je pri svim testiranim koncentracijama u kontinuiranom izlaganju što se ujedno očituje i u izračunatim IC₅₀ vrijednostima (Tablica 10).

3.1.4. Utjecaj izoproturona na aktivnost antioksidacijskih enzima

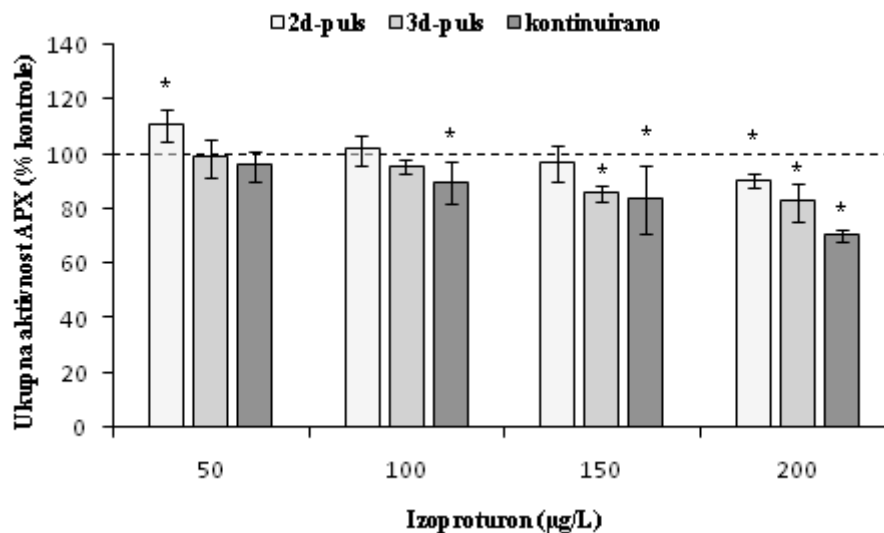
3.1.4.1. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost askorbat-peroksidaze

Ukupna aktivnost ($F=15,270$; $P<0,01$) i specifična aktivnost APX ($F=12,513$; $P<0,01$) u biljkama tretiranim izoproturonom u trajanju 21 dan značajno se razlikovala od aktivnosti u kontrolnim biljkama (Tablica 11).

Kada su biljke tretirane s $50 \mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivoj otopini u 2d-pulsu, utvrđeno je značajno povećanje ukupne aktivnosti APX, koje je bilo 10% veće u usporedbi s kontrolom. Aktivnost APX u druga dva uvjeta tretmana s ovom koncentracijom nije se značajno razlikovala od kontrole (Slika 26).

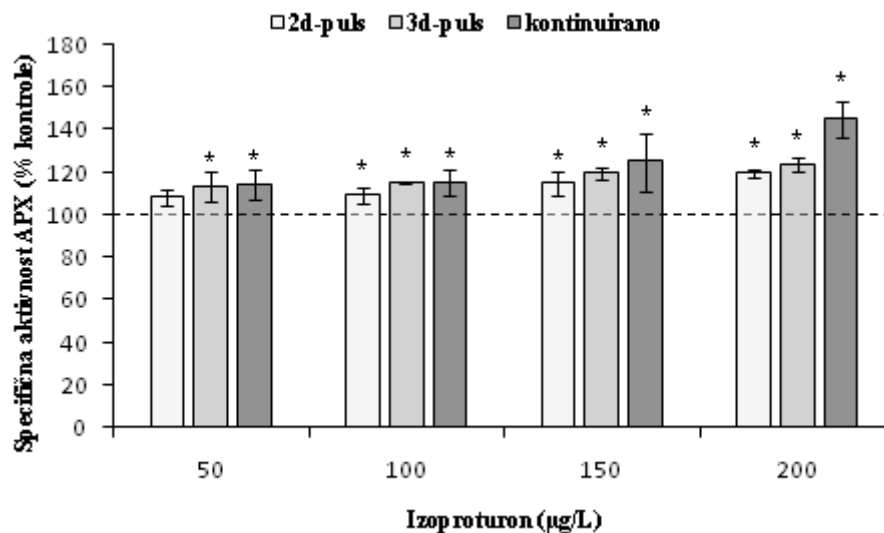
Pri tretmanu s $100 \mu\text{g/L}$ izoproturona ukupna aktivnost APX bila je značajno smanjena samo u kontinuiranom izlaganju, kada je bila za 10,3% manja u usporedbi s aktivnosti ovog enzima u kontrolnim biljkama. Ukupna aktivnost APX bila je značajno smanjena u svim uvjetima izloženosti, kada su biljke izlagane koncentraciji 100 i $200 \mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivoj otopini.

U biljkama koje su izoproturonu izlagane kontinuirano, utvrđeno je najveće smanjenje ukupne aktivnosti APX, pri čemu je aktivnosti bila 16,7% manja uz $150 \mu\text{g/L}$ te 30% manja uz dodatak $200 \mu\text{g/L}$ izoproturona u hranjivu otopinu. Analiza varijance pokazala je da je ukupna aktivnost APX ovisila i o uvjetima izloženosti i o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini (Slika 26).



Slika 26. Ukupna aktivnost APX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P<0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Statistički značajne razlike u specifičnoj aktivnosti enzima u usporedbi s kontrolom nisu utvrđene samo kod biljaka tretiranih s 50 µg/L herbicida u 2d-pulsu. Ista koncentracija herbicida značajno je povećala specifičnu aktivnost APX kada su biljke izlagane u 3d-pulsu ($13,4 \pm 6,76\%$ povećanje) kao i tijekom kontinuiranog ($14,3 \pm 7,0\%$ povećanje) izlaganja (Slika 27). Najveće povećanje aktivnosti utvrđeno je pri kontinuiranom izlaganju s dvije najveće koncentracije herbicida u hranjivoj otopini. U kontinuiranom tretmanu s 150 µg/L izoproturona specifična aktivnost APX bila je $25,12 \pm 13,67\%$ veća od kontrole, dok je u tretmanu s 200 µg/L aktivnost bila $44,72 \pm 8,49\%$ veća u usporedbi s kontrolnom vrijednosti.



Slika 27. Specifična aktivnost APX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD (n=12). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Važno je naglasiti kako specifična aktivnost APX kod biljaka koje su herbicidom tretirane u 2d i 3d-pulsu nije ovisila o koncentraciji samog herbicida (Slika 27). S druge strane, kada su biljke tretirane herbicidom u uvjetima kontinuirane izloženosti aktivnost APX ovisila je o koncentraciji herbicida u hranjivoj otopini, budući da je aktivnost APX značajno veća u tretmanu s 200 µg/L u usporedbi s djelovanjem ostalih koncentracija u istim uvjetima izlaganja.

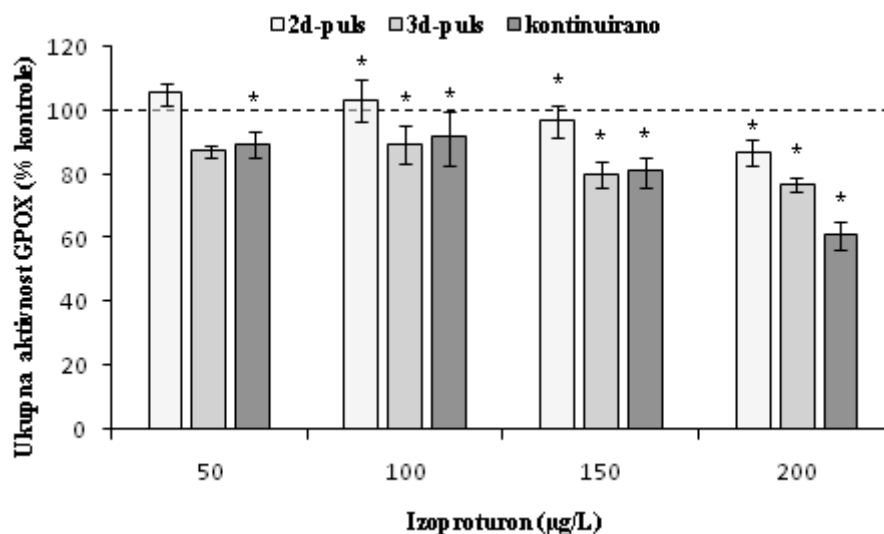
Tablica 11. Ukupna i specifična aktivnost APX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Ukupna aktivnost APX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ svježe tvari)	Specifična aktivnost APX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	$1,41 \pm 0,15^{\text{bc}}$	$0,24 \pm 0,02^{\text{ab}}$
	100 $\mu\text{L/L}$	$1,46 \pm 0,09^{\text{ab}}$	$0,24 \pm 0,01^{\text{bc}}$
	150 $\mu\text{L/L}$	$1,31 \pm 0,06^{\text{cde}}$	$0,22 \pm 0,01^{\text{a}}$
	200 $\mu\text{L/L}$	$1,29 \pm 0,07^{\text{de}}$	$0,22 \pm 0,01^{\text{a}}$
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$1,57 \pm 0,08^{\text{a}}$	$0,25 \pm 0,01^{\text{bcd}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$1,48 \pm 0,08^{\text{ab}}$	$0,27 \pm 0,01^{\text{de}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$1,27 \pm 0,09^{\text{ef}}$	$0,25 \pm 0,01^{\text{cd}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$1,17 \pm 0,03^{\text{fg}}$	$0,27 \pm 0,00^{\text{de}}$
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$1,40 \pm 0,10^{\text{bcd}}$	$0,27 \pm 0,02^{\text{de}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$1,39 \pm 0,03^{\text{bcde}}$	$0,28 \pm 0,00^{\text{e}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$1,13 \pm 0,03^{\text{g}}$	$0,27 \pm 0,01^{\text{de}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$1,10 \pm 0,02^{\text{g}}$	$0,27 \pm 0,01^{\text{de}}$
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	$1,35 \pm 0,07^{\text{bcde}}$	$0,27 \pm 0,02^{\text{de}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$1,31 \pm 0,11^{\text{cde}}$	$0,28 \pm 0,01^{\text{e}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$1,09 \pm 0,16^{\text{g}}$	$0,28 \pm 0,03^{\text{e}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$0,90 \pm 0,02^{\text{h}}$	$0,32 \pm 0,02^{\text{f}}$
F		15,270	12,513
P		<0,01	<0,01

3.1.4.2. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost gvajakol-peroksidaze

Utjecaj različitih koncentracija herbicida izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze nakon 21 dan izlaganja biljaka navedenom herbicidu prikazan je u tablici 12. Kada su biljke herbicidu izlagane u 2d-pulsu, statistički značajne razlike nisu utvrđene samo kod biljaka tretiranih s 50 $\mu\text{g/L}$ izoproturona (Slika 28). Prema rezultatima jednosmjerne analize varijance ($F=11,207$; $P<0,01$) statistički značajno smanjenje ukupne aktivnosti GPOX također nije utvrđeno samo kod biljaka tretiranih s najmanjom koncentracijom herbicida u 3d-pulsu.

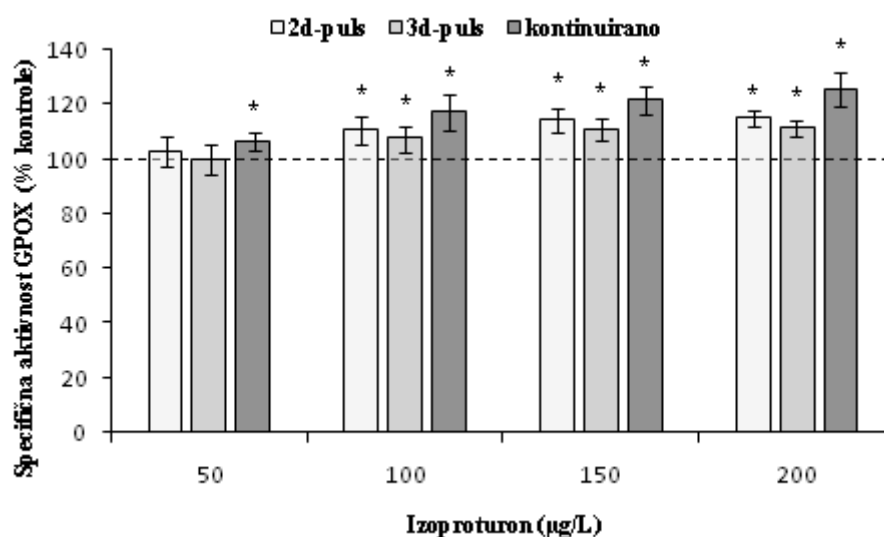
S druge strane, statistički značajno smanjenje ukupne aktivnosti GPOX utvrđeno je kod biljaka tretiranih svim koncentracijama izoproturona u kontinuiranom tretmanu. Pri tome je važno naglasiti kako je pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g/L}$ izoproturona smanjenje ukupne aktivnosti GPOX bilo značajno veće pri kontinuiranom izlaganju u usporedbi s djelovanjem istih koncentracija u 2d te 3d-pulsu (Slika 28).



Slika 28. Ukupna aktivnost GPOX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P<0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Statistički značajne razlike u specifičnoj aktivnosti GPOX nisu utvrđene samo kod biljaka tretiranih najmanjom koncentracijom herbicida izoproturona u 2d-pulsu. Prema rezultatima analize varijance ($F=10,942$; $P<0,01$) statistički značajne razlike specifične aktivnosti GPOX u biljkama također nisu utvrđene pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/L}$ herbicida u 3d-pulsu (Slika 29).

S druge strane, statistički značajno povećanje specifične aktivnosti GPOX utvrđeno je kod biljaka izlaganih svim koncentracijama herbicida u kontinuiranom tretmanu (25,54% povećanje specifične aktivnosti pri koncentraciji 200 $\mu\text{g/L}$). Međutim, važno je istaknuti da su pri svim koncentracijama izoproturona dobivene vrijednosti specifične aktivnosti enzima bile značajno veće pri kontinuiranom izlaganju u usporedbi s vrijednostima specifične aktivnosti GPOX u 2d i 3d-pulsu (Slika 29).



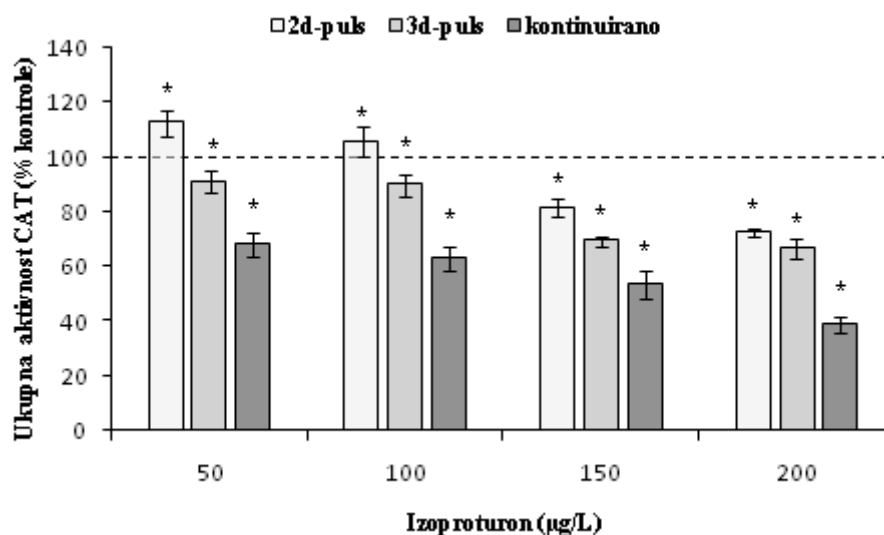
Slika 29. Specifična aktivnost GPOX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P<0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Tablica 12. Ukupna i specifična aktivnost GPOX u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Ukupna aktivnost GPOX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ svježe tvari)	Specifična aktivnost GPOX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	39,11 \pm 1,22 ^{bc}	6,49 \pm 0,23 ^{cd}
	100 $\mu\text{L/L}$	37,39 \pm 1,81 ^{ab}	6,23 \pm 0,28 ^{abc}
	150 $\mu\text{L/L}$	36,08 \pm 0,89 ^a	6,11 \pm 0,19 ^{ab}
	200 $\mu\text{L/L}$	35,41 \pm 0,42 ^a	6,06 \pm 0,13 ^a
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	41,17 \pm 1,32 ^{cde}	6,68 \pm 0,36 ^{de}
	100 $\mu\text{g/L}$	38,54 \pm 2,49 ^{de}	6,89 \pm 0,31 ^e
	150 $\mu\text{g/L}$	34,80 \pm 1,80 ^{ef}	6,99 \pm 0,26 ^{ef}
	200 $\mu\text{g/L}$	30,76 \pm 1,50 ^{ef}	6,96 \pm 0,17 ^{ef}
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	34,22 \pm 0,76 ^{bcd}	6,53 \pm 0,30 ^{bcd}
	100 $\mu\text{g/L}$	33,47 \pm 2,32 ^{cde}	6,69 \pm 0,31 ^{de}
	150 $\mu\text{g/L}$	28,83 \pm 1,51 ^{cde}	6,79 \pm 0,26 ^{de}
	200 $\mu\text{g/L}$	27,21 \pm 0,71 ^{cde}	6,76 \pm 0,17 ^{de}
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	34,95 \pm 1,63 ^{de}	6,91 \pm 0,22 ^{ef}
	100 $\mu\text{g/L}$	34,20 \pm 3,19 ^{fg}	7,30 \pm 0,42 ^{fg}
	150 $\mu\text{g/L}$	29,15 \pm 1,63 ^g	7,44 \pm 0,33 ^g
	200 $\mu\text{g/L}$	21,57 \pm 1,59 ^g	7,61 \pm 0,39 ^g
F		11,207	10,942
P		<0,01	<0,01

3.1.4.3. Utjecaj izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost katalaze

Utjecaj različitih koncentracija herbicida izoproturona na ukupnu i specifičnu aktivnost enzima katalaze nakon 21 dan izlaganja biljaka navedenom herbicidu prikazan je u tablici 13. Prema rezultatima analize varijance ($F=150,56$; $P<0,01$) ukupna aktivnost katalaze značajno se razlikovala od aktivnosti kontrolnih biljaka. Kada su biljke herbicidu izlagane u 2d-pulsu, statistički značajne razlike u ukupnoj aktivnosti CAT utvrđene su pri svim koncentracijama herbicida. Nadalje, kada su biljke herbicidu izlagane u 3d-pulsu, statistički značajno smanjenje ukupne aktivnosti CAT utvrđeno je također pri svim koncentracijama herbicida (Slika 30).

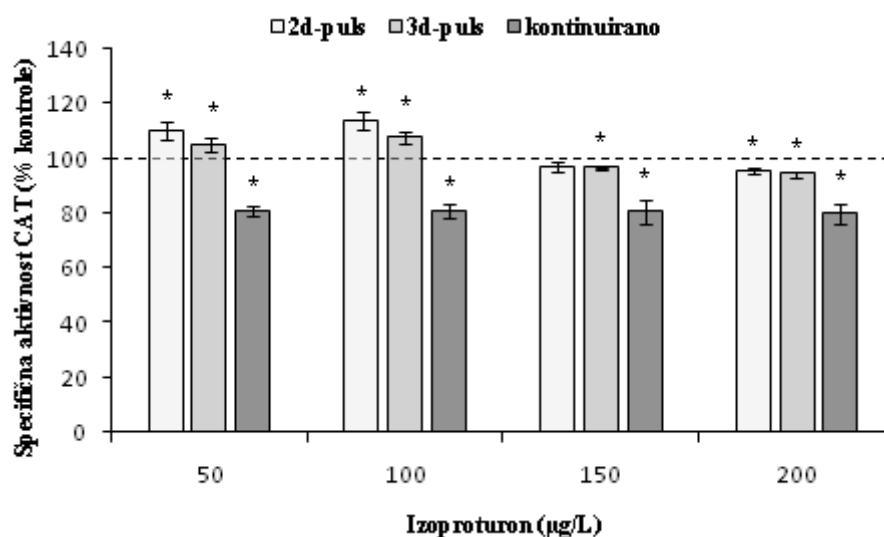


Slika 30. Ukupna aktivnost CAT u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P<0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Najznačajnije djelovanje svih testiranih koncentracija herbicida na ukupnu aktivnost CAT utvrđeno je pri kontinuiranom izlaganju. Ukupna aktivnost navedenog enzima bila je u prosjeku 61,21% manja u odnosu na odgovarajuću kontrolu u kontinuiranom izlaganju izoproturonu pri koncentraciji od 200 µg/L.

Važno je naglasiti kako je ista koncentracija herbicida uzrokovala statistički značajno smanjenje ukupne aktivnosti CAT kako u 2d tako i u 3d-pulsu u odnosu na kontrolne biljke. Međutim, to je smanjenje bilo značajno manje od smanjenja ukupne aktivnosti CAT u kontinuiranom izlaganju (Slika 30).

Statistički značajne razlike specifične aktivnosti CAT nisu utvrđene samo kod biljaka tretiranih sa 150 µg/L izoproturona u 2d-pulsu (Slika 31). Jednosmjerna analiza varijance je pokazala statistički značajne razlike u specifičnoj aktivnosti CAT kod biljaka tretiranih svim koncentracijama herbicida u 3d-pulsu. Prema rezultatima jednosmjerne analize varijance ($F=96,099$; $P<0,01$) statistički značajne razlike smanjenja specifične aktivnosti CAT utvrđene su kod biljaka tretiranih svim koncentracijama izoproturona u kontinuiranom tretmanu izlaganja (Slika 31).



Slika 31. Specifična aktivnost CAT u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Prikazani rezultati su srednja vrijednost \pm SD ($n=12$). Rezultati označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrolne vrijednosti (ANOVA, LSD test, $P<0,01$). Kontrola (-----) predstavlja biljke u hranjivoj otopini s dodatkom odgovarajuće koncentracije metanola.

Tablica 13. Ukupna i specifična aktivnost CAT u *L. minor* nakon 21 dan tretmana različitim koncentracijama izoproturona u tri uvjeta izloženosti (2d-puls, 3d-puls i kontinuirano izlaganje). Kontrola predstavlja biljke uzgajane u hranjivoj otopini s odgovarajućim volumenom metanola. Prikazani rezultati su srednja vrijednosti \pm SD (n=12). Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,01$).

Tretman		Ukupna aktivnost CAT ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ svježe tvari)	Specifična aktivnost CAT ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteina)
kontrola (metanol)	50 $\mu\text{L/L}$	$7,68 \pm 0,33^{\text{bc}}$	$1,27 \pm 0,03^{\text{c}}$
	100 $\mu\text{L/L}$	$7,34 \pm 0,26^{\text{cd}}$	$1,22 \pm 0,03^{\text{d}}$
	150 $\mu\text{L/L}$	$7,08 \pm 0,24^{\text{de}}$	$1,20 \pm 0,02^{\text{de}}$
	200 $\mu\text{L/L}$	$6,95 \pm 0,12^{\text{ef}}$	$1,19 \pm 0,01^{\text{def}}$
2d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$8,64 \pm 0,37^{\text{a}}$	$1,40 \pm 0,04^{\text{a}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$7,77 \pm 0,41^{\text{b}}$	$1,39 \pm 0,04^{\text{a}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$5,78 \pm 0,24^{\text{g}}$	$1,16 \pm 0,02^{\text{g}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$5,02 \pm 0,11^{\text{h}}$	$1,14 \pm 0,02^{\text{g}}$
3d-puls	50 $\mu\text{g/L}$	$7,01 \pm 0,33^{\text{de}}$	$1,34 \pm 0,03^{\text{b}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$6,59 \pm 0,30^{\text{f}}$	$1,32 \pm 0,03^{\text{b}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$4,92 \pm 0,14^{\text{hi}}$	$1,16 \pm 0,00^{\text{fg}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$4,51 \pm 0,05^{\text{j}}$	$1,12 \pm 0,01^{\text{g}}$
kontinuirano	50 $\mu\text{g/L}$	$5,22 \pm 0,35^{\text{h}}$	$1,03 \pm 0,03^{\text{h}}$
	100 $\mu\text{g/L}$	$4,62 \pm 0,30^{\text{ij}}$	$0,99 \pm 0,03^{\text{i}}$
	150 $\mu\text{g/L}$	$3,79 \pm 0,34^{\text{k}}$	$0,96 \pm 0,05^{\text{i}}$
	200 $\mu\text{g/L}$	$2,70 \pm 0,22^{\text{l}}$	$0,95 \pm 0,04^{\text{g}}$
F		150,56	96,099
P		<0,01	<0,01

4. Rasprava

Primjena herbicida ima vrlo važnu ulogu u kontroli rasta i suzbijanju nepoželjnih, odnosno korovskih biljnih vrsta u konvencionalnoj poljoprivrednoj proizvodnji. Međutim, primjena sintetičkih herbicida predstavlja glavni uzrok onečišćenja okoliša. Štoviše, i uz njihovu pravilnu primjenu i korištenje, herbicidi predstavljaju svojevrsan „rizik“, upravo zbog svoje postojanosti, biodostupnosti i mobilnosti u ekosustavu (Arias-Estévez i sur., 2008).

Jedan od najznačajnijih predstavnika fenilurea herbicida je izoproturon [3-(4-izopropilfenil)-1,1-dimetilurea]. Ovaj se selektivni i sistemski herbicid upotrebljava za suzbijanje jednogodišnjih uskolisnih i širokolisnih korova u žitaricama. Fitotoksično djelovanje ispoljava inhibicijom fotoovisnog elektron transportnog lanca u tilakoidima kloroplasta na razini fotosustava II, uzrokujući pritom senescenciju kloroplasta, narušavanje fizioloških i metaboličkih procesa u biljkama te naposljetku i propadanje biljnih stanica (Ducruet, 1991; Vermaas, 1993).

Za istraživanje utjecaja izoproturona na fiziološke promjene u ne-ciljnim vrstama, kao što su vodene leće, pratio se broj biljaka kao pokazatelj rasta. Izoproturon je toksičan za *L. minor* s obzirom da je utvrđena značajna inhibicija prirasta broja biljaka nakon 21 dan tretmana (Tablica 4). Rast vrste *L. minor* osjetljiv je pokazatelj toksičnog djelovanja raznih herbicida. Rezultati eksperimenta Gatidou i sur. (2014) pokazuju da fenilurea herbicidi monolinuron, linuron te diuron imaju izrazito toksični učinak na rast *L. minor*. Nadalje, herbicid diuron u koncentraciji 25 µg/L inhibira rast *L. minor* za čak 50% (Teisseire i sur., 1999). Nitschke i sur. (1999) utvrdili su da 60 µg/L izoproturona u hranjivoj otopini uzrokuje 50%-tnu inhibiciju rasta *L. minor* nakon 7 dana tretmana. S druge strane, istraživanje Dosnon-Olette (2011) pokazalo je da izoproturon ima značajan inhibitorni učinak na rast vodene leće već unutar prvih 24 h od početka tretmana znatno nižim koncentracijama herbicida u usporedbi s koncentracijama testiranim u ovom radu. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da je rast vodene leće bio 17% manji kada su biljke tretirane s 5 µg/L u usporedbi s rastom kontrolnih biljaka. Inhibicija rasta utvrđena je i kod drugih vrsta vodenih makrofita tretiranih izoproturonom. Rast vrste *Elodea densa* izrazito je smanjen nakon 21 dan tretmana s 10 µg/L izoproturona dok koncentracija od 200 µg/L uzrokuje potpunu inhibiciju rasta ove vrste (Feurtet-Mazel i sur., 1996; Rana i Kumar, 1995).

Rezultati prijašnjih studija dobiveni tretiranjem *L. minor* izoproturonom u kulturi *in vitro*, pokazuju kako IC₅₀ na temelju prirasta broja biljaka i svježe mase doseže vrijednost od 35 µg/L nakon 10 dana izlaganja biljaka navedenom herbicidu (Kirby i Sheahan, 1994).

Prilikom utvrđivanja inhibitornog učinka ksenobiotika na rast vodenih leća, prirast broja biljaka može dovesti do zaključka manje osjetljivosti u usporedbi s drugim parametrima rasta. U stresnim uvjetima, frondovi mogu biti vrlo sitni, a njihov ukupan broj i dalje visok. Dodatno, sam broj biljaka ne pokazuje jesu li biljke žive ili mrtve (Žaltauskaitė i sur., 2014). Stoga se u istraživanjima toksičnog djelovanja ksenobiotika kao pokazatelj rasta vodenih leća često koriste i prirast svježe i suhe mase. Iako je prirast broja biljaka bio značajno inhibiran djelovanjem izoproturona, prema izračunatim IC₅₀ vrijednostima akumulacija svježe i suhe mase bila je osjetljivija na djelovanje ovog herbicida (Tablica 10). Prirast suhe mase bio je najosjetljiviji parametar rasta s IC₅₀ vrijednostima u rasponu od 108,56 ± 9,14 µg/L u kontinuiranom izlaganju do 240,5 ± 56,9 µg/L u uvjetima 2d-pulsa. Inhibicija akumulacije biomase može biti posljedica smanjene fotosintetske aktivnosti uslijed značajne redukcije koncentracije fotosintetskih pigmenata te poremećaja u metabolizmu sinteze proteina (Khan i sur., 2006).

Koncentracija fotosintetskih pigmenata može biti izrazito dobar pokazatelj toksičnosti ksenobiotika na primarne producente u vodenim ekosustavima. Wang (1990) je pokazao da smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata može biti i puno bolji indikator toksičnosti herbicida od stope rasta biljaka. Tretman izoproturonom značajno je smanjio koncentraciju fotosintetskih pigmenata *L. minor* 21 dan nakon početka tretmana. Smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata najčešće je posljedica ultrastrukturnih promjena u kloroplastima te ukazuje na procese peroksidacije membranskih lipida (Xu i sur., 2010). Osim toga, toksično djelovanje ksenobiotika dovodi do povećane stope degradacije, kao i smanjenja sinteze fotosintetskih pigmenata (Gupta i Chandra, 1998; Ding i sur., 2007). Smanjene koncentracije klorofila rezultirat će smanjenjem fotosintetske aktivnosti uslijed čega dolazi do smanjenja stope rasta biljke (Tewari i sur., 2004). Smanjena fotosintetska aktivnost za posljedicu ima inhibiciju fiksacije ugljika što značajno utječe na fiziološko stanje biljke (Xu i sur., 2010). Smanjenje koncentracija fotosintetskih pigmenata u *L. minor* tretiranim izoproturonom u skladu je s mehanizmom djelovanja ovog herbicida. Izoproturon pripada skupini fenilurea herbicida. Mehanizam njihova djelovanja temelji se na sprječavanju protoka elektrona u PSII (Arnaud i sur., 1994; Ducruet, 1991; Lichtenthaler i Rinderle, 1988). Blokada transporta elektrona postiže se vezanjem molekula izoproturona na plastokinonske Q_B domene D1

proteina smještenog na tilakoidnim membranama kloroplasta (Krause i Weis, 1991; Draber i sur., 1991; Conrad i sur., 1993). Istraživanja koje su pratila *in vivo* fluorescenciju klorofila nakon tretiranja biljaka herbicidima potvrdila su kako se proces zasićenja PSII može objasniti specifičnim vezivanjem izoproturona na D1 protein (Feurtet-Mazel i sur., 1996; Haddad i sur., 1992; Laasch i sur., 1981; Ponte-Freitas i sur., 1991). Budući da je vezanjem herbicida na D1 protein cjelokupni proces fotosinteze blokiran, biljka apsorbira više svjetlosne energije nego li je može iskoristiti. Kao rezultat navedenog u biljnom tkivu dolazi do oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije te oštećenja staničnih komponenti koje mogu rezultirati i smrću biljke (Krieger-Liszkay, 2005). Međutim, najveća koncentracije izoproturona koja je testirana u ovom istraživanju (200 µg/L), nije uzrokovala potpuno propadanje biljaka, unatoč visokom postotku inhibicije prirasta. Nekolicina frondova ostala je zelena unatoč dugotrajnom periodu izlaganja. S obzirom da izoproturon ne uzrokuje potpunu inhibiciju PSII, čak i vrlo mala količina elektrona može biti dovoljna da se osigura preživljavanje biljaka (Van Assche, 1984). Biljke, da bi nadoknadile smanjenu fotokemijsku pretvorbu koju uzrokuje herbicid, tada povećavaju stopu efikasnosti zadržavanja fotona u fotosintetskom sustavu (Fedtke, 1982).

Budući da se u biljkama više smanjivala koncentracija Chl*b*, nego koncentracija Chl*a*, utvrđeno je značajno povećanje omjera Chl*a/b* pri najvećoj koncentraciji herbicida izoproturona u 3d-pulsu (Slika 21). Navedeno povećanje omjera Chl*a/b* može biti posljedica konverzije Chl*b* u Chl*a* do koje dolazi uslijed mehanizama degradacije fotosintetskih pigmenata (Fang i sur., 1998). Prema izračunatim IC₅₀ vrijednostima izoproturon je najizraženije djelovanje na fotosintetske pigmente imao u kontinuiranom izlaganju.

Karotenoidi su skupina neenzimskih antioksidansa topivih u lipidima koji direktno sudjeluju u zaštiti biljnih stanica od štetnih ROS-a (Hou i sur., 2007). Najniže vrijednosti ukupnih CAR utvrđene su pri koncentraciji od 200 µg/L herbicida izoproturona u svim tretmanima, kada je ujedno zabilježena i najveća stopa inhibicije prirasta ovih pigmenata (Tablica 9). Izoproturon je pokazao i značajno veću inhibiciju koncentracije karotenoida kako se produžavalo vrijeme izlaganja s najmanjim utjecajem u 2d-puls izlaganju, dok je najveća inhibicija utvrđena nakon 21 dan kontinuiranog izlaganja (Slika 24). Biljke sa smanjenim koncentracijama CAR nemaju učinkovit mehanizam disipacije suviška ekscitacijske energije u obliku topline, kao niti mehanizme gašenja tripletnog stanja klorofila pri čemu nastaju molekule singletnog kisika i drugi oblici ROS-a (Karuppanapandian i sur., 2011).

S druge strane, uslijed niskih koncentracija karotenoida u tkivima, javlja se mehanizam fotooksidacije klorofila (Dankov i sur., 2009). Budući da se obrambeni mehanizam karotenoida temelji na procesima stabilizacije lipida tilakoidnih membrana kloroplasta, u biljnim se stanicama koje imaju snižene koncentracije CAR odvija proces lipidne peroksidacije (Havaux, 1998). Smanjenje koncentracije ukupnih CAR, kao i smanjenje koncentracije Chla i Chlb u *L. minor* uzrokovano tretmanom različitim koncentracijama herbicida izoproturona, važan je pokazatelj oštećenja fotosintetskog sustava.

Koncentracija ukupnih proteina u organizmu biljaka, pokazatelj je raznih ireverzibilnih i reverzibilnih promjena metabolizma te se često mijenja u doticaju s okolišnim faktorima stresa (Piotrowska i sur., 2010; Doganlar i Atmaca, 2011). U ovom se eksperimentu koncentracija proteina u tkivu *L. minor* smanjivala s povećanjem koncentracije izoproturona u hranjivoj otopini (Slika 13). Jedino najniža koncentracija izoproturona (50 µg/L) u hranjivoj otopini nije imala statistički značajan učinak na koncentraciju proteina, dok su preostale koncentracije značajno utjecale na smanjenje koncentracije proteina u biljkama. Nizak sadržaj proteina u tkivu biljaka predstavlja jasan pokazatelj stresa, odnosno smanjenja normalne metaboličke aktivnosti biljaka (Bonjoch i Tamayo, 2001). Nasuprot navedenom, sadržaj proteina u biljkama izloženim stresnim faktorima može biti i povišen uslijed aktivacije brojnih procesa poput osmotske regulacije, sinteze proteina *de novo*, antioksidacijske obrane te brojnih drugih fizioloških mehanizama (Bonjoch i Tamayo, 2001). Smanjenje koncentracije proteina, kao što je slučaj i s drugim praćenim pokazateljima djelovanja izoproturona na *L. minor*, bilo je najizraženije u kontinuiranom izlaganju. Za razliku od sulfonilurea herbicida koji inhibiraju sintezu razgranatog lanca aminokiselina u biljnom tkivu (Mohammad i sur., 2006), oporavak metaboličkih aktivnosti biljaka nakon izloženosti fenilurea herbicidima inhibitorima PSII, poput izoproturona, obično se odvija veoma brzo (Heber i sur., 1988; Snel i sur., 1998).

Kada su biljke izložene ksenobiotiku, u vrlo kratkom vremenskom periodu reagiraju na molekularnoj razini promjenom ekspresije gena (Akhtar i sur., 2005; Jamers i sur., 2006). U tom vremenskom periodu organizam akumulira ili crpi metaboličke produkte, te vrlo brzo započinje i proces aktivacije sustava detoksifikacije koji se temelji na različitim reakcijama oksidacije, redukcije i/ili hidrolize, konjugacije i sekundarne konjugacije nakon čega slijedi imobilizacija, raspodjela i/ili postupak metaboličke razgradnje ksenobiotika (Kreuz i Martinoia, 1999; Kreuz i sur., 1996). Izoproturon, kao i drugi herbicidi iz skupine inhibitora PSII, u biljnim stanicama dovode do pojave oksidacijskog stresa koji uzrokuje oštećenje

proteina, lipida i drugih staničnih komponenti, što posljedično dovodi do inhibicije rasta ili smrti biljaka (Rutherford i Krieger-Liszkay, 2001). Pojava oksidacijskog stresa u *L. minor* tretiranih izoproturonom pokreće mehanizme zaštite stanice od nastalih oštećenja. Prema Teisseire i Vernet (2000) antioksidacijski enzimi upravo zbog svoje osjetljivosti mogu biti korisni biološki biomarkeri kakvoće vode. Testovi, koji uz morfološke promjene i promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata, prate i aktivnosti antioksidacijskih enzima kao bioloških biomarkera, mogu dati specifičnije i preciznije odgovore na toksične učinke ksenobiotika (Babu i sur., 2005).

Povećanje aktivnosti APX obično se povezuje s povećanjem koncentracije H₂O₂ u biljnim stanicama, upravo zbog toga jer je H₂O₂ glavna signalna molekula u indukciji aktivnosti navedenog enzima (Prasad i sur., 1994; Karpinski i sur., 1999). Tretman izoproturonom povećao je specifičnu aktivnost APX u kontinuiranom scenariju te pulsnim izlaganjima ovom herbicidu. Najveće vrijednosti specifične aktivnosti APX utvrđene su pri kontinuiranom tretmanu *L. minor* s dvije najveće koncentracije herbicida u hranjivoj otopini (Slika 27). Uz porast aktivnosti APX, utvrđen je i značajan skok u specifičnoj aktivnosti GPOX kod biljaka tretiranih izoproturonom koncentracije većih od 50 µg/L u svim uvjetima izloženosti (Slika 27). Povećane aktivnosti peroksidaza mogu biti indikatori promjena mehaničkih svojstava staničnih stijenki uslijed povećane sinteze lignina koji ima ulogu mehaničke prepreke za ulazak molekula ksenobiotika u biljne stanice (Hegedüs i sur., 2001). Značajno povećanje aktivnosti APX i GPOX, s ciljem detoksifikacije H₂O₂, pokazatelj je oksidativnog stresa u stanicama *L. minor* tretiranih herbicidom (Jianga i sur., 2010). Povećanje aktivnosti peroksidaza uzrokovano izoproturonom utvrđeno je i kod drugih vrsta biljaka i algi (Bi i sur., 2012; Xiao i sur., 2008).

Katalaza (CAT) je jedan od glavnih enzima koji uklanjaju H₂O₂ u biljnim stanicama (Mittler, 2002). Za razliku od aktivnosti peroksidaza koje su pokazale porast specifične aktivnosti, u *L. minor* izoproturon je uzrokovao značajno smanjenje specifične aktivnosti CAT tijekom kontinuiranog izlaganja (Slika 31). Izlaganje *L. minor* diuronu, također inhibitoru PSII, rezultirao je značajnim padom aktivnosti enzima CAT već nakon 6 h izlaganja (Teisseire i Vernet, 2000). Smanjenje aktivnosti CAT može biti posljedica promjena u mehanizmima sinteze podjedinica ovog enzima, kao i inaktivacije ili proteolitičke razgradnje katalaze peroksisomalnim proteazama (MacRae i Ferguson, 1985; Cakmak, 2000). S obzirom na važnost CAT u metabolizmu vodikovog peroksida, gubitak aktivnosti ovog enzima smanjuje sposobnost stanice da se nosi s povećanjem koncentracije ROS-a.

Utjecaj herbicida na vrstu *L. minor* ovisio je i o načinu primjene. Najizraženije djelovanje izoproturona utvrđeno je pri svim testiranim koncentracijama u kontinuiranom izlaganju što se očituje i u izračunatim IC₅₀ vrijednostima (Tablica 10). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima Boxall i sur. (2013) koji su utvrdili da je nakon 42 dana tretmana izoproturon najtoksičniji bio u kontinuiranom izlaganju u usporedbi s pulsним izlaganjem.

Utjecaj ksenobiotika u pulsnom izlaganju ovisi o unosu, degradaciji i disipaciji testirane tvari kao i potencijalu biljke da se oporavi (Boxall i sur., 2013). Vodena leća, *L. minor* ima sposobnost akumulacije izoproturona te vrlo malu sposobnost njegova metabolizma (Böttcher i Schroll, 2007). Vodena leća, *L. minor* akumulirala je oko 9% koncentracije izoproturona iz hranjive otopine tijekom 21 dan tretmana (Dosnon-Olette i sur., 2011). Ove spoznaje ukazuju na perzistentnost izoproturona u slatkovodnim ekosustavima i potencijalnu opasnost za cijeli ekosustav zbog bioakumulacije u ne-ciljnim vrstama primarnih producenata.

Prijašnja istraživanja pokazala su da je rast vodenih makrofita i algi inhibiran pri pulsним izlaganjima inhibitorima PSII, ali i da se rast relativno brzo oporavlja nakon jednog izlaganja (Cedergreen i sur., 2005; Drost i sur., 2003; Klaine i sur., 1997; Vallotton i sur., 2008). Međutim, vodena flora u prirodi nije izložena samo jednoj kratkotrajnoj dozi, nego vrlo često dolazi do nekoliko uzastopnih povećanja koncentracije ksenobiotika u vodenom okolišu između kojih je period mogućeg oporavka biljaka (Müller i sur., 2002; Leu, 2003). Smatra se da su se biljke oporavile ako nakon prestanka djelovanja herbicida, dan za danom postignu prirast jednak prirastu kontrolnih biljaka (Rosenkrantz i sur., 2013). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su se biljke oporavile samo nakon izlaganja nižim testiranim koncentracijama izoproturona (50 i 100 µg/L) i to u 2d-pulsnom izlaganju. Naime, samo u tim tretmanima biljke su postigle prirast broja biljaka isti kao prirast kontrolnih skupina (Slika 6). Generalno, visoke koncentracije uzrokuju veću inhibiciju prirasta što rezultira dužim vremenom oporavka. Slične rezultate utvrdili su i Rosenkrantz i sur. (2013) nakon izlaganja vrste *L. gibba* herbicidima tijekom 24 h nakon čega je oporavak praćen 7 dana. Mohammad i sur. (2006) utvrdili su da se rast *L. minor* oporavljao se i nakon pulsnoг izlaganja različitim sulfonilurea herbicidima. Čak i pri dugačkim tretmanima, može doći do oporavka biljaka nakon prestanka djelovanja herbicida. Primjerice, *L. minor* oporavila se nakon čak četiri tjedna tretmana s ciklosulfamuronom kada je njegova koncentracija bila manja od 10 µg/L (Mohammad i sur., 2006). U ovom istraživanju, rast vodene leće tretirane s tri uzastopna kraća pulsa (2 dana) nižim koncentracijama izoproturona, potpuno se oporavio unutar 21 dan eksperimenta.

S druge strane, iako je zabilježen blagi oporavak biljaka koje su tretirane višim koncentracijama herbicida kao i dužim trajanjem pulsa (3 dana), rast se nije potpuno oporavio za vrijeme trajanja eksperimenta. Dakle, nakon izlaganja visokim koncentracijama herbicida, biljkama je potrebno duže vrijeme za oporavak te oporavak duže traje ako je i trajanje tretmana bilo duže.

Vrlo je mali broj studija ispitivao utjecaj višestrukih pulsnih izlaganja te proučavao učinke pulsnih intervala i frekvencija (Naddy i sur., 2000; Parsons i Surgeoner, 1991). Iako se ove studije obično izvode i temelje na relativno kratkom periodu izlaganja, prvenstveno s naglaskom na mortalitet ciljnog organizma, dobiveni rezultati ukazuju na to da višestruka pulsna izloženost, može rezultirati manjim učincima u usporedbi s kontinuiranim izlaganjem istoj ili čak nižoj koncentraciji. Organizmi su u mogućnosti detoksificirati akumuliranu tvar u periodu između nekoliko uzastopnih pulsnih doza (Breck, 1988; Wright, 1976), gdje je potencijal oporavka organizma definiran trajanjem intervala između dva izlaganja i toksičnim učinkom testirane tvari. Osim toga, može se pojaviti biokemijska prilagodba organizma, pri čemu prvi puls može potaknuti prilagodbu ciljnog organizma na prisutnost herbicida promjenama u biokemijskim mehanizmima. Početni će puls selekcijom manje otpornih jedinki, dovesti do preživljavanja i opstanka tolerantnih i robusnih jedinki u populaciji (Dauterman, 1994; Parrott i sur., 1995).

S druge strane, postoje i primjeri veće toksičnosti pulsne izloženosti od ekvivalentne kontinuirane izloženosti. Primjerice, permetrin pokazuje pojačanu toksičnost kada su organizmi izloženi dvama uzastopnim jednosatnim pulsevima u intervalima od 6 h, u usporedbi s kontinuiranim dvosatnim izlaganjem (Parsons i Surgeoner, 1991). Dakle, za što točniju i realniju procjenu pulsirajućeg učinka herbicida na okoliš, od ključne je važnosti procijeniti učestalost izloženosti tijekom postupka procjene rizika od herbicida. Nekoliko se posebno dizajniranih eksperimentalnih pristupa mogu koristiti za tu svrhu, uključujući upotrebu specifičnih modela ili vremenski-ponderiranih prosjeka, koji se izračunavaju na temelju prosječnih koncentracija herbicida tijekom perioda izlaganja te se naknadno uspoređuju sa standardnim toksikološkim podacima. Standardni testovi toksičnosti uglavnom se temelje na kontinuiranim izlaganjima relativno visokim koncentracijama testirane tvari i ne uzimaju u obzir potencijal oporavka organizama nakon prestanka izloženosti. Ovo istraživanje pokazalo je da iako pulsno izlaganje dovodi do smanjenja produkcije biomase, biljke se uspješno oporavljaju relativno brzo nakon prestanka izloženosti izoproturonu.

Međutim, učinci pulsnog izlaganja ne smiju se zanemarivati samo zato što se testni organizam brzo oporavlja. U slučaju makrofita, smanjenje produkcije biomase i smanjenje stope rasta može rezultirati promjenama u sastavu ekosustava pri čemu se smanjenjem zastupljenosti osjetljivijih vrsta oslobađa prostor za rast i razvoj otpornijih vrsta ili čak invazivnih vrsta čime se utječe na čitavu hranidbenu mrežu (Rosenkrantz i sur., 2013).

5. Glavni rezultati i zaključak

Herbicid izoproturon toksičan je za *L. minor*, što je pokazala inhibicija rasta broja biljaka te smanjena akumulacija svježe i suhe mase biljaka. Smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida, kao i smanjenje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b* u *L. minor* uzrokovano djelovanjem izoproturona, važan je pokazatelj oštećenja fotosintetskog sustava i u skladu je s mehanizmom djelovanja ovog herbicida. Značajna odstupanja aktivnosti antioksidacijskih enzima askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze i katalaze pod utjecajem izoproturona u odnosu na kontrolne vrijednosti ukazala su na oksidacijski stres u stanicama *L. minor*.

Najizraženije djelovanje izoproturona u testiranim uvjetima izloženosti (kontinuirano izlaganje, 2d i 3d puls) utvrđeno je pri svim testiranim koncentracijama u kontinuiranom izlaganju, dok je višestruka pulsna izloženost izoproturonu istih koncentracija imala manji učinak na *L. minor*.

Potpuni oporavak rasta vodene leće tretirane u tri uzastopna 2d-pulsa nižim koncentracijama izoproturona postignut je unutar 21 dan. U tretmanu s višim koncentracijama i u dužem trajanju (3d-puls) zabilježen je blagi oporavak biljaka, no stopa rasta nije se potpuno oporavila za vrijeme trajanja eksperimenta. Prema tome, nakon izlaganja biljaka višim koncentracijama herbicida i duljem trajanju tretmana, biljkama je bilo potrebno više vremena za oporavak. U oba uvjeta izloženosti *L. minor* herbicidu izoproturonu rast biljaka je bio inhibiran tijekom svakog perioda izlaganja, što je kumulativno dovelo do smanjene biomase na kraju eksperimenta.

Zbog toksičnog djelovanja herbicida izoproturona na ne-ciljnu vrstu *L. minor*, postoji mogućnost negativnog utjecaja ovog ksenobiotika na biljne zajednice u vodenim ekosustavima. Stoga ovakva istraživanja, uz primjenu standardnih testova toksičnosti, mogu doprinijeti točnijoj procjeni rizika utjecaja na okoliš.

6. Literatura

Adams SM, Giesy JP, Tremblay LA, Eason CT. 2001. The use of biomarkers in ecological risk assessment: Recommendations from the Christ church conference on biomarkers in ecotoxicology. *Biomarkers* 6:1-6.

Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzym* 105:121-126.

Akhtar TA, Lampi MA, Greenberg BM. 2005. Identification of six differentially expressed genes in response to copper exposure in the aquatic plant *Lemna gibba* (Duckweed). *Environ Toxicol Chem* 24:1705-1715.

Arias-Estévez M, Lopez-Periago E, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J, Mejuto JC, Garcia-Rio L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric Ecosyst Environ* 123:247–260.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601-639.

Asada K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141(2):391-396.

Awuah E, Oppong-Peprah M, Lubberding HJ, Gijzen HJ. 2004. Comparative performance studies of water lettuce, duckweed, and algal-based stabilization ponds using low-strength sewage. *J Toxicol Environ Heal A* 67:1727–1739.

Babu ST, Tripuranthakam S, Greenberg BM. 2005. Biochemical responses of the aquatic higher plant *Lemna gibba* to a mixture of copper and 1,2-dihydroxyanthraquinone: Synergistic toxicity via reactive oxygen species. *Environ Toxicol Chem* 24:3030-3036.

Backhaus T, Faust M, Scholze M, Gramatica P, Vighi M, Horst-Grimme, L. 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ Toxicol Chem* 23(2):258-264.

Balsiger C, Niederhauser P, Jäggi O, Meier W. 2007. Gewässerbelastung durch Pestizide. *Gas Wasser Abwasser* 3:177–185.

Berenzen N, Lentzen-Godding A, Probst M, Schulz H, Schulz R, Liess M. 2005. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 58:683–691.

- Bhatti MA, Al-Khatib K, Felsot AS, Parker R, Kadir S. 1995. Effects of simulated chlorsulfuron drift on fruit yield and quality of sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Environ Toxicol Chem* 14:537–544.
- Bi YF, Miao SS, Lu YC, Qiu CB, Zhou Y, Yang H. 2012. Phytotoxicity, bioaccumulation and degradation of isoproturon in green algae. *J Hazard Mater* 243:242-249.
- Bonjoch NP, Tamayo PR. 2001. Protein content quantification by Bradford method. Ed: Reigosa Roger, MJ (ed.) *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, 283-295 pp.
- Böttcher T, Schroll R. 2007. The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. *Chemosphere* 66(4):684-689.
- Boutin C, Lee HB, Peart ET, Batchelor PS, Maguire RJ. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron-methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environ Toxicol Chem* 19:2532–2541.
- Boxall ABA, Brown CD, Barrett K. 2002. Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest Manag Sci* 58:637–648.
- Boxall ABA, Fogg L, Ashauer R, Bowles T, Sinclair CJ, Colyer A, Brain RA. 2013. Effects of repeated pulsed herbicide exposures on the growth of aquatic macrophytes. *Environ Toxicol Chem* 32:193-200.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brain RA, Cedergreen N. 2009. Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility. *Rev Environ Contam Toxicol* 198:49-110.
- Brain RA, Hosmer AJ, Desjardins D, Kendall TZ, Krueger HO, Wall SB. 2012. Recovery of duckweed from time-varying exposure to atrazine. *Environ Toxicol Chem* 31:1121–1128.
- Breck JE. 1988. Relationships among models for acute toxic effects-Application to fluctuating concentrations. *Environ Toxicol Chem* 7:775–778.
- Bromilow RH, Chamberlain K. 1995. Principles governing uptake and transport of chemicals. In: Trapp S, McFarlane J (eds.). *Plant Contamination*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, 38-64 pp.
- Cakmak I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146:185–205.

- Cedergreen N, Streibig JC, Spliid NH. 2004. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicol Environ Saft* 57:153–161.
- Cedergreen N, Anderson L, Olsen CF, Spliid HH, Streibig JC. 2005. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on K_{OW} or mode of action? *Aquat Toxicol* 71:261–271.
- Chevre N, Loepfe C, Singer H, Stamm C, Fenner K, Escher B. 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Env Sci Technol* 40:426–435.
- Cleuvers M, Ratte H-T. 2002. Phytotoxicity of coloured substances: is *Lemna* duckweed an alternative to the algal growth inhibition test? *Chemosphere* 49:9–15.
- Cobb A. 1992. The inhibition of amino acid biosynthesis. In: *Herbicides and Plant Physiology*. Chapman and Hall, London, 126–143 pp.
- Conrad R, Btichel C, Wilhelm C, Arsalane W, Berkaloff C, Duval JC. 1993. Changes in yield of *in-vivo* fluorescence of chlorophyll *a* as a tool for selective herbicide monitoring. *J Appl Phycol* 5:505-516.
- Crum SJH, van Kammen-Polman AMM, Leistra M. 1999. Sorption of nine pesticides to three aquatic macrophytes. *Arch Environ Con Tox* 37:310-316.
- Dankov K, Busheva M, Stefanov D, Apostolova EL. 2009. Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of photosynthetic apparatus. *J Photochem Photobiol B Biol* 96:49-56.
- Dauterman WC. 1994. Adaptation to toxicants. In: Hodson E, Levi PE (eds.). *Introduction to Biochemical Toxicology*, 2nd edition. Appleton and Lange, Norwalk, CT, USA.
- Davy M, Petrie R, Smrchek J, Kuchnicki T, Francois D. 2001. Proposal to update non-target plant toxicity testing under NAFTA, USEPA, Washington DC, 158 pp. <http://www.epa.gov/scipoly/sap/>
- Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E. 2010. Effects of pesticides on freshwater diatoms. *Rev Environ Contam Toxicol* 203:87-103.
- DeLorenzo ME, Scott GI, Ross PE. 2001. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ Toxicol Chem* 20:84-98.
- del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53:1255-1272.

- Devine MD, Duke SO, Fedtke C. 1993. An introduction to herbicide action. In: Devine MD, Duke SO, Fedtke C (eds.). *Physiology of Herbicide Action*. P T R Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1–13 pp.
- Ding B, Shi G, Xu Y, Hu J, Xu Q. 2007. Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environ Pollut* 147:800-803.
- Draber W, Kluth JF, Tietjen K, Trebst A. 1991. Herbizide in der Photosyntheseforschung. *Angew Chem* 103:1650-1663.
- Doganlar ZB, Atmaca M. 2011. Influence of Airborne Pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water Air Soil Pollut* 214:509-523.
- Dosnon-Olette R, Couderchet M, Oturan MA, Oturan N, Eullaffroy P. 2011. Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate. *Int J Phytoremediation* 13(6):601-612.
- Drost W, Backhaus T, Vassilakaki M, Grimme LH. 2003. Mixture toxicity of s-triazines to *Lemna minor* under conditions of simultaneous and sequential exposure. *Fresenius Environ Bull* 12:601–607.
- Ducruet JM. 1991. Les herbicides inhibiteurs du photosystème II. In "*Les herbicides: mode d'action et principes d'utilisation*", Scalla R (ed.), INRA (Paris), 79-114 pp.
- Environment Agency. 2001. Pesticides 2000: a summary of monitoring of the aquatic environment in England and Wales.
- Ernst WHO, Peterson PJ. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (4): Terrestrial plants. *Ecotoxicol* 3:180-192.
- Eurostat. 2007. The Use of Plant Protection Products in the European Union, 1992-2003., 222 pp.
- Fang Z, Bouwkamp J, Solomos T. 1998. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 49:503-510.
- Federal Environmental Protection Agency. 2000. Estimation of the pesticide input in surface waters of Germany. Federal Environmental Protection Agency Report 3/2000, Berlin, Germany.
- Fedtke C. 1982. *Biochemistry and Physiology of herbicide action*. Springer Verlag, Berlin.

- Ferrat L, Pergent-Martini C, Roméo M. 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: Application to seagrasses. *Aquat Toxicol* 65:187-204.
- Feurtet-Mazel A, Grollier T, Grousselle M, Ribeyre F, Boudou A. 1996. Experimental study of bioaccumulation and effects of the herbicide isoproturon on freshwater rooted macrophytes (*Elodea densa* and *Ludwigia natans*). *Chemosphere* 32:1499–1512.
- Field JA, Reed RL, Sawyer TE, Martinez M. 1997. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. *J Agric Food Chem* 45:3897-3902.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ Toxicol Chem* 25:272-280.
- Garmouma M, Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M. 1998. Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci Total Environ* 224:93–107.
- Gaspar TH, Penel C, Hagege D, Greppin H. 1991. Peroxidases in Plant Growth, Differentiation and Development Processes. In: Lebaryewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar TH (eds.), *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, University M. Curie-Sklodowska, Lublin, and University of Geneva, Geneva, 250-279 pp.
- Gatidou G, Thomaidis NS. 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat Toxicol* 85:184–191.
- Gerecke AC, Canonica S, Müller SR, Schaerer M, Schwarzenbach RP. 2001. Quantification of dissolved natural organic matter (DOM) mediated phototransformation of phenylurea herbicides in lakes. *Environ Sci Technol* 35:3915-3923.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930.
- Gilliom RJ, Barbach JE, Kolpin DW, Larson SJ. 1999. Testing water quality for pesticide pollution. *Environ Sci Technol* 33:164A–169A.
- Glabgen W, Komoba D, Bohnenkamper A, Haas M, Hertkorn H, May R, Szymczak W, Sandermann H. 1999. Metabolism of the Herbicide Isoproturon in Wheat and Soybean Cell Suspension Cultures. *Pestic Biochem Phys* 63:97-113.
- Goody DC, Chilton PJ, Harrison I. 2002. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *Sci Total Environ* 297:67-83.

- Grollier T, Feurtet-Mazel A, Boudou A, Ribeyre F. 1997. Role of temperature on isoproturon bioaccumulation and effects on two freshwater rooted macrophytes: *Elodea densa* and *Ludwigia natans*. *Ecotoxicol Environ Safe* 36:205–212.
- Gu T, Zhou C, Sorensen SR, Zhang J, He J, Yu P, Yan X, Li S. 2013. The novel bacterial *N*-demethylase PdmAB is responsible for the initial step of *N*, *N*-dimethyl-substituted phenylurea herbicide degradation. *Appl Environ Microbiol* 79(24):7846–7856.
- Gupta M, Chandra P. 1998. Bioaccumulation and toxicity of mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. *Environ Pollut* 103:327-332.
- Guzzella L, Pozzoni F, Giuliano G. 2006. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ Pollut* 142:344-353.
- Haddad G, Ponte-Freitas A, Ravanel P, Tissut M. 1992. Leaf penetration and foliar transfer of Isoproturon, from a stirred medium to the D1-protein target. *Plant Physiol Biochem* 30(2):173-180.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. (3rd edition) Oxford, Oxford University Press.
- Harrison FL, Watness, K, Nelson DA, Miller JE, Calabrese A. 1987. Mercury-binding proteins in the slipper limpet, *Crepidula fornicata*, exposed to increased soluble mercury. *Estuaries* 10:78–83.
- Havaux M. 1998. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 3:147-151.
- Heber U, Neimanis S, Dietz KJ. 1988. Fractional control of photosynthesis by the Q_B protein, the cytochrome *f/b6* complex and other components of the photosynthetic apparatus. *Planta* 173:267–274.
- Hegedüs A, Erdei S, Horváth G. 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160:1085-1093.
- Holvoet KMA, Seuntjens P, Vanrolleghem PA. 2007. Monitoring and modelling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecol Model* 209:53-64.
- Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem* 45:62-69.
- Hulsen K, Minne V, Lootens P, Vandecasteele P, Höfte M. 2002. A chlorophyll a fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron. *Environ Microbiol* 4:327–337.

Hillman W-S. 1961. The *Lemnaceae* or duckweeds. *Bot Rev* 27:221-287.

Hillman W-S, Culley, DD Jr.. 1978. The uses of duckweed. *Am Sci* 66:442-451.

International Commission for the Protection of the Danube River. 2015. Liška I, Wagner F, Sengl F, Deutch K, Slobodnik J (eds.). *Joint Danube Survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality*. Final Scientific Report. ICPDR-Vienna.

Jamers A, Van der Ven K, Moens L, Robbens J, Potters G, Guisez Y, Blust R, De Coen W. 2006. Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquat Toxicol* 80:249-260.

Janjić V. 1994. *Hormonski herbicidi*. Nauka 86-7621-090-X. Beograd, Srbija.

Janjić V. 2009. *Mehanizam delovanja pesticida*. Akademija nauka i umjetnosti Republike Srpske. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd – Zemun.

Jianga L, Maa L, Suia Y, Hna SQ, Wua ZY, Fenga YX, Yanga H. 2010. Effect of manure compost on the herbicide prometryne bioavailability to wheat plants. *J Hazard Mater* 184:337–344.

Johnson AC, Hughes CD, Williams RJ, Chilton PJ. 1998. Potential for aerobic isoproturon biodegradation and sorption in the unsaturated and saturated zones of a chalk aquifer. *J Contam Hydrol* 30:281-297.

Johnson AC, Besien TJ, Bhardwaj CL, Dixon A, Goody DC, Haria AH, White C. 2001. Penetration of herbicides to groundwater in an unconfined chalk aquifer following normal soil applications. *J Contam Hydrol* 53:101-117.

Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M, Grimme LH. 2006. Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. *Aquat Toxicol* 76:93–110.

Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P. 1999. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284:654-657.

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manohran K, Kim W. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5(6):709-725.

Kersting K, Van Wijngaarden, RPA. 1999. Effects of a pulsed treatment with the herbicide afalon (Active ingredient linuron) on macrophyte-dominated mesocosms I. Responses of ecosystem metabolism. *Environ Toxicol Chem* 18:2859–2865.

- Khan MS, Chaudhry P, Wani PA, Zaidi A. 2006. Biotoxic effects of the herbicides on growth, seed yield, and grain protein of greengram. *J Appl Sci Environ Mgt* 10(3):141-146.
- Kirby MF, Sheahan DA. 1994. Effects of atrazine, isoproturon, and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 53:120-126.
- Klaine SJ, Richards P, Baker D, Naddy R, Brown T, Joab B, Casey R, Fernandez D, Overmeyer J, Benjamin R. 1997. *Agrochemical fate and effects in terrestrial, aquatic and estuarine ecosystems. Environmental Behavior of Crop Protection Chemicals*. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 247–263 pp.
- Komoža D, Langebartels C, Sandermann H. 1995. Metabolic processes for organic chemicals in plants. In: Trapp S, Mc Farlane JG (eds.), *Plant contamination. Modeling and Simulation of Organic Chemical processes*. Lewis Publishers, Boca Raton, 69–103 pp.
- Krajncić B, Devidé Z. 1980. Report on photoperiodic response in *Lemnaceae* from Slovenia. *Berichte des Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich*, 47:75-86.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313-349.
- Kreuger J. 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990–1996. *Sci Total Environ* 216:227–251.
- Kreuz K, Tommasini R, Martinoia E. 1996. Old enzymes for a new job. *Plant Physiol* 111:349-353.
- Kreuz K, Martinoia E. 1999. Herbicide metabolism in plants: Integrated pathways of detoxification. In: *The Proceedings of the 9th International Congress on Pesticide Chemistry: The Food-Environment Challenge*. Brooks GT, Roberts TR (eds.) The Royal Society of Chemistry, London, 279-287 pp.
- Krieger-Liszkay A. 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56:337–346.
- Kristensen GB, Sørensen SR, Aamand J. 2001. Mineralization of 2,4-D, mecoprop, isoproturon and terbutylazine in a chalk aquifer. *Pest Manag Sci* 57:531-536.
- Laasch H, Pfister K, Urbach W. 1981. Comparative binding of photosystem II-herbicides to isolated thylakoid membranes and intact algae. *Z Naturforsch* 36:1041-1049.
- Landolt E. 1986. The family of *Lemnaceae*- a monographic study. *Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Edig. tech. Hochschule, Stiftung Rübel. Zürich*. 71. Heft.

Leng RA. 1999. Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. <http://www.fao.org/ag/AGInfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>

Les HD, Crawford JD, Landolt E, Gabel DJ, Kimball TR. 2002. Phylogeny and Systematics of *Lemnaceae*, the Duckweed family. *Syst Bot* 27(2):221-240.

Leu C. 2003. Sources, processes and factors determining the losses of atrazine, dimethenamid and metolachlor to surface waters: a simultaneous assessment in six agriculture catchments. Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETHZ), Zürich, Switzerland.

Lewis, MA. 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environ Pollut* 87:319-336.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148:350-382.

Lichtenthaler HK, Rinderle U. 1988. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *Crit Rev Analyt Chem* 19(1):29-85.

Lin Y, Karupiah M, Shaw A, Gupta G. 1999. Effects of simulated sunlight on atrazine and metolachlor toxicity of surface waters. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:35-37.

MacRae EA, Ferguson IB. 1985. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Physiol Plant* 65:51-56.

Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C. 2010. Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500:58-65.

McCarty LS, Munkittrick KR. 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy, or functional? *Human Ecol Risk Assess* 2:268-274.

Mickelson SK, Boyd P, Baker JL, Ahmed SI. 2001. Tillage and herbicide incorporation effects on residue cover, runoff, erosion, and herbicide loss. *Soil Till Res* 60:55-66.

Milone MT, Sgherri C, Clijsters H, Navari-Izzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot* 50:265-273.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410.

Mohammad M, Itoh K, Suyama K, Yamamoto H. 2006. Recovery of *Lemna sp.* after exposure to sulfonylurea herbicides. *Bull Environ Contam Toxicol* 76:256-263.

Mohan BS, Hosetti BB. 1999. Review- Aquatic plants for toxicity assessment. *Environ Res A* 81:259-274.

- Müller K, Bach M, Hartmann H, Spiteller M, Frede H-G. 2002. Point- and nonpoint- source pesticide contamination in the Zwester Ohm Catchment, Germany. *J Environ Qual* 31:309-318.
- Naddy RB, Johnson KA, Klaine SJ. 2000. Response of *Daphnia magna* to pulsed exposures of chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem* 19:423-431.
- Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880.
- Naumann B, Eberius M, Appenroth K-J. 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St.. *J Plant Physiol* 164:1656-1664.
- Ng HYF, Clegg SB. 1997. Atrazine and metolachlor losses in runoff events from agricultural watershed: the importance of runoff components. *Sci Total Environ* 193:215-228.
- Nitschke L, Schüssler W. 1998. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. *Chemosphere* 36:35-41.
- Nitschke L, Will A, Schüssler W, Metzner G, Lind G. 1999. Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. *Chemosphere* 39:2313-2323.
- NOVA. 2003. National Environmental Research Institute (NERI), Database for pesticides. National Surveillance of Water and Atmosphere. Ministry of the Environment, Denmark.
- OECD Guidelines for the testing of chemicals. 2006. Test No. 221: *Lemna sp.* growth inhibition test, 1-24 pp.
- Osmond CB 1994. What is photoinhibition? Some insight from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds.), *Photoinhibition of Photosynthesis, from Molecular Mechanisms to the Field*. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford, 1-24 pp.
- Paczkowska M, Kozłowska M, Golinski P. 2007. Oxidative stress enzyme activity in *Lemna minor* L. exposed to cadmium and lead. *Acta Biol Cracov Bot* 49:33-37.
- Parrott JL, Hodson PV, Servos MR, Huestis SL, Dixon DG. 1995. Relative potency of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans for inducing mixed function oxygenase activity in rainbow trout. *Environ Toxicol Chem* 14:1041-1050.
- Parsons JT, Surgeoner GA. 1991. Effect of exposure time on the acute toxicities of permethrin, fenitrothion, carbaryl and carbofuran to mosquito larvae. *Environ Toxicol Chem* 10:1229-1233.

- Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Zyłkiewicz B, Zambrzycka E. 2010. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to Cadmium and Lead. *Arch Environ Contam Toxicol* 58:594-604.
- Pirson A, Seidel F. 1950. Zell- und stoffwechselfysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel. *Planta* 38:431-473.
- Ponte-Freitas, A, Haddad G, Tissut M, Ravanel P. 1991. Distribution of Isoproturon, a photosystem II inhibitor, inside wheat leaf fragments. *Plant Physiol Biochem* 29(1):67-70.
- Porsbring T, Backhaus T, Johansson P, Kuylenstierna M, Blank H. 2010. Mixture toxicity from Photosystem II inhibitors on microalgal community succession is predictable by concentration addition. *Environ Toxicol Chem* 29(12):2806-2813.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Radić S, Pevalek-Kozlina B. 2010. Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L). *Period Biol* 112:293-299.
- Rana BC, Kumar JIN. 1995. Observations on the effect of the herbicide isoproturon on aquatic targets and associated organisms. *Bull Environ Contam Toxicol* 55:104-110.
- Raven EL. 2000. Peroxidase-catalyzed oxidation of ascorbate. Structural, spectroscopic and mechanistic correlations in ascorbate peroxidase. *Subcell Biochem* 35:317-49.
- Reinert KH, Giddings JM, Judd L. 2002. Effects analysis of time-varying or repeated exposures in aquatic ecological risk assessment of agrochemicals. *Environ Toxicol Chem* 21:1977-1992.
- Rosenkrantz RT, Baun A, Olekusk K. 2013. Growth inhibition and recovery of *Lemna gibba* after pulse exposure to sulfonylurea herbicides. *Ecotoxicol Environ Saf* 89:89-94.
- Royuela M, Gonzalez A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Gonzalez-Murua C. 2000. Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. *J Plant Physiol* 147:345-354.
- Rutherford AW, Krieger-Liszkay A. 2001. Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Biochem Sci* 26:648-653.
- Sandbech H. 2000. Bichel-udvalget Rapport fra underudvalget om miljø og sundhed. *Miljøstyrelsen*:1-83.

Sand-Jensen K, Krause-Jensen D. 1997. Broad-scale comparison of photosynthesis in terrestrial and aquatic plant communities. *OIKOS* 80:203–208.

Scarlett A, Donkin P, Fileman TW, Evans SV, Donkin ME. 1999. Risk posed by the antifouling agent Irgarol 1051 to the seagrass, *Zostera marina*. *Aquat Toxicol* 45:159–170.

Scherr C, Simon M, Spranger J, Baumgartner S. 2008. Test system stability and natural variability of a *Lemna gibba* L. Bioassay. *PLoS ONE* 3(9):31-33.

Siegel BZ, Galston W. 1967. The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 42:221-226.

Singh S, Eapen S, D'Souza SF. 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62:233-246.

SOeS. 2012. French national service for the environment: Groundwater contamination by pesticides [in French].

Snel JFH, Vos JH, Gylstra R, Brock TCM. 1998. Inhibition of photosystem II (PSII) electron transport as a convenient endpoint to assess stress of the herbicide linuron on freshwater plants. *Aquat Ecol* 32:113–123.

Spliid HS, Køppen B. 1998. Occurrence of pesticides in Danish shallow groundwater. *Chemosphere* 37:1307-1316.

Stangroom SJ, Collins CD, Lester JN. 1998. Sources of organic micropollutants to lowland rivers. *Environ Technol* 19:643-666.

Steinberg R. 1946. Mineral requirement of *Lemna minor*. *Plant Physiol* 21:42-48.

Subramani S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol* 9:445-478.

Styczen M, Wiberg-Larsen P, Aagaard A. 2003. Tag pulsen på pesticiderne i vandmiljøet. *Vand og Jord* 10:84–87.

Tasmin R, Shimasaki Y, Tsuyama M, Qiu X, Khalil F, Okino N, Yamada N, Fukuda S, Kang IJ, Oshima Y. 2013. Elevated water temperature reduces the acute toxicity of the widely used herbicide diuron to a green alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(2):1064-1070.

Teisseire H, Gouderchet M, Vernet G. 1999. Phytotoxicity of Diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*). *Environ Pollut* 106:39–45.

- Teisseire H, Vernet G. 2000. Copper-induced changes in antioxidation enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci* 153:65 – 72.
- Teisseire H, Vernet G. 2000. Is the „Diuron Effect“ Due to a Herbicide Strengthening of Antioxidative Defenses of *Lemna minor*? *Pestic Biochem Phys* 66:153–160.
- Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN. 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Sci* 166:687-694.
- Thurman EM, Bastian KC, Mollhagen T. 2000. Occurrence of cotton herbicides and insecticides in Playa Lakes of the High Plains of West Texas. *Sci Total Environ* 248:189-200.
- Tomlin CDS. 2009. *The Pesticide Manual- A World Compendium* (15th edition). British Crop Production Council (BCPC), Omega Park, Alton, Hampshire GU34 2QD, UK.
- Trapp S. 1995. Model for uptake of xenobiotics in plants. In: Trapp S, Mc Farlane JG (eds.), *Plant Contamination. Modelling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers, London, 108–148 pp.
- Trapp S. 2000. Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Manag Sci* 56:767–778.
- Turgut C, Fomin A. 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC₅₀. *Bull Environ Contam Toxicol* 69:601–608.
- Vallotton N, Moser D, Eggen RIL, Junghans M, Chèvre N. 2008. S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73:395-400.
- Van Assche CJ. 1984. Photosynthetic electron transport inhibitors: some problems related to an accurate determination of the molecular site of action. *Z Naturforsch* 39:338-341.
- Vermaas W. 1993. Molecular-biological approaches to analyze photosystem II structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44:457-481.
- Vidaković-Cifrek Ž. 2007. Vodena leća (*Lemna minor* L.). U: Ambriović-Ristov A. (ur.): *Metode u molekularnoj biologiji*. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 122–126 str.
- Wang W. 1986. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environ Pollut* 11:1–14.
- Wang W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Re* 52:7-22.

Wang W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut* 59:381-400.

Wendt-Rasch L, Pirzadeh P, Woin P. 2003. Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems. *Aquat Toxicol* 63:243–256.

Wetzel RG. 1983. *Limnology*. Saunders College Publishing, Orlando, Florida, USA, 763 pp.

Wright A. 1976. The use of recovery as a criterion for toxicity. *Bull Environ Contam Toxicol* 15:747–749.

Xiao LY, Jiang L, Song NH, Yang H. 2008. Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. *J Agric Food Chem* 56(12):4825-4831.

Xu QS, Hu JZ, Xie KB, Yang HY, Du KH, Shi GX. 2010. Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *J Hazard Mater* 173:186-193.

Zhang M, Cao T, Ni L, Xie P, Li Z. 2010. Carbon, nitrogen and antioxidant enzyme responses of *Potamogeton crispus* to both low light and high nutrient stresses. *Environ Exp Bot* 68:44-50.

Žaltauskaitė J, Sujetovienė G, Čypaitė A, Aužbikavičiūtė. 2014. *Lemna minor* as a tool for wastewater toxicity assessment and pollutants removal agent. Environmental engineering: 9th international conference, 22-23 May 2014, Vilnius, Lithuania: selected papers, 1-7 pp.

Web izvori:

1. http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz_herb.htm