

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Dubravka Špoljarić

**Oksidacijski stres u stanicama alga *Chlorella kessleri*
uzrokovan toksičnim zagađivalima u vodama**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Oksidacijski stres u stanicama alga *Chlorella kessleri* uzrokovan toksičnim zagađivalima u vodama

Dubravka Špoljarić

Rad je izrađen u:

Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Laboratoriju za ekofiziologiju alga Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentori: Dr. sc. Neven Žarković, znanstveni savjetnik
Izv. prof. dr. sc. Janja Horvatić

Kratki sažetak doktorskog rada:

S ciljem razumijevanja odgovora na stres, kultura alga *Chlorella kessleri* Fott et Nováková je u dvije faze rasta (logaritamskoj i linearnoj) izložena djelovanju dvaju herbicida, kloroacetanilida S-metolaklora i triazina terbutilazina te vodikovog peroksida. Tretmani toksikantima uzrokovali su stvaranje reaktivnih kisikovih tvari u stanicama što je za posljedicu imalo promjene u prirastu, koncentraciji fotosintetskih pigmenata, staničnoj ultrastrukturi, antioksidativnom odgovoru kao i nastanak produkta lipidne peroksidacije 4-hidroksi-2-nonenala (HNE). Osim toksičnog utjecaja, niske koncentracije HNE-a utvrđene u netretiranim stanicama ukazuju da osim toksičnog djelovanja, HNE ima određenu fiziološku ulogu. Prisutnost i akumulacija HNE-proteinskih konjugata prvi put je otkrivena u stanicama jednostaničnih zelenih alga. Ova metoda bi uz standardne testove toksičnosti mogla indicirati na onečišćenje okoliša spojevima koji uzrokuju oksidacijski stres. *C. kessleri* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje prilagodbe stanica na reaktivne aldehide nastale u uvjetima oksidacijskog stresa te njihovu ulogu u prilagodbi stanica na stresne uvjete.

Broj stranica: 110

Broj slika: 29

Broj tablica: 13

Broj literaturnih navoda: 190

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Chlorella kessleri*, zagađivala voda, S-metolaklor, terbutilazin, H₂O₂, oksidacijski stres, 4-hidroksi-2-nonenal, antioksidativni odgovor

Datum obrane: 18. travnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof. dr. sc. Đurđica Ugarković**, znanstvena savjetnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, predsjednica;
2. **Dr. sc. Neven Žarković**, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, mentor 1 i član;
3. **Prof. dr. sc. Janja Horvatić**, izvanredna profesorica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor 2 i član;
4. **Doc. dr. sc. Melita Mihaljević**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, član;
5. **Dr. sc. Ana Čipak Gašparović**, znanstvena suradnica Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, član;
6. **Doc. dr. sc. Ivna Štolfa**, docentica Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, zamjena člana.

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

Response of *Chlorella kessleri* cells to oxidative stress induced by toxic water pollutants

Dubravka Špoljarić

Thesis performed at:

Laboratory for Oxidative Stress of the Ruđer Bošković Institute and the Algal ecophysiology laboratory of the Department of Biology Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: Neven Žarković, PhD, Scientific advisor
Janja Horvatić, PhD, Associate Professor

Short abstract:

Two herbicides, chloroacetanilide S-metolachlor and triazine terbuthylazine, as well as hydrogen peroxide were applied in order to study the response to oxidative stress of *Chlorella kessleri* Fott et Nováková culture growing in two phases (logarithmic and linear growth). Exposure of algal cells to toxicants increased the reactive oxygen species production leading to the changes in growth rate, photosynthetic pigment concentration, cell ultrastructure, antioxidative response and the formation of lipid peroxidation end-product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Beside the toxic effects, low HNE concentrations found in untreated, control cells emphasise its physiological role in algae. Presence and accumulation of HNE was detected for the first time in the cells of green unicellular algae. As an addition to the standard toxicity tests, this method could help indicate environmental pollution with oxidative stress-inducing compounds. *C. kessleri* can be used as a model to further study cellular hormetic adaptation to oxidative stress-derived aldehydes.

Number of pages: 110

Number of figures: 29

Number of tables: 13

Number of references: 190

Original in: Croatian

Key words: *Chlorella kessleri*, water pollutants, S-metolachlor, terbuthylazine, H₂O₂, oxidative stress, 4-hydroxy-2-nonenal, antioxidative response

Date of the thesis defense: 18th of April 2013

Reviewers:

1. **Durdica Ugarković**, PhD, Scientific advisor, Ruđer Bošković Institute Zagreb
2. **Neven Žarković**, PhD, Scientific advisor, Ruđer Bošković Institute Zagreb
3. **Janja Horvatić**, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
4. **Melita Mihaljević**, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
5. **Ana Čipak Gašparović**, Research Associate, Ruđer Bošković Institute Zagreb
6. **Ivna Štolfa**, PhD, Assistant Professor, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu i Laboratoriju za ekofiziologiju alga Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u sklopu dva znanstvena projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske: „Lipidi, slobodni radikali i njihovi glasnici u integrativnoj onkologiji“ (098-0982464-2519) voditelja dr. sc. Nevena Žarkovića i „Nutrienti i razvoj plutajućih makrofita i alga u Istočnoj Hrvatskoj“ (285-0000000-3175) kojega je voditeljica izv. prof. dr. sc. Janja Horvatić.

HVALA...

... dr.sc. Nevenu Žarkoviću, mom mentoru, na pruženoj prilici za razgovor iz kojeg je nastala ideja za ovaj rad te na velikoj podršci, savjetima i vjeri u mene i *Chlorellu*

... komentorici izv. prof. dr. sc. Janji Horvatić, na dobroj i uspješnoj suradnji te velikoj podršci

... mojoj mentorici za asistenta, doc. dr. sc. Meliti Mihaljević, na razumijevanju i prenesenom iskustvu od samih početaka

... povjerenstvu za ocjenu doktorata, prof. dr. sc. Đurđici Ugarković i dr. sc. Ani Čipak Gašparović na pomoći i konstruktivnim sugestijama

... dr. sc. Morani Jaganjac za koju ne postoji „nemoguće“ i koja svojim znanjem i sposobnostima inspirira – hvala za dobrodošlicu, odličnu suradnju i svu moguću podršku

... doc. dr. sc. Ivni Štolfa za preneseno znanje, dragocjene sate, pomoć i podršku kad je bilo najteže – bez tebe ne bih uspjela

... mojim najbližim suradnicima dr. sc. Filipu Steviću i dr. sc. Tanji Žuna Pfeiffer na satima konzultacija, psihoanalize i nesebičnom prenošenju znanja – sretna sam što vas imam

... svim kolegama iz Laboratorija za oksidacijski stres Instituta Ruđer Bošković, dr. sc. Ani Čipak Gašparović, Lidiji Milković dipl. ing., Luki Andrišiću dipl. ing., Marini Cindrić dipl. ing., mr. sc. Ivi Prah, gđi Nevenki Hiršl i Tei Vuković med. lab. ing. na gostoprimstvu, odličnoj suradnji i nesebičnoj pomoći

... suradnicima iz Laboratorija za ekofiziologiju alga Odjela za biologiju Veri Tikas dipl. ing., dr. sc. Vesni Peršić i Martini Jelošek, prof. na pomoći i susretljivosti

... prof. dr. sc. Kameliji Žarković te mr. sc. Ljubomiru Škrinjaru i gđi Gordani Strunjak iz Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb na suradnji i pomoći

... voditelju Laboratorija za elektronsku mikroskopiju Instituta Ruđer Bošković, izv. prof. dr. sc. Hrvoju Fulgosiju i suradnicima na ustupljenoj opremi i susretljivosti

... prof. dr. sc. Jasni Vidaković i svim kolegama sa Zavoda za ekologiju voda na podršci

... voditeljici Laboratorija za biokemiju prof. dr. sc. Elizabeti Has-Schön i predstojniku Zavoda za kvantitativnu ekologiju izv. prof. dr. sc. Branimiru Hackenbergeru Kutuzoviću te suradnicima na ustupljenoj opremi i susretljivosti

... dr. sc. Sandri Stepić na podršci od samih početaka i dr.sc. Rosemary Vuković na pomoći i savjetima

... mojoj Aniti – hvala što si uvijek bila tu

... svim prijateljima

... mom Ivi, kraj kojeg i najteži problemi postaju beznačajni

... Ivinim roditeljima na podršci

... mojoj cijeloj velikoj obitelji, a posebno mami, tati i seki, na bezuvjetnoj podršci (u svakom smislu) koju jednakom mjerom nikada neću uspjati uzvratiti te na ljubavi i razumijevanju – ovo je za vas

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Značajke vrste <i>Chlorella kessleri</i>	3
2.2. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija i 4-hidroksi-2-nonenal	6
2.3. Antioksidacijski enzimi	11
2.3.1. Askorbat-peroksidaza	11
2.3.2. Glutation-reduktaza	12
2.3.3. Katalaza	12
2.4. Neenzimatski antioksidansi	13
2.4.1. Karotenoidi	13
2.4.2. Fenoli	14
2.4.3. Askorbinska kiselina	15
2.5. Herbicidi i njihovo djelovanje	16
3. CILJ RADA	20
4. MATERIJAL I METODE	21
4.1. Kultura alga <i>Chlorella kessleri</i>	21
4.2. Određivanje utjecaja herbicida i vodikovog peroksida na kulturu <i>C. kessleri</i> u logaritamskoj fazi rasta	21
4.2.1. Uvjeti uzgoja	21
4.2.2. Tretmani herbicidima i vodikovim peroksidom	22
4.2.3. Praćenje rasta kultura i određivanje suhe tvari	22
4.2.4. Određivanje koncentracija klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	24
4.2.5. Analiza sadržaja reaktivnih kisikovih tvari	24
4.2.6. Enzimatski antioksidansi	25
4.2.6.1. Ekstrakcija topljivih proteina	25
4.2.6.2. Određivanje koncentracije proteina	25
4.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze	26
4.2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutacion-reduktaze	26
4.2.6.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze	27
4.2.7. Neenzimatski antioksidansi	28
4.2.7.1. Određivanje koncentracije ukupnih karotenoida	28
4.2.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	28
4.2.7.3. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline	29
4.2.8. Analiza koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala	29
4.2.8.1. Ekstrakcija topljivih proteina	29
4.2.8.2. Dot-blot analiza	29
4.2.9. Ultrastruktura stanica <i>C. kessleri</i>	30
4.3. Određivanje utjecaja herbicida i vodikovog peroksida na kulturu <i>C. kessleri</i> u fazi usporavanja rasta (linearna faza)	32
4.3.1. Uvjeti uzgoja	32
4.3.2. Tretmani herbicidima i vodikovim peroksidom	32
4.3.3. Praćenje rasta kultura	32

4.3.4.	Određivanje koncentracija klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	32
4.3.5.	Analiza sadržaja reaktivnih kisikovih tvari	32
4.3.6.	Analiza sadržaja HNE-histidinskih konjugata	33
4.3.6.1.	Ekstrakcija topljivih proteina	33
4.3.6.2.	Dot-blot analiza	33
4.4.	Statistička obrada podataka	33
5.	REZULTATI	34
5.1.	Utjecaj herbicida i vodikovog peroksida na kulturu <i>C. kessleri</i> u logaritamskoj fazi rasta	34
5.1.1.	Prirast kulture <i>C. kessleri</i>	34
5.1.2.	Koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	35
5.1.3.	Omjer klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>	38
5.1.4.	Sadržaj reaktivnih kisikovih tvari	39
5.1.5.	Analiza antioksidacijskog statusa	42
5.1.5.1.	Aktivnost askorbat-peroksidaze	42
5.1.5.2.	Aktivnost glutation-reduktaze	42
5.1.5.3.	Aktivnost katalaze	43
5.1.5.4.	Koncentracija ukupnih karotenoida	47
5.1.5.5.	Sadržaj ukupnih fenola	48
5.1.5.6.	Koncentracija askorbinske kiseline	51
5.1.6.	Koncentracija 4-hidroksi-2-nonenala	52
5.1.7.	Ultrastruktura stanica <i>C. kessleri</i>	55
5.1.8.	Korelacijska povezanost prirasta, koncentracije klorofila <i>a</i> , koncentracije klorofila <i>b</i> , omjera klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i> , sadržaja reaktivnih kisikovih tvari, parametara antioksidacijskog statusa i koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala	62
5.2.	Utjecaj herbicida i vodikovog peroksida na kulturu <i>C. kessleri</i> u linearnoj fazi rasta	64
5.2.1.	Prirast kulture <i>C. kessleri</i>	64
5.2.2.	Koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	65
5.2.3.	Omjer klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>	67
5.2.4.	Sadržaj reaktivnih kisikovih tvari	69
5.2.5.	Sadržaj HNE-histidinskih konjugata	71
5.2.6.	Korelacijska povezanost prirasta, koncentracije klorofila <i>a</i> , koncentracije klorofila <i>b</i> , omjera klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i> , sadržaja reaktivnih kisikovih tvari i sadržaja HNE-histidinskih konjugata	74
6.	RASPRAVA	76
7.	ZAKLJUČAK	89
8.	LITERATURA	91
9.	SAŽETAK	106
10.	SUMMARY	107
11.	ŽIVOTOPIS	108

POPIS KRATICA

AA	engl. <i>ascorbic acid</i> - askorbinska kiselina
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> - analiza varijance
APX	engl. <i>ascorbate peroxidase</i> - askorbat-peroksidaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BBM	engl. <i>Bold's basal medium</i> - Boldov osnovni medij
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i> - albumin govedeg seruma
Car	engl. <i>carotenoids</i> - ukupni karotenoidi
CAT	engl. <i>catalase</i> - katalaza
Chla	engl. <i>chlorophyll a</i> - klorofil <i>a</i>
Chlb	engl. <i>chlorophyll b</i> - klorofil <i>b</i>
Chla/Chlb	omjer klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>
DAB	3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorid
DCFH-DA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
DHA	dehidroaskorbat
DHAR	engl. <i>dehydroascorbate reductase</i> - dehidroaskorbat-reduktaza
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
DW	engl. <i>dry weight</i> - suha tvar
GR	engl. <i>glutathione reductase</i> - glutation-reduktaza
GSH	reducirani oblik glutationa
GSSG	oksidirani oblik glutationa
HBSS	engl. <i>Hank's balanced salt solution</i> - Hanksova otopina soli
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HNE-His	konjugati 4-hidroksi-2-nonenala i histidina
MDA	malondialdehid
MDHA	monodehidroaskorbat
MDHAR	engl. <i>monodehydroascorbate reductase</i> - monodehidroaskorbat-reduktaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OD ₇₅₀	engl. <i>optical density</i> - optička gustoća mjerena na 750 nm
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> - fosfatni pufer
PHE	engl. <i>phenolics</i> - ukupni fenoli
PUFA	engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> - višestruko nezasićene masne kiseline
Q _A	vezani plastokinon
Q _B	mobilni plastokinon
<i>r</i>	prirast kulture
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> - reaktivne kisikove tvari
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> - superoksid-dismutaza
Tukey HSD	engl. <i>Tukey's honestly significant difference</i> - Tukeyev test značajnosti
VLCFA	engl. <i>very-long-chain fatty acids</i> - masne kiseline vrlo dugog lanca



1. UVOD

1. UVOD

Herbicidi su najčešće upotrebljavana sredstva za zaštitu ratarskih kultura u Europskoj uniji (Eurostat, 2007). Toksično djelovanje ovih spojeva u okolišu često nije usmjereno samo na ciljne organizme. Zbog fizioloških osobina sličnih višim biljkama, jednostanične zelene alge su izrazito osjetljive na djelovanje herbicida, brzo na njih reagiraju i akumuliraju ih. Na postojanost herbicida u okolišu utječe učestalost njihove primjene, postojanost u tlu i mobilnost, oborine, topografija i klimatski uvjeti (Lin i sur., 1999).

Dva najčešće korištena herbicida različitog mehanizma djelovanja su S-metolaklor i terbutilazin. S-metolaklor je kloroacetanilidni herbicid koji inhibira enzim sintazu, jedan od četiri enzima koji čine enzimski klaster elongazu, odgovornu za elongaciju masnih kiselina, čime se narušava fluidnost i integritet stanične membrane. Terbutilazin je triazinski herbicid, inhibitor fotosustava II koji uzrokuje svjetlošću potpomognuto stvaranje reaktivnih kisikovih tvari (engl. *reactive oxygen species* - ROS) u kloroplastima uzrokujući lipidnu peroksidaciju i proteolizu proteinskih kompleksa u tilakoidnim membranama. Koncentracije herbicida u površinskim vodama često premašuju dopuštene vrijednosti uslijed iznenadnih točkastih izvora onečišćenja ili obilnih kiša i poplava u vrijeme njihove primjene. Mnoga istraživanja na vodenim mikroorganizmima, posebice algama, pokazala su akutnu toksičnost herbicida (DeLorenzo i sur., 2001), a svaka promjena na razini primarnih proizvođača može se štetno odraziti na više trofičke razine prehranbenih lanaca u vodenim ekosustavima. Istraživanjima je dokazano nakupljanje različitih ksenobiotika u stanicama alga te njihov trofički prijenos duž hranidbenog lanca što za posljedicu ima širenje oksidacijskog stresa (Chaufan i sur., 2006). Mala količina ROS-a nastaje kao posljedica aktivnog aerobnog metabolizma, no u uvjetima biotičkog i abiotičkog stresa nastaju veće koncentracije koje mogu aktivirati obrambeni odgovor i prilagodbu na oksidacijski stres, ali i djelovati fitotoksično (Dat i sur., 2000). Prekomjerno stvaranje ROS-a oštećuje DNA, proteine, šećere i lipide (Esterbauer i sur., 1991). Kako bi se zaštitile od štetnih oksidacijskih reakcija, stanice su razvile različite antioksidacijske mehanizme obrane, enzimatske i neenzimatske antioksidanse koji uklanjaju i/ili obnavljaju oksidirane molekule (Arora i sur., 2002).

Višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids* - PUFA) mogu biti oksidirane enzimatskim reakcijama ili kemijskim putem u prisustvu ROS-a pri čemu nastaju različite vrste oksilipina (Blée, 1998). Njima pripadaju i reaktivni aldehidi, kao što je 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). HNE je za razliku od ROS-a dugoživi te omogućuje daljnje širenje oksidacijskog stresa čak i na mjesta udaljena od nastanka ROS-a (Esterbauer i sur.,

1991). Iako je HNE prvotno smatran toksičnim produktom lipidne peroksidacije te sekundarnim toksičnim glasnikom slobodnih radikala, danas je prepoznat kao pouzdan biljeg oksidacijskog stresa, mogući uzročnik bolesti, ali također i kao važan čimbenik u modulaciji rasta stanica te signalna molekula (Žarković, 2003).

Mali broj istraživanja posvećen je prisutnosti HNE-a u stanicama alga te se postavlja pitanje njegove uloge u ovim organizmima. Ovo istraživanje krenulo je od pretpostavke da su zbog velikog sadržaja ω -3 i ω -6 masnih kiselina jednostanične zelene alge izrazito podložne oksidacijskom stresu te predstavljaju prikladan model za istraživanje lipidne peroksidacije. Primarni cilj bio je utvrditi uzrokuju li herbicidi S-metolaklor i terbutilazin, kao česta toksična zagađivala u vodama, oksidacijski stres u stanicama jednostanične zelene alge *Chlorella kessleri* Fott et Nováková te posljedično povećano stvaranje ROS-a, promjene osnovnih fizioloških parametara, stanične ultrastrukture, nastanak HNE-a te odgovarajući antioksidacijski odgovor. HNE stvara stabilne konjugate s proteinima to je omogućilo njegovu detekciju u stanicama alga primjenom specifičnih monoklonskih protutijela na HNE-histidinske konjugate. Prisutnost ovih konjugata moguće je utvrditi i nakon smanjenja koncentracije toksikanata u vodi. Obzirom da su jednostanične zelene alge široko rasprostranjene u vodenim ekosustavima, vrlo osjetljive te brzo reagiraju na prisutnost toksikanata, *C. kessleri* predstavlja pogodan organizam za utvrđivanje onečišćenja voda herbicidima.

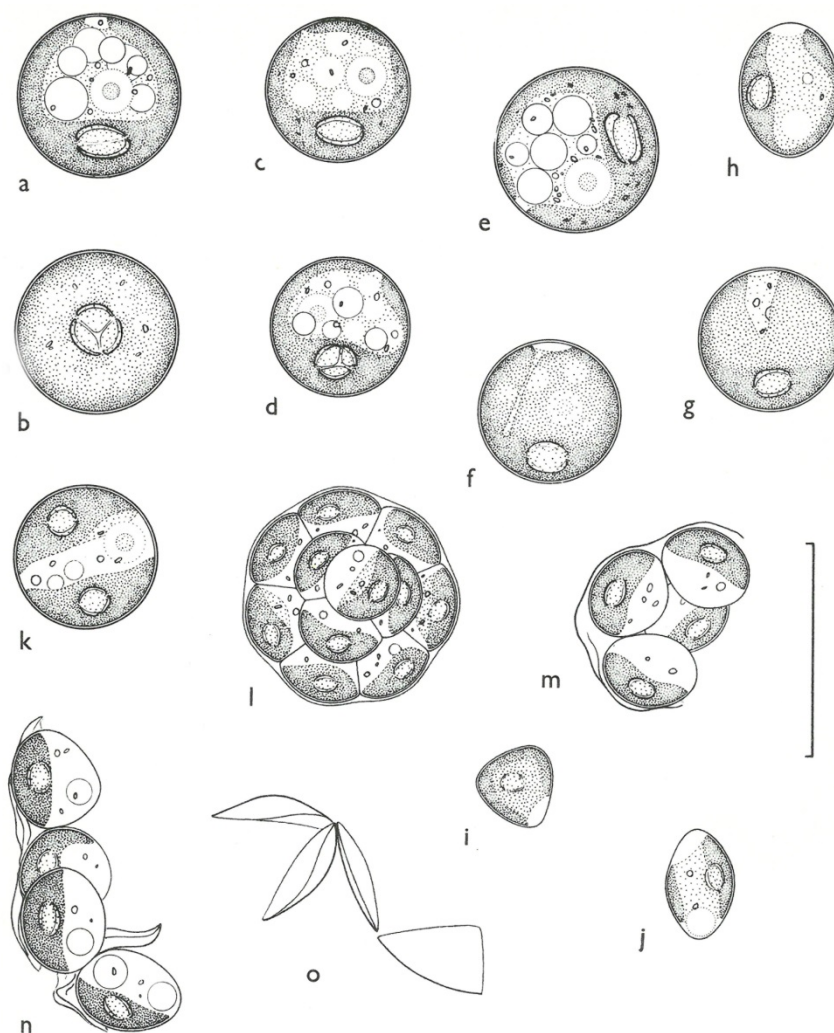
2. PREGLED LITERATURE

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Značajke vrste *Chlorella kessleri*

Vrsta *Chlorella kessleri* Fott et Nováková opisana je prvi put 1969. godine kada je zbog posebnih morfoloških i fizioloških karakteristika izdvojena od tipske vrste *Chlorella vulgaris* Beijernick. Prema opisu autora Fott i Nováková (1969), stanice *C. kessleri* su okrugle, a mlade stanice i autospore elipsoidne. Stanična stijenka je tanka i prilikom otpuštanja autospora se raspada na 2-4 ljuskasta dijela. Kloroplast je parijetalan, oblika plašta (engl. *mantle-shaped*) s malim otvorom. Pirenoide je široko elipsoidan, smješten u suženom dijelu kloroplasta i obavijen s dva, rjeđe i više škrobnih zrnaca. U stanicama su prisutne lipidne kapljice i vakuole. Jezgra je smještena ekscentrično. *C. kessleri* se razmnožava diobom na 2-4-8-16 autospora. Autospore su elipsoidne do poliedrične, a mlade stanice široko elipsoidne. Stanična stijenka ishodišne stanice se raspada na ljuskaste dijelove čineći tvorevinu oblika tanjura koja zajedno drži mlade autospore. Promjer stanica iznosi 2,5-8,9 μm , autospora 3-5 μm , a sporangija 4,5-11,4 μm (Slika 1).

C. kessleri pripada skupini jednostaničnih zelenih alga razreda Trebouxiophyceae odjeljka Chlorophyta. Do sada je poznato više od 100 svojiti roda *Chlorella* no mnoge od njih je potrebno revidirati (Komárek i Fott, 1983). Prema osnovnom sastavu polisaharida u staničnoj stijenci, predstavnici ovog roda dijele se na dva tipa: glukozno-manozni i glukozaminski tip (Takeda, 1991). Vrste glukozaminskog tipa najčešće imaju specifično građen pirenoide kroz koji prolazi dvostruki tilakoid, a razlikuju se po načinu razvoja stanične stijenke te strukturi, rasporedu i debljini mikrofibrila (Němcová i Kalina, 2000). Novija filogenetska istraživanja Ustinova i sur. (2001) temeljena na proučavanju gena koji kodiraju 18S rRNA pokazala su da *C. kessleri* predstavlja odvojenu filogenetsku liniju te je izdvojena u poseban rod *Parachlorella* i imenovana *Parachlorella kessleri* (Krienitz i sur., 2004). Od tipske vrste *Parachlorella beijernickii* morfološki se razlikuje po karakterističnom obliku kloroplasta te odsutnosti galertastog ovoja, dok su molekularnim istraživanjima uočene još i razlike u osam baza 18S rRNA genske sekvence i pet u ITS2 regiji (Krienitz i sur., 2004). Dodatnim istraživanjem autosporulacije vrsta porodice Chlorellaceae otkriveno je da se *P. kessleri* razlikuje po načinu i vremenu nastanka te debljini stanične stijenke autospora (Yamamoto i sur., 2005). Osnovna građevna jedinica fibrilarnog dijela stanične stijenke je glukozamin, dok su u hemiceluloznom matriksu prisutne ramnoza, galaktoza, gluukoza i ksiloza te manje količine arabinoze, manoze i fukoze (Juárez i sur., 2011).

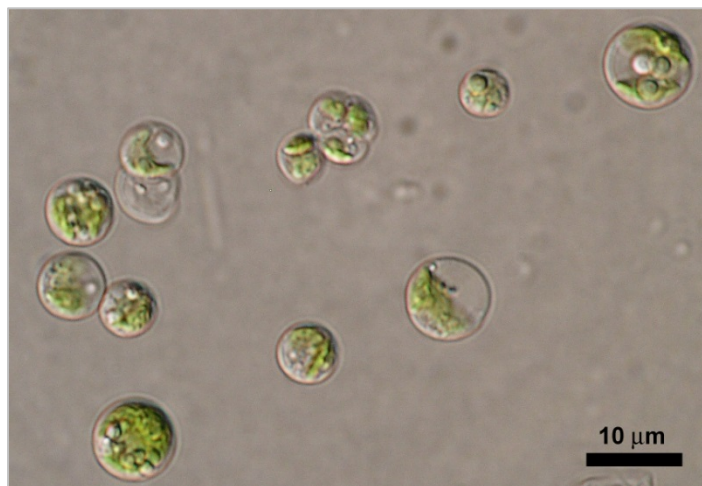


Slika 1. Morfološke i strukturalne karakteristike *C. kessleri*; *a,b,c,d,e* – vegetativne stanice; *f,g* – površinski izgled stanice; *h,i,j* – mlade stanice; *k* – dioba protoplasta; *l* – sporangij sa 16 autospora; *m,n* – otpuštanje autospora pričvršćenih ljuskastim ostacima stijenke; *o* – ostaci stanične stijenke ishodišne stanice; linija predstavlja 10 μm (Fott i Nováková, 1969).

Zbog brzog i lakog uzgoja u kulturi, vrste roda *Chlorella* postale su vodeći model u istraživanju fiziologije biljaka i alga te najčešće korištene vrste u masovnom uzgoju i akvakulturi (Preisig i Andersen, 2005). Također su ostvarile komercijalnu primjenu kao dio prehrambenih i farmakoloških pripravaka (Borowitzka, 1995) te u proizvodnji biodizelskog goriva (Xu i sur., 2006).

Jednostanične zelene alge, uključujući i vrste roda *Chlorella*, imaju velik sadržaj PUFA, među kojima prevladavaju C18 i C16 masne kiseline, uglavnom 18:3 ω 3 i 18:2 ω 6 (Pratoomyot et al., 2005).

Više temperature (25-30°C) su optimalne za razvoj *C. kessleri*, a tolerantna je i na povišen intenzitet svjetlosti. Rasprostranjena je u planktonu slatkovodnih ekosustava te se može prilagoditi i terestrijalnom načinu života (Guiry, 2012), kao i ekstremnim uvjetima termalnih voda niske pH vrijednosti (Juárez i sur., 2011).



Slika 2. *C. kessleri* – stanice u kulturi.
(http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/253.jpg)

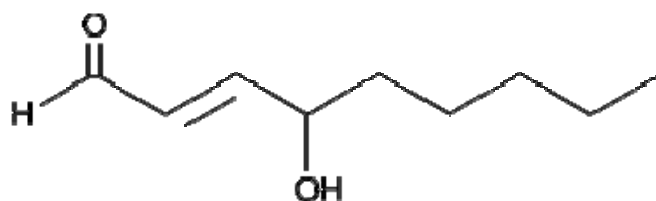
2.2. Oksidacijski stres, lipidna peroksidacija i 4-hidroksi-2-nonenal

Pod utjecajem različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika dolazi do pomaka ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji kao i do prekomjernog stvaranja ROS-a i reaktivnih dušikovih tvari. Nemogućnost organizma da kontrolira njihovu razinu pomoću različitih enzimatskih i neenzimatskih antioksidansa rezultira nastankom oksidacijskog stresa (Sies, 1985). Najčešći oblici ROS-a u biljkama su superoksidni anion ($\cdot\text{O}_2^-$), H_2O_2 , hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$) i singletni kisik ($^1\text{O}_2$) koji nastaju u manjim količinama kao posljedica aktivnog aerobnog metabolizma prijenosom elektrona do kisika u transportnim lancima elektrona u kloroplastima i mitohondrijima. ROS također nastaju oksidacijom glikolata tijekom fotorespiracije u peroksisomima te djelovanjem oksidaza i peroksidaza u staničnim stijenkama. U tim uvjetima ROS mogu djelovati dvojako, kao signali prilagodbe na oksidacijski stres, a u većim koncentracijama djelovati i fitotoksično (Dat i sur., 2000). Najreaktivniji oblici ROS-a (primjerice $\cdot\text{OH}$) lako ulaze u oksidacijske ili redukcijske reakcije s makromolekulama DNA, proteinima, šećerima i lipidima uzrokujući oštećenja (Esterbauer i sur., 1991).

Oksidacijom nezasićenih masnih kiselina u biljkama nastaju različite vrste oksidiranih lipida, oksilipina, a uključuju lipidne hidroperoksidi, hidroksi-, oksi- i keto-masne kiseline, divinil-eteri, volatilne aldehide i biljne hormone jasmonate (Grechkin, 1998). U ranoj fazi nastaju lipidni hidroperoksidi koji mogu nastati enzimatskim putem ili neenzimatski kemijskom (auto)oksidacijom. Hidroperoksidi iz PUFA nastaju enzimatski uglavnom djelovanjem lipoksigenaza i α -dioksigenaze. Usporedo s enzimatskim reakcijama, oksilipini nastaju i kemijskim putem u uvjetima oksidacijskog stresa posredstvom ROS-a. Na djelovanje ROS-a najosjetljivije su PUFA (najčešće linolna i linolenska kiselina) pri čemu također nastaju lipidni hidroperoksidi, hidroksimasne kiseline i peroksilni radikali koji se dalje oksidiraju u prisustvu metala u lančanoj reakciji lipidne peroksidacije. Prisutnost ROS-a može se detektirati preko krajnjih produkata tih reakcija koji imaju znatno duže vrijeme poluživota od slobodnih radikala, od kojih su u biljaka najznačajniji fitoprostani i reaktivni aldehidi. Povećan sadržaj ovih oksilipina u stanicama biljaka i alga zabilježen je u uvjetima oksidacijskog stresa uzrokovanog peroksidima ili teškim metalima (Imbusch i Mueller, 2000) patogenima (Blée, 2002) ili mehaničkim oštećenjima (Pohnert, 2005). Dokazano je da ovi spojevi imaju ulogu u detoksifikaciji, obrambenom odgovoru te induciraju sekundarni metabolizam (Loeffler i sur., 2005). Biološke membrane predstavljaju posebno ugrožene

strukture jer su bogate masnim kiselinama i izrazito podložne oksidacijskom stresu i lipidnoj peroksidaciji.

Reaktivni aldehidi koji nastaju ovim reakcijama i imaju važno biokemijsko i biomedicinsko značenje su HNE, malondialdehid (MDA) i akrolein. HNE nastaje oksidacijom ω -6 masnih kiselina, a prema strukturi je α,β -nezasićeni hidroksialkenal s tri reaktivne skupine: aldehidnom, dvostrukom kovalentnom i hidroksilnom (*Slika 3*). Vezanjem na cisteinske, histidinske i lizinske ostatke proteina, kao i na DNA uzrokuje mutagene i karcinogene promjene (Esterbauer i sur., 1991; Jaganjac i sur., 2010; Žarković, 2003).



Slika 3. Strukturni prikaz molekule 4-hidroksi-2-nonenala.

(<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/32100>)

Veći broj istraživanja vezan je uz prisutnost i učinke HNE-a u stanicama sisavaca (Žarković i sur., 1993; Jaganjac i sur., 2010) te u manjem opsegu na kvascima (Čipak i sur., 2006). Ovisno o koncentraciji u kojoj je prisutan u stanicama i tkivima, HNE-u se pripisuju različita signalna, bioaktivna i patofiziološka svojstva (*Tablica 1*).

Tablica 1. Svojstva 4-hidroksi-2-nonenala

Biokemijska svojstva

- reakcije s biomolekulama - aminokiselinama, proteinima, bazama nukleinskih kiselina (Esterbauer i sur., 1991)
-

Signalna molekula

- kontrola staničnog ciklusa - proliferacija (Žarković i sur., 1993), diferencijacija (Šunjić i sur., 2005), transformacija (Sharma i sur., 2004) i inhibicija rasta stanica (Liu i sur., 1999)
 - kemotaktična aktivnost (Curzio i sur., 1982)
 - regulacija ekspresije gena (Schreck i sur., 1991), interakcija s membranskim receptorima, transkripcijskim faktorima i transkripcijskim represorima (Boellmann i sur., 2004; Liu i sur., 1999) te promotorima (Jaganjac i sur., 2010)
 - interakcija sa signalnim molekulama u staničnoj membrani, citoplazmi i jezgri (Sampey i sur., 2007)
 - signal za apoptozu stanica (Awasthi i sur., 2008)
-

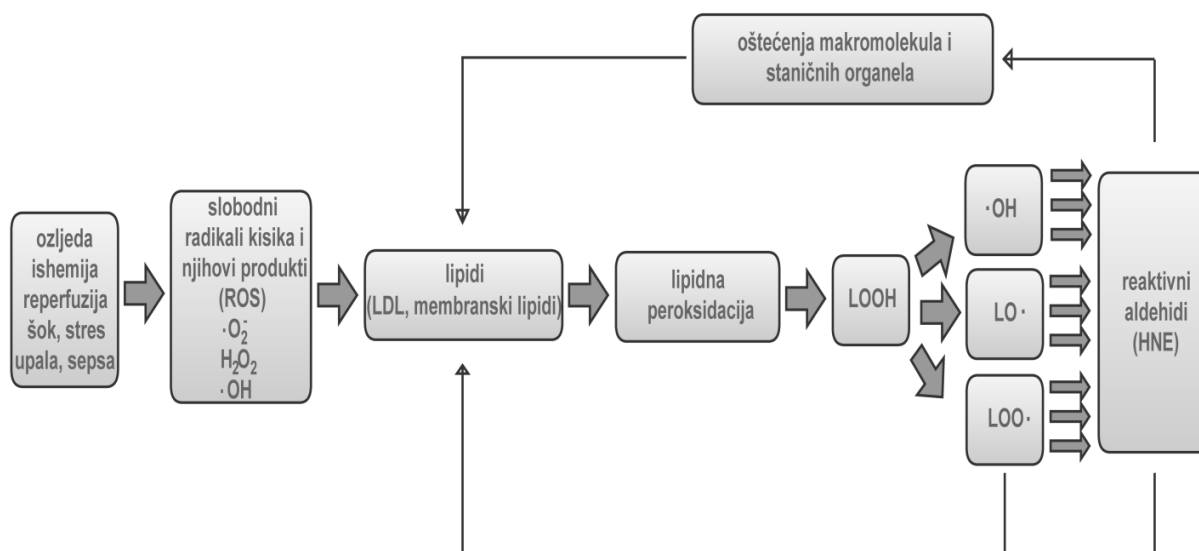
Biljeg oksidacijskog stresa / bioaktivni biljeg u patofiziologiji

- biljeg lipidne peroksidacije u različitim vrstama stanica i tkiva (Žarković i sur., 2003)
 - citotoksično, genotoksično i karcinogeno djelovanje (Hu i sur., 2002)
 - uzročnik apoptoze stanica (Li i sur., 1996)
 - čimbenik u nastanku bolesti - ateroskleroze (Brown i Goldstein, 1983), Alzheimerove bolesti (Butterfield, 2002), Parkinsonove bolesti (Yoritaka i sur., 1996), amiotrofične lateralne skleroze (Smith i sur., 1998), ciroze jetre (Tsuneyama, 2002), fibroznih bolesti (Poli i Parola, 1997)
-

HNE u hrani

- prisutan u različitim vrstama namirnica - produkt oksidacije masti i ulja (LaFond i sur., 2011)
-

U fiziološkim uvjetima, u koncentracijama manjim od $0,1 \mu\text{M}$ HNE utječe na aktivnost enzima i rast stanica, imajući važnu ulogu u modulaciji staničnog ciklusa i signalizaciji (Esterbauer i sur., 1991; Žarković i sur., 1993). Povišene koncentracije HNE-a ($1\text{--}20 \mu\text{M}$) nastaju u uvjetima oksidacijskog stresa te se HNE-u uglavnom pripisuju negativni učinci (Slika 4), kao što su oštećenja makromolekula, snižavanje razine glutationa te inhibicija sinteze DNA i proteina (Esterbauer i sur., 1991). HNE također sudjeluje u diferencijaciji stanica i apoptozi (Borović Šunjić i sur., 2005). Koncentracije više od $100 \mu\text{M}$ su izrazito toksične i uzrokuju trajna oštećenja stanica (Esterbauer i sur., 1991). HNE je uključen u nastanak mnogih bolesti, kao što su ateroskleroza, Alzheimerova bolest i rak. Nove analitičke metode omogućuju da HNE postane klinički primjenjiv biljeg lipidne peroksidacije, kao i standardizirani parametar za određivanje kvalitete hrane (Žarković, 2003).



Slika 4. Lančana reakcija oksidacijskog stresa (Žarković i sur., 2001).

Iako se istraživanjima 4-hidroksi-2-alkenala pridaje velika važnost, upravo zbog citotoksičnosti kod sisavaca, sami putovi biosinteze ovih spojeva u biljnim stanicama nisu potpuno razjašnjeni. U biljnim ekstraktima je utvrđena prisutnost 4-hidroksi-2-alkenala, primjerice HNE-a, 4-hidroksi-2-heksenala i 9-hidroksi-12-oksi-10-dodekanoične kiseline (Gardner i sur., 1991). Pretpostavlja se da ovi spojevi nastaju enzimatskim putem iz (3Z)-heksenala, (3Z)-nonenala i 12-oksi-(9Z)-dodekanoične kiseline djelovanjem lipoksigenaze i hidroperoksid-liaze na linolnu i linolensku kiselinu. Gardner i Hamberg (1993) su predložili dva enzimatska puta nastanka HNE-a. Prvi uključuje nastanak iz (3Z)-nonenala

oksidacijom pomoću (3Z)-alkenal-oksigenaze te uklanjanje hidroperoksi-skupine djelovanjem peroksigenaze. Nakon tih reakcija slijedi epoksidacija pomoću hidroperoksida djelovanjem epoksigenaze te modifikacije nestabilnog 4-hidroperoksi-2-nonenala u HNE. Alternativni put nastanka uključuje oksidaciju (3Z)-nonenala pomoću enzima lipoksigenaze (Gardner i Grove, 1998). Dokazano je da osim enzimatskim putem, 4-hidroksi-2-alkenali u većoj mjeri nastaju autooksidacijom (3Z)-heksenala, (3Z)-nonenala i 12-oksi-(9Z)-dodekanoične kiseline (Noordermeer i sur., 2000). Pretpostavlja se da HNE u biljkama djeluje kao obrambena komponenta protiv patogena i mehaničkih oštećenja te sudjeluje u razvijanju otpornosti na bolesti, ali također ima i regulatornu ulogu (Blée, 1998). Većina istraživanja orijentirana je na dokazivanje prisutnosti HNE-a kao rezultata povećanog stvaranja ROS-a i pojave lipidne peroksidacije (Sakihama i Xamasaki, 2002). Sklonost HNE-a stvaranju stabilnih konjugata s proteinima omogućila je njegovu detekciju pomoću specifičnih monoklonskih protutijela u stanicama i tkivima sisavaca (Živković i sur., 2005). Isto svojstvo omogućilo je dokazivanje nastanka HNE-om modificiranih proteina u uvjetima oksidacijskog stresa također i u drugim organizmima, primjerice transformiranim kvascima koji sadrže višestruko nezasićene masne kiseline (Čipak i sur., 2006) te u staničnim kulturama biljke *Arabidopsis thaliana* L. (Winger i sur., 2005). Uloga HNE-a u algama nije dovoljno istražena. Pojedina istraživanja na morskim makroalgama pokazala su da se HNE pojavljuje kao biljeg lipidne peroksidacije u algama naseljenima invazivnim vrstama (Box i sur., 2008) te kao odgovor na tretmane toksikantima kao što su cijanotoksini (Pflugmacher i sur., 2007).

2.3. Antioksidacijski enzimi

2.3.1. Askorbat peroksidaza

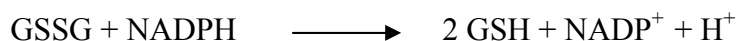
Askorbat-peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase* – APX; EC 1.11.1.11) je intracelularna peroksidaza koja pripada peroksidazama razreda I koje posjeduju hem u aktivnom centru (Welinder, 1992). Uloga APX-a je uklanjanje viška H₂O₂, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida u biljnim stanicama. Jedan je od ključnih enzima askorbat-glutationskog ciklusa u kojem katalizira redukciju H₂O₂ pomoću askorbata (AA) pri čemu nastaje voda i monodehidroaskorbat (MDHA).



APX je učinkovita čak i pri niskoj koncentraciji enzima jer za razliku od enzima katalaze ima velik afinitet za H₂O₂ (Asada, 1992). S obzirom na karakteristike enzima i slijed aminokiselina, u stanicama viših biljaka postoji više izoformi APX-a, a to su topljive forme prisutne u citoplazmi i u stromi kloroplasta te forme vezane za tilakoidne membrane, membrane mikrotjelešaca (peroksisoma i glioksisoma) i mitohondrija (Shigeoka i sur., 2002). Aktivnost APX-a utvrđena je u više vrsta alga i cijanobakterija. Izoforme APX-a u ovim organizmima imaju slična enzimatska i imunološka svojstva kao izoforme viših biljaka, a razlikuju se u slijedu aminokiselina N-terminalnog kraja, afinitetu za supstrat i/ili stabilnosti. Istraživanja eukariotskih alga su dokazala prisutnost uglavnom samo jedne izoforme enzima u stanicama, dok su kod pojedinih predstavnika, kao kod jednostanične crvene alge *Galdieria partita*, utvrđene dvije izoforme (Sano i sur., 2001). Svojstva enzima i lokalizacija unutar stanice se također razlikuju između različitih vrsta eukariotskih alga. Tako je kod vrste *Euglena gracilis* APX lokalizirana u citoplazmi (Shigeoka i sur., 1980), a u vrsta *Chlamydomonas reinhardtii* i *Chlamydomonas* sp. u stromi kloroplasta (Takeda i sur., 1997; Takeda i sur., 2000). Istraživanja su pokazala da se aktivnost APX-a u stanicama jednostaničnih zelenih alga povećava pod utjecajem različitih čimbenika koji uzrokuju oksidacijski stres kao što su teški metali (Tripathi i sur., 2006), UV-A zračenje (White i Jahnke, 2002) i povišeni salinitet (Nikookar i sur., 2004)

2.3.2. Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza (engl. *glutathione reductase* – GR; EC 1.6.4.2) katalizira redukciju oksidiranog glutationa (GSSG) u reducirani oblik (GSH) reakcijom ovisnom o NADPH:

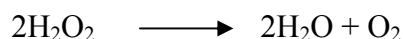


Glutation je tiolni tripeptid, univerzalan u biljkama i ostalim fotosintetskim organizmima koji u svom reduciranom obliku sudjeluje u mnogim funkcijama ključnim za stanicu, kao što su transport sumpora, održavanje proteina u reduciranom obliku, detoksifikacija ksenobiotika i različitih zagađivala te uklanjanje ROS-a nastalog djelovanjem akceptora elektrona povezanih s fotosustavom I (Rennenberg, 1982). Aktivnošću GR osigurava se dovoljna količina GSH te se uz djelovanje APX-a ubrzava uklanjanje H₂O₂ u askorbat-glutationskom ciklusu (Alscher, 1989). Transport GSH izvan stanice predstavlja zaštitni mehanizam očuvanja stanične membrane od djelovanja ROS-a. U biljaka su izoforme GR-a lokalizirane u kloroplastima, mitohondrijima, citoplazmi i peroksisomima (Romero-Puertas i sur., 2006).

Istraživanja provedena na jednostaničnim zelenim algama vrste *Chlamydomonas reinhardtii* potvrdila su postojanje dviju izoformi GR-a koje odgovaraju izoenzimima pronađenim u citoplazmi i kloroplastima viših biljaka (Serrano i Llobell, 1993). Promjene u aktivnosti GR u stanicama alga zabilježene su u uvjetima stresa uzrokovanim tretmanima herbicidima (Schmidt i Kunert, 1986) i teškim metalima (Tripathi i sur., 2006).

2.3.3. Katalaza

Katalaza (engl. *catalase* – CAT; EC 1.11.1.6) je tetramerni enzim s hemom u svakoj podjedinici, koji katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i kisik:



CAT ima visoku katalitičku učinkovitost, ali izrazito nizak afinitet prema supstratu (H₂O₂) jer je za samu reakciju potreban simultani ulazak dvije molekule H₂O₂ u aktivno mjesto (Willekens i sur., 1995). U biljnim stanicama je pronađeno nekoliko izoformi CAT, većinom prisutnih u peroksisomima i glioksisomima te specifična izoforma (CAT3) otkrivena u mitohondrijima stanica kukuruza (Scandalios i sur., 1980). CAT uklanja većinu H₂O₂ nastalog fotorespiracijom i β-oksidacijom masnih kiselina, ali i ROS-a nastalog pri različitim stresnim uvjetima. Prilikom fotorespiracije u peroksisomima viših biljaka H₂O₂ nastaje djelovanjem

enzima glikolat-oksidge, dok je kod nekih vrsta zelenih alga, uključujući vrstu *Chlamydomonas reinhardtii*, ovaj enzim zamijenjen glikolat-dehidrogenazom. Unatoč tome što enzim glikolat-dehidrogenaza ne stvara H₂O₂, kod *C. reinhardtii* je uz forme prisutne u mikrotjelešcima također utvrđena prisutnost CAT3 u mitohondrijima, čija fiziološka uloga još nije poznata (Kato i sur., 1997).

Do povećanja aktivnosti CAT u alga može doći u različitim stresnim uvjetima, primjerice nakon tretmana teškim metalima (Tripathi i sur., 2006; Sabatini i sur., 2009), herbicidima (Liu i Xiong, 2009; Romero i sur., 2011), ili pod utjecajem patogena (Nedeva i sur., 2008).

2.4. Neenzimatski antioksidansi

2.4.1. Karotenoidi

Karotenoidi pripadaju razredu terpenoidnih pigmenata građenih od lanaca ugljikovodika s brojnim konjugiranim dvostrukim vezama na koje se vežu različite cikličke skupine i funkcionalne skupine koje sadrže kisik. U biljnim stanicama nalazimo ugljikovodične karotenoide karotene te njihove oksigenirane derivate ksantofile. Karotenoidi predstavljaju integralni dio tilakoidnih membrana, gdje zajedno s klorofilima stvaraju komplekse s proteinima među kojima su najvažnija reakcijska središta i sustavi skupljača svjetlosti fotosustava I i II te kompleks citokroma *b₆f*. Kao i biljke, zelene alge u fotosustavima sadrže dva tipa klorofila, klorofil *a* kao osnovni pigment odgovoran za apsorpciju svjetlosti i klorofil *b*. Uz klorofile, karotenoidi imaju važnu ulogu u fotosintezi, gdje osim što sudjeluju u apsorpciji svjetlosti, zaštićuju i stabiliziraju strukturu fotosintetskih kompleksa gasći pobuđeno stanje klorofila, suzbijajući stvaranje ROS-a (posebice ¹O₂) te otpuštajući višak energije u obliku topline (Guedes i sur., 2011). U cijanobakterija se osim u tilakoidnim membranama, pojavljuju i u staničnoj membrani (Takaichi, 2011).

Zelene alge imaju jednak sadržaj osnovnih karotenoida kao i više biljke, a među njima su najvažniji β-karoten, α-karoten, lutein, violaksantin i neoksantin (Goodwin i Britton, 1988). Neke vrste stvaraju velike količine sekundarnih karotenoida tzv. ketokarotenoida u uvjetima stresa, posebice astaksantina, kantaksantina i ehinenona (Orosa i sur., 2000). Za razliku od primarnih karotenoida u tilakoidnim membranama, ovi spojevi se akumuliraju u lipidnim vezikulama u stromi plastida ili citoplazmi (Guedes i sur., 2011) kao reakcija na svjetlost visokog intenziteta i nedostatak dušika (Orosa i sur., 2000), UV-B zračenje (Malanga i sur, 1997) te tretmane teškim metalima (Mallick, 2004), prooksidansima (Ip i Chen, 2005) ili

policikličkim aromatskim ugljikovodicima (Gala i Giesy, 1993). Karotenoidi predstavljaju važnu skupinu antioksidansa u alga te je dokazana njihova velika uloga u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu ovih organizama (Goiris i sur., 2012). Za predstavnike zelenih alga razreda Trebouxiophyceae karakteristični karotenoidi su β -karoten, violaksantin, neoksantin i lutein, a za pojedine vrste i zeaksantin (Takaichi, 2011).

2.4.2. Fenoli

U višim biljkama fenoli predstavljaju brojnu i raširenu skupinu sekundarnih metabolita. Uz dva najvažnija puta biosinteze (put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline), u uvjetima stresa je njihova proizvodnja indirektno stimulirana biosintezom prolina, koji inducira nastanak njihovih prekursora pentoza-fosfatnim putem (Hare i Cress, 1997). Fenolni spojevi su važni antioksidansi u biljkama, posebice složene molekule flavonoida koje pokazuju višestruke antioksidacijske mehanizme. Flavonoidi mogu inhibirati oksidaciju lipida (Pietta, 2000) direktno hvatanjem $\cdot\text{OH}$, HOCl , $^1\text{O}_2$ i peroksilnih radikala te keliranjem metala i inhibicijom lipoksigenaza.

Uloga fenola i njihovo antioksidacijsko djelovanje u algama, posebice mikroalgama, je slabo istraženo. Jednostanične alge koriste iste osnovne biokemijske procese za proizvodnju fenolnih antioksidansa kao i više biljke (König i Wright, 1993). Istraživanja Klejduš i sur. (2010) dokazala su prisutnost različitih vrsta flavonoida u eukariotskim algama i cijanobakterijama, kao što su izoflavoni, flavanoni, flavonoli i dihidrohalkoni. Veliki sadržaj fenolnih kiselina, posebice galne, klorogenske, cimetine, p-hidroksibenzojeve, kumarinske, kavine, vanilinske i ferulinske, utvrđen je u stanicama cijanobakterije *Spirulina maxima* (Abd El-Baky i sur., 2009). U svrhu masovnog uzgoja i proizvodnje alternativnih farmakoloških pripravaka ekstrakata alga za liječenje bolesti uzrokovanih različitim oksidacijskim oštećenjima, istražuje se odnos između sadržaja fenola i ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ovih organizama. Smatra se da upravo veliki sadržaj fenola pridonosi njihovom antioksidacijskom djelovanju (Hajimahmoodi i sur., 2009). Istraživanja metanolnih ekstrakata alge *Chlorella vulgaris* su dokazala da su za takvo djelovanje zaslužne fenolne kiseline, kao što su salicilna, sinapna, klorogenska, kumarinska i kavina kiselina (Miranda i sur., 2001). Povećane koncentracije ukupnih fenola u stanicama jednostaničnih zelenih alga utvrđene su prilikom tretmana željezom (Iriani i sur., 2011) te izlaganja UV-A i UV-C zračenju (Duval i sur., 2000). Kod cijanobakterija se sinteza fenolnih spojeva, pretežno fenolnih kiselina i flavonoida, može pospješiti uzgojem u mediju s povišenim koncentracijama NaNO_3 i

fenilalanina, u svrhu korištenja njihovih ekstrakata za inhibiciju lipidne peroksidacije (Abd El-Baky i sur., 2009).

2.4.3. Askorbinska kiselina

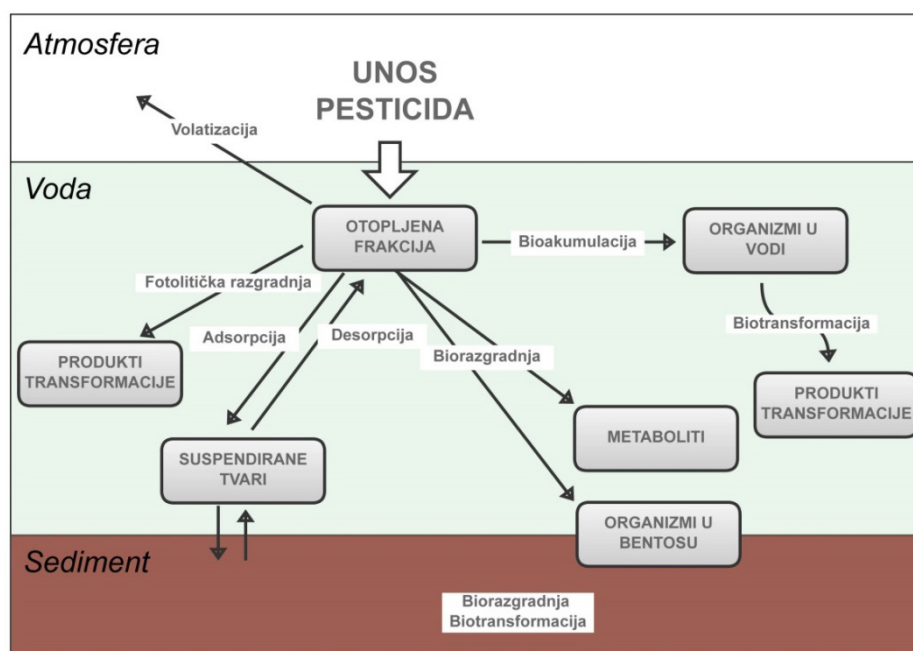
Askorbinska kiselina djeluje kao važan antioksidans u citoplazmi, mitohondrijima, vakuolama i kloroplastima gdje izravno reagira s $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ i $^1\text{O}_2$ te sudjeluje također u uklanjanju H_2O_2 putem askorbat-glutationskog ciklusa. Veliki sadržaj askorbinske kiseline, s koncentracijama preko 20 mM, zabilježen je u kloroplastima (Smirnoff i Wheeler, 2000). Osim u stromi, prisutna je i u tilakoidima, gdje ima važnu ulogu u regeneraciji membranskih karotenoida i tokoferola (Mallick i Mohn, 2000). Osim kao antioksidans, djeluje i kao kofaktor enzima, prekursor za sintezu oksalata i tartarata te sudjeluje u rastu stanične stijenke i produljivanju stanice, otpornosti organizma na stres te u sintezi etilena, giberelina, antocijanina i hidroksiprolina (Smirnoff i Wheeler, 2000). Askorbinska kiselina ima dva oksidirana oblika, MDHA i dehidroaskorbat (DHA). MDHA nastaje kao produkt reakcije APX u kloroplastima ili samom oksidacijom AA u reakcijama s ROS, primjerice $\cdot\text{O}_2^-$ ili $\cdot\text{OH}$ ili regeneriranjem α -tokoferola. Ukoliko se brzo ne reducira u AA, dolazi do spontanog disproporcioniranja u AA i DHA. DHA je također nestabilan pri pH većem od 6 te se mora brzo prevesti u askorbat. Za regeneraciju AA odgovorna su dva enzima, monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR) koja koristi NAD(P)H kao reducens za direktno recikliranje AA i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) koja za regeneraciju koristi GSH. GSSG nastao tom reakcijom reducira se ponovo pomoću enzima GR (Arora i sur., 2002). Reakcije sukcesivnih oksidacija i redukcija askorbata, glutationa i NADPH pomoću navedenih enzima u svrhu uklanjanja H_2O_2 , nastalog u kloroplastima dismutacijom $\cdot\text{O}_2^-$ djelovanjem superoksid-dismutaze (SOD), čine askorbat-glutationski ili tzv. Halliwell-Asada ciklus (Mallick i Mohn, 2000).

Akumulacija askorbinske kiseline u stanicama zelenih alga utvrđena je kod tretmana herbicidima (Fodorpataki i sur., 2009) i teškim metalima (Estevez i sur., 2001) te pri zajedničkom djelovanju više stresnih faktora, kao što su nedostatak dušika, solni stres i UV-B zračenje (Abd El-Baky i sur., 2004).

2.5. Herbicidi i njihovo djelovanje

Herbicidi su skupina pesticida i obuhvaćaju široku paletu kemijskih spojeva koji različitim mehanizmima djelovanja služe suzbijanju nepoželjnih biljnih vrsta te alga, mahovina i lišajeva. Od ukupne količine primijenjenih pesticida u Europi 35% se odnosi na herbicide (NOVA, 2003). Osnovni mehanizmi djelovanja herbicida uključuju inhibiciju sinteze aminokiselina, inhibiciju fotosinteze, biosinteze lipida, karotenoida, celuloze te folne kiseline, kao i inhibiciju diobe stanica te svjetlošću potpomognuto bijeljenje (engl. *photobleaching*).

Na razini Europske unije, herbicidi su najčešće upotrebljavana sredstva za zaštitu ratarskih kultura (Eurostat, 2007). Sukladno tome, predstavljaju i najveća zagađivala voda u područjima s intenzivnom poljoprivrednom proizvodnjom te su često prisutna u izrazito visokim koncentracijama čak i u podzemnim vodama (Guzzella i sur., 2006). Postojanost herbicida u okolišu ovisi o više čimbenika, kao što su učestalost primjene, postojanost herbicida u tlu i mobilnost, oborine, topografija i klima (Lin i sur., 1999). Nakon što određena količina primijenjenog herbicida dospije u tlo, o svojstvima same tvari ovisi dužina trajanja njenog aktivnog djelovanja i zadržavanja u tlu te o intenzitetu ispiranju i unosa u površinske i podzemne vode (Ng i Clegg, 1997). Pesticidi su u vodenim ekosustavima izloženi različitim fizikalnim, kemijskim i mikrobiološkim procesima, kao što su fotolitička razgradnja, volatilizacija, sedimentacija, resuspenzija, adsorpcija/desorpcija, biorazgradnja, bioakumulacija i biotransformacija (Holvoet i sur., 2007) (Slika 5).



Slika 5. Reakcije pesticida u površinskim vodama
(prema Holvoet i sur., 2007).

Direktivom Europskog parlamenta i Vijeća (98/83/EC) propisane su dozvoljene koncentracije pesticida u površinskim vodama namijenjenim za ljudsku potrošnju, s граниčnim vrijednostima od 0,1 µg/L za pojedinu tvar te 0,5 µg/L za ukupni sadržaj. Uvođenjem Okvirne direktive o vodama (2000/60/EC) određene su mjere kojima bi se do 2015. godine poboljšao ekološki i kemijski status površinskih i podzemnih voda u Europi kroz integrirani sustav monitoringa, procjene stanja i upravljanja vodama. U mnogim europskim zemljama se tek uvode programi monitoringa, a u većini ostalih se iz dostupnih podataka još uvijek ne može procijeniti niti predvidjeti opći trend onečišćenja (Guzzella i sur., 2006). Koncentracija herbicida u površinskim vodama u Europi često premašuje dozvoljene vrijednosti (Debenest i sur., 2010; Müller i sur., 2002). To je najčešće rezultat iznenadnih točkastih izvora onečišćenja ili obilnih kiša i poplava zbog kojih dolazi do pojave maksimalnih koncentracija herbicida koje mogu toksično djelovati na alge čak i nakon razdoblja primjene (Vallotton i sur., 2008a). Zbog fizioloških osobina sličnih višim biljkama, jednostanične zelene alge su izrazito osjetljive na djelovanje herbicida, brzo na njih reagiraju i akumuliraju ih (Gonzalez-Barreiro i sur., 2006), no postoje velike razlike u osjetljivosti pojedinih vrsta na njihovo djelovanje (Pavlič i sur., 2006). Mehanizmi toksičnosti 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).

S-metolaklor i terbutilazin su dva najčešće korištena herbicida u Europskoj uniji (Eurostat, 2007). Unatoč malom broju studija vezanih uz praćenje koncentracija pojedinačnih herbicida, prisutnost S-metolaklora i terbutilazina utvrđena je u površinskim i podzemnim vodama diljem Europe (Müller i sur., 2002; Guzzella i sur., 2006; Pérez i sur., 2011). Višegodišnjim praćenjem kvalitete vode Dunava i njegovih pritoka utvrđene su povišene koncentracije ovih herbicida, s maksimalnom koncentracijom metolaklora (2,1 µg/L) utvrđenom u rijeci Raab u Austriji i terbutilazina (4,9 µg/L) u Dunavu u Mađarskoj (Kaloyanova-Simeonova, 1998).

S-metolaklor pripada skupini kloroacetanilida te služi suzbijanju jednogodišnjih uskolisnih i manjeg broja širokolisnih korova te se najčešće primjenjuje za zaštitu soje, suncokreta, šećerne repe, duhana i kukuruza. Biljka ga usvaja kroz izdanak i kotiledone, a manjim dijelom i korijenom te transportira akropetalno kroz ksilem. Metolaklor je uveden na tržište kao racematna smjesa koja je sadržavala jednak omjer R- i S- enantiomera. U novije vrijeme se primjenjuje uglavnom samo S-metolaklor jer je potvrđeno da je upravo taj izomer zaslužan za većinu herbicidalnog djelovanja te se na taj način uvelike smanjila količina herbicida potrebna za zaštitu usjeva (Liu i Xiong, 2009). Djelovanje S-metolaklora, kao i ostalih kloroacetanilida, temelji se na inhibiciji enzima sintaze, jednog od četiri enzima koji čine enzimski klaster

elongazu, odgovornu za produljenje CoA-aktiviranih C16- i C18-alkil supstrata u C20-alkil supstrate te nastanak masnih kiselina vrlo dugog lanca (engl. *very-long-chain fatty acids* – VLCFA) (Götz i Böger, 2004). Najveći udio VLCFA se nalazi u staničnim membranama, a njihovim nedostatkom membrane gube integritet i postaju propusne uzrokujući smrt tretirane biljke (Matthes i Böger, 2002). Sličan mehanizam djelovanja kloroacetanilida utvrđen je i kod zelenih alga roda *Scenedesmus* (Böger i sur., 2000). Ovi herbicidi uzrokuju čitav niz fizioloških promjena u biljkama utječući na sintezu giberelina i fenilpropanskih kiselina, inhibiraju inkorporaciju leucina u korijen i mobilizaciju škroba te povećavaju osmotski potencijal korijena (pregled istraživanja u Böger i sur., 2000). Također su i alkilirajući agensi te se vežu *in vitro* za nukleofile kao što su glutation i cistein (Leavitt i Penner, 1979).

Terbutilazin je triazinski herbicid koji se koristi za suzbijanje jednogodišnjih širokolisnih korova s najčešćom primjenom u zaštiti kukuruza, suncokreta, kao i starijih nasada voćaka i vinove loze. U SAD-u je također registriran i kao algicid (Heri i sur., 2008). Uveden je kao zamjena atrazinu, jednom od najčešćih i vrlo postojanih zagađivala površinskih i podzemnih voda. Upotreba atrazina je zabranjena 2004. godine na području Europske unije, a neke od zemalja članica ograničile su, a zatim i zabranile njegovu primjenu još 90-tih godina (Carafa i sur., 2007). Terbutilazin je inhibitor fotosustava II koji uzrokuje svjetlošću potpomognuto stvaranje ROS-a (uglavnom $^1\text{O}_2$) u kloroplastima (Hess, 2000). Triazini inhibiraju fotosintezu vežući se na D1 protein fotosustava II na mjestu vezanja mobilnog plastokinona (Q_B). Na taj način se zaustavlja prijenos elektrona s vezanog plastokinona (Q_A) na Q_B te se zaustavlja fiksacija CO_2 kao i stvaranje ATP-a i NADPH potrebnih za osnovne metaboličke reakcije. Veća oštećenja nastaju zbog nemogućnosti ponovne oksidacije Q_A zbog čega nastaje tripletno stanje klorofila koji reagira s kisikom stvarajući singletni kisik. I $^1\text{O}_2$ i tripletni klorofil mogu reagirati s nezasićenim masnim kiselinama stvarajući lipidne radikale i uzrokujući lipidnu peroksidaciju oštećujući proteine, pigmente i membrane koje postaju propusne dovodeći do uginuća organizma (Rutherford i Krieger-Liszkay, 2001).

Istraživanja su dokazala nakupljanje različitih ksenobiotika u stanicama alga te njihov trofički prijenos duž hranidbenog lanca (Munoz i sur., 1996) što za posljedicu ima širenje oksidacijskog stresa (Chaufan i sur., 2006). Neki herbicidi uzrokuju oksidacijski stres samim stvaranjem radikala ili inhibiranjem različitih biosintetskih putova (Arora i sur., 2002). Istraživanja na jednostaničnim zelenim algama dokazala su različite morfološke i fiziološke promjene uzrokovane djelovanjem herbicida, s posebnim naglaskom na promjene nastale u uvjetima oksidacijskog stresa, lipidnu peroksidaciju te povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima (Liu i Xiong, 2009), akumulaciju neenzimatskih antioksidansa (Fodorpatiki i sur.,

2009) te prisutnost reaktivnih aldehida i promjene u staničnoj ultrastrukturi (Qian i sur., 2008).

3. CILJ RADA

3. CILJ RADA

Zbog velikog sadržaja ω -3 i ω -6 masnih kiselina jednostanične zelene alge su izrazito podložne djelovanju reaktivnih kisikovih tvari te predstavljaju prikladan model za istraživanje oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije. Pretpostavka je da herbicidi S-metolaklor i terbutilazin te vodikov peroksid kao snažni prooksidans, uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih tvari u stanicama jednostanične zelene alge *Chlorella kessleri* Fott et Nováková. Oksidacijski stres u stanicama alga ima za posljedicu promjene u osnovnim fiziološkim parametrima, staničnoj ultrastrukturi te rezultira povećanim stvaranjem 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) i potiče antioksidacijski odgovor.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi kako tretmani herbicidima i vodikovim peroksidom utječu na rast, koncentraciju fotosintetskih pigmenata, stvaranje reaktivnih kisikovih tvari, antioksidacijski odgovor i ultrastrukturu stanica *C. kessleri*.
2. Utvrditi prisutnost HNE-proteinskih konjugata u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana toksikantima te povezanost između količine HNE-a u stanicama i njihove prilagodbe na stres.

4. MATERIЈAL I METODE

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Kultura alga *Chlorella kessleri*

Kultura *C. kessleri* soj LARG/1 korištena u eksperimentu uzgojena je u laboratoriju Botaničkog instituta Češke akademije znanosti u Třeboňu te kultivirana u Laboratoriju za ekofiziologiju alga Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4.2. Određivanje utjecaja herbicida i vodikovog peroksida na kulturu *C. kessleri* u logaritamskoj fazi rasta

4.2.1. Uvjeti uzgoja

Kulture *C. kessleri* uzgajane su u tekućem hranjivom mediju (BBM, Bischoff i Bold, 1963) u uzgojnoj komori pri fotoperiodu od 16 sati svjetlosti i 8 sati tame, količini svjetlosti od oko $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ i temperaturi od $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Kulture su održavane redovnim presađivanjem (svaka dva tjedna) u BBM-u kako bi se osigurao dovoljan broj stanica za pokus. Tretirane su pri istim uvjetima uzgoja u sterilnim Erlenmeyerovim tikvicama od 250 mL zatvorenim vatenim čepovima (Slika 6). Stanice su tretirane u eksponencijalnoj fazi rasta (3-5 dana stare kulture). Početna koncentracija stanica nasadenih u 120 mL BBM-a iznosila je 5×10^5 stanica/mL.



Slika 6. Kulture *C. kessleri* u uzgojnoj komori (fotografija: D. Špoljarić).

4.2.2. Tretmani herbicidima i vodikovim peroksidom

Za tretiranje kultura *C. kessleri* korišteni su komercijalni pripravci herbicida S-metolaklora (Dual Gold 960 EC, 960 g/L djelatne tvari, Syngenta, Švicarska) i terbutilazina (Terazin SC 50, 500 g/L djelatne tvari, Herbos, Hrvatska) (*Tablica 2*) te otopina vodikovog peroksida (H_2O_2 , 30%, Kemika, Hrvatska) kao pozitivna kontrola.

Pripravak herbicida S-metolaklora formuliran je kao tekući koncentrat za emulziju, a pripravak herbicida terbutilazina nalazi se u obliku tekuće koncentrirane suspenzije.

Formulacije herbicida i H_2O_2 otopljeni su u BBM-u te su kulture tretirane sljedećim koncentracijama: 2, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$ S-metolaklora; 5, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ terbutilazina i 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM H_2O_2 . Uzorci stanica za sve analize prikupljeni su 0, 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana, osim uzoraka za određivanje sadržaja askorbinske kiseline i analizu stanične ultrastrukture koji su prikupljeni 72 h nakon tretmana. Kontrolne kulture uzgajane su pri jednakim uvjetima, ali bez tretmana toksikantima. Tijekom pokusa, kulture su promiješane tri puta dnevno i razmještene unutar uzgojne komore, kako bi se umanjile prostorne razlike u osvjetljenju i temperaturi.

4.2.3. Praćenje rasta kultura i određivanje suhe tvari

Rast kultura praćen je spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće suspenzije stanica. Prilikom uzorkovanja je po 1,3 ml svake kulture prebačeno u plastičnu kivetu te je apsorbancija uzoraka mjerena spektrofotometrom (Shimatzu, Japan) pri 750 nm (OD_{750}). Prirast je također praćen brojanjem stanica prethodno fiksiranih u 4%-tnoj otopini formaldehida (Estevez i sur., 2001) u Bürker-Türkovojoj komorici invertnim mikroskopom (Axiovert 25, Carl Zeiss, Inc., Njemačka). Broj stanica je koreliran s vrijednostima OD_{750} ($r=0,989$; $P=0,000$). Prirast kultura (r) izračunat je prema formuli:

$$r \text{ (d}^{-1}\text{)} = \ln (OD_{750n}/OD_{750o})/(t_n-t_o)$$

pri čemu je

OD_{750o} - optička gustoća izmjerena na 750 nm na početku eksperimenta (0-to vrijeme)

OD_{750n} - optička gustoća izmjerena na 750 nm nakon n dana (t_n)

Vrijednosti optičke gustoće preračunate su u suhu tvar (DW) prema Lukavský (1992) korištenjem sljedeće formule:

$$DW \text{ (mg/L)} = 3,31 + 179,45 \times A_{750} + 617,45 \times A_{750}^2$$

pri čemu je A_{750} - apsorbancija uzorka izmjerena na 750 nm.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva S-metolaklora i terbutilazina

(http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/1027.htm; http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/623.htm).

	S-metolaklor	Terbutilazin
Strukturna formula		
Kemijska formula	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	$C_9H_{16}ClN_5$
Kemijski naziv prema IUPAC-u	Smjesa izomera: ($\alpha RS, 1S$)-2-klor- <i>N</i> -(6-etil- <i>o</i> -tolil)- <i>N</i> -(2-metoksi-1-metiletil) acetamid (80-100%) i ($\alpha RS, 1R$)-2-klor- <i>N</i> -(6-etil- <i>o</i> -tolil)- <i>N</i> -(2-metoksi-1-metiletil) acetamid (20-0%)	<i>N</i> 2- <i>tert</i> -butil-6-klor- <i>N</i> 4-etil-1,3,5-triazin-2,4-diamin
Molekulska masa (g/mol)	283,79	229,71
CAS broj	87392-12-9/178961-20-1	5915-41-3
EINECS broj	257-060-8	227-637-9
CIPAC broj	607	234
pKa pri 25°C	-	1,9
Tlak para pri 25°C (mPa)	3,7	0,12
Topljivost u vodi pri 20°C (mg/L)	480	6,6

4.2.4. Određivanje koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*

Za analizu koncentracija klorofila *a* (Chl*a*) i klorofila *b* (Chl*b*), 10 ml svake kulture profiltrirano je uz pomoć vakuuma sisaljke kroz Whatman GF/C filtere (Whatman International Ltd., Engleska), koji su zatim pohranjeni na -20°C do daljnje analize. Filteri su homogenizirani u tarioniku s tučkom uz dodatak 5 mL 90%-tnog acetona te je sadržaj prebačen u plastične kivete s čepom. Ekstrakcija se odvijala tijekom 24 h u mraku na 4°C. Ekstrakti su centrifugirani na 3000 okr/min 10 min te je apsorbancija ekstrakata mjerena spektrofotometrom Specord 40 (Analytik Jena AG, Njemačka) pri valnim duljinama od 630, 645, 663 i 750 nm. Koncentracije Chl*a* i Chl*b* su izračunate prema SCOR-UNESCO (1966) te Strickland i Parsons (1972) prema sljedećim formulama:

$$\text{Chl}a = (11,64 \times A_{663} - 2,16 \times A_{645} + 0,10 \times A_{630}) \times v/V \times d$$

$$\text{Chl}b = (20,97 \times A_{645} - 3,94 \times A_{663} - 3,66 \times A_{630}) \times v/V \times d$$

pri čemu je

A_{630} - apsorbancija ekstrakta izmjerena na 630 nm i umanjena za vrijednost apsorbancije na 750 nm

A_{645} - apsorbancija ekstrakta izmjerena na 645 nm i umanjena za vrijednost apsorbancije na 750 nm

A_{663} - apsorbancija ekstrakta izmjerena na 663 nm i umanjena za vrijednost apsorbancije na 750 nm

v - volumen ekstrakta u mL

d - duljina kivete u cm

V - volumen uzorka u L

Koncentracije Chl*a* i Chl*b* izražene su u mg/L kulture.

4.2.5. Analiza sadržaja reaktivnih kisikovih tvari

Za analizu sadržaja ROS-a u stanicama *C. kessleri* korištena je metoda deacilacije i oksidacije 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA, Fluka AG, Švicarska) u fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (Poljak-Blaži i sur., 2011). Spoj DCFH-DA je visoko reaktivan s H₂O₂ i standardno se koristi za određivanje stvaranja ROS-a. Nakon tretmana je u mikroeprevete prebačeno po 700 μL svake kulture i centrifugirano pri 3000 okr/min tijekom 2 min na 4°C. Nakon uklanjanja medija, stanice su inkubirane sa 100 μM otopinom DCFH-DA

u Hanksovoj otopini soli (HBSS) na 25°C u mraku. Slijepa probe su napravljene paralelno za svaki uzorak na isti način, ali su stanice inkubirane samo u HBSS-u. Nakon inkubacije, stanice su centrifugirane, supernatant je uklonjen te je u svaku mikroeprevetu dodano po 700 µL HBSS-a. Po 200 µL svakog uzorka je u triplicatu nanoseno na bijelu mikrotitarsku pločicu sa 96 bunarića (Nunc, Danska) te je intenzitet fluorescencije mjereno Cary Eclipse fluorescentnim spektrofotometrom (Varian, SAD) sa ekscitacijom na 500 nm i emisijom na 529 nm. Vrijednost fluorescencije uzorka dobivena je tako što je od intenziteta fluorescencije stanica inkubiranih s DCFH-DA oduzeta vrijednosti intenziteta fluorescencije stanica inkubiranih sa HBSS-om.

4.2.6. Enzimatski antioksidansi

4.2.6.1. Ekstrakcija topljivih proteina

Za ekstrakciju topljivih proteina, 80 mL svake kulture je centrifugirano pri 4000 okr/min tijekom 10 min. Stanice su prebačene u mikroeprevete i isprane u 1 mL kalij-fosfatnog pufera (sadržavao je 0,1 M K_2HPO_4 , 0,1 M KH_2PO_4 i 1 mM EDTA (pH 7,0)). Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su smrznute uranjanjem u tekući dušik i usitnjavane homogenizatorom (Pellet Pestle Motor®, Kontes, SAD) tijekom 2 min na ledu. Postupak je ponovljen još 2 puta nakon čega je u svaku eprevetu dodan po 1 mL ekstrakcijskog pufera. Homogenat je centrifugiran 15 min pri 18000g na 4°C. Supernatant je zatim prebačen u čistu eprevetu te je korišten kao ekstrakt za spektrofotometrijsko određivanje ukupne aktivnosti enzima katalaze, askorbat-peroksidaze, glutation-reduktaze, koncentracije proteina i dot-blot analizu.

4.2.6.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je prema Bradford (1976), metodom koja se temelji na mjerenju apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm u reakciji proteinskog ekstrakta i Bradfordovog reagensa čiji je osnovni sastojak boja Coomassie briljant plavo. Reakcijska smjesa sadržavala je 50 µL proteinskog ekstrakta i 950 µL Bradfordovog reagensa (Coomassie blue G, 96%-tni etanol, 14,79 M fosfatna kiselina, dH_2O). Za slijepu probu je umjesto proteinskog ekstrakta dodan pufer. Koncentracija proteina izračunata je iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije u reakciji Bradfordovog reagensa i niza otopina albumina

goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine* - BSA) poznatih koncentracija (0,01-0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

4.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) određena je prema Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa (pH 7,0) sadržavala je 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinsku kiselinu i 12 mM H_2O_2 . U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 790 μL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM otopinu EDTA, 40 μL 50 mM otopine askorbinske kiseline, 100-200 μL sirovog ekstrakta proteina te 20 μL 30% otopine H_2O_2 čijim je dodatkom započela reakcija. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. APX je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira redukciju 1 μmol supstrata po minuti, a izračunata prema sljedećoj formuli:

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = [(dA_{290}/dt)/\epsilon] \times v_f \times 1000 \times (v_t/v_s)$$

pri čemu je

dA_{290}/dt – promjena apsorbancije u vremenu na valnoj duljini od 290 nm izražena u $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$

ϵ – ekstinkcijski koeficijent enzima askorbat-peroksidaze ($2,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

v_f – ukupni volumen reakcijske smjese

v_t – ukupni volumen ekstrakta

v_s – volumen dodanog ekstrakta

Specifična aktivnost enzima izražena je kao broj enzimskih jedinica po μg proteina.

4.2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) određena je prema protokolu za GR assay kit (Oxford Biomedical Research). Reakcijska smjesa (pH 7,5) sadržavala je 0,1 M KH_2PO_4 , 0,1 M K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 2 mM NADPH i 2 mM GSSG. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 500 μL 2mM otopine GSSG, 400 μL 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA te 50 μL ekstrakta proteina i 50 μL 2mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svake sekunde tijekom jedne minute.

GR je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira redukciju 1 μmol supstrata po minuti, a izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = [(dA_{340}/dt)/\varepsilon] \times v_f \times 1000 \times (v_t/v_s)$$

pri čemu je

dA_{340}/dt – promjena apsorbancije u vremenu na valnoj duljini od 340 nm izražena u $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$

ε – ekstinkcijski koeficijent enzima glutation-reduktaze ($6,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

v_f – ukupni volumen reakcijske smjese

v_t – ukupni volumen ekstrakta

v_s – volumen dodanog ekstrakta

Specifična aktivnost enzima izražena je kao broj enzimskih jedinica po μg proteina.

4.2.6.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze (CAT) određena je prema Aebi (1984). Reakcijska smjesa (pH 7,0) sadržavala je 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 te 0,01 M H_2O_2 . Na 1950 μL reakcijske smjese dodano je 50 μL sirovog ekstrakta proteina te je pri valnoj duljini od 240 nm mjereno smanjenje apsorbancije svakih deset sekundi tijekom 2 minute. CAT je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira redukciju 1 μmol supstrata po minuti, a izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$U (\mu\text{mol}/\text{min}) = [(dA_{240}/dt)/\varepsilon] \times v_f \times 1000 \times (v_t/v_s)$$

pri čemu je

dA_{240}/dt – promjena apsorbancije u vremenu na valnoj duljini od 240 nm izražena u $\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$

ε – ekstinkcijski koeficijent enzima katalaze ($39,4 \text{ mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

v_f – ukupni volumen reakcijske smjese

v_t – ukupni volumen ekstrakta

v_s – volumen dodanog ekstrakta

Specifična aktivnost enzima izražena je kao broj enzimskih jedinica po μg proteina.

4.2.7. Neenzimatski antioksidansi

4.2.7.1. Određivanje koncentracije ukupnih karotenoida

Koncentracija ukupnih karotenoida (Car) izmjerena je iz ekstrakta za određivanje koncentracije klorofila dobivenog postupkom opisanim u poglavlju 4.2.4. Koncentracija Car je određena mjerenjem apsorbancije ekstrakta na valnim duljinama od 480 i 750 nm. Koncentracija Car je izračunata prema Strickland i Parsons (1972) korištenjem sljedeće formule:

$$\text{Car} = 4 \times A_{480} \times v/V \times d$$

pri čemu je

A_{480} - apsorbancija ekstrakta izmjerena na 480 nm i umanjena za vrijednost apsorbancije na 750 nm

v - volumen ekstrakta u mL

d - duljina kivete u cm

V - volumen uzorka u L

Koncentracija Car izražena je u mg/L kulture.

4.2.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (PHE) određen je spektrofotometrijski, metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Stanice su prebačene u mikroeprovete, smrznute uranjanjem u tekući dušik i usitnjavane homogenizatorom (Pellet Pestle Motor®, Kontes, SAD) tijekom 2 minute. Postupak je ponavljen još 2 puta nakon čega je u svaku epruvetu dodan po 1 mL otopine 70%-tnog etanola te su ekstrakti ostavljeni 48 h na 4°C, nakon čega su centrifugirani 15 min pri 18000g na 4°C. U reakcijsku smjesu koja se sastojala od 300 µL etanolnog ekstrakta, 500 µL dH₂O i 50 µL Folin-Ciocalteu reagensa je nakon miješanja na vrtložnoj miješalici dodano 150 µL zasićene otopine Na₂CO₃. Nakon miješanja su uzorci inkubirani 1 h na 37°C u vodenoj kupelji. Apsorbancija uzoraka je mjerena na 765 nm, a sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima izračunat je iz baždarnog pravca u kojem se galna kiselina koristi kao standard. Konačni sadržaj PHE izražen je u mg_{galne kiseline}/mg DW.

4.2.7.3. Određivanje sadržaja askorbinske kiseline

Sadržaj askorbinske kiseline (AA) određen je prema Bendritter i sur. (1998). Nakon 72 h tretmana, 100 mL svake kulture je centrifugirano pri 4000 okr/min tijekom 10 min. Supernatant je uklonjen, a stanice su prebačene u mikroeprevete i isprane miješanjem na vrtložnoj miješalici u 1 ml destilirane vode te centrifugiranjem pri 3000g tijekom 10 min. Supernatant je uklonjen, a stanice su smrznute uranjanjem u tekući dušik i usitnjavane homogenizatorom (Pellet Pestle Motor®, Kontes, SAD) tijekom 2 min. Postupak je ponovljen još 2 puta nakon čega je u svaku epruvetu dodan po 1 mL dH₂O. Homogenati su centrifugirani na 3000g tijekom 15 min na 4°C. Supernatant je zatim prebačen u čistu epruvetu te je korišten za određivanje sadržaja AA. U reakcijsku smjesu koja se sastojala od 300 µL vodenog ekstrakta, 100 µL 13,3%-tne otopine trikloroctene kiseline i 25 µL destilirane vode dodano je 75 µL 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) reagensa (2 g DNPH, 230 mg tiouree i 270 mg CuSO₄ u 100 mL 5M otopine H₂SO₄). Slijepe probe napravljene su paralelno za svaki uzorak na isti način, ali je DNPH reagens dodan tek nakon inkubacije. Dobivene reakcijske smjese inkubirane su u vodenoj kupelji tijekom 3 h na 37°C. Nakon inkubacije i dodavanja DNPH reagensa u slijepe probe, u sve reakcijske smjese dodano je po 500 µL 65%-tne otopine H₂SO₄. Apsorbancija uzoraka je mjerena na 520 nm te je koncentracija AA dobivena ekstrapolacijom iz baždarne krivulje s poznatim koncentracijama AA (2,5 - 20 µg/mL). Konačan sadržaj AA izražen je u µg/mg DW.

4.2.8. Analiza koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala

4.2.8.1. Ekstrakcija topljivih proteina

Proteini su izolirani prema postupku opisanom u poglavlju 4.2.6.1., a koncentracija proteina određena prema metodi opisanoj u poglavlju 4.2.6.2.

4.2.8.2. Dot-blot analiza

Prisutnost HNE-His (HNE-His) konjugata analizirana je dot-blot metodom koristeći mišje monoklonsko protutijelo na HNE-His konjugate (1g4h7 TC, Institut za biokemiju Sveučilišta Karl-Franzens u Grazu, Austrija) (Waeg i sur., 1996). Protutijelo je porijeklom iz kulture

klona "HNE 1g4" dobivenog spajanjem Sp2-Ag8 mijelomskih stanica s B-stanicama BALBc miševa imuniziranih s HNE-modificiranim hemocijaninom, a specifično je za HNE-histidinski epitop na HNE-proteinskim konjugatima.

Jednaka količina proteina svakog uzorka (6 µg proteina) nanesa je na nitroceluloznu membranu (Amersham, Engleska) aktiviranu u destiliranoj vodi. Uzorci i standardi (0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 i 10 µM HNE u 1%-tnom BSA) nanese su na membrane pod vakuumom u Bio-Dot aparatu (Bio-Dot Apparatus, Bio-Rad, SAD). Membrane su inkubirane u otopini za blokiranje (2%-tno obrano mlijeko u PBS-u) tijekom 60 min na miješalici na sobnoj temperaturi. Preko noći su inkubirane s mišjim monoklonskim protutijelom na HNE-His konjugate (1:10 u 5%-tnoj otopini BSA u PBS-u). Nakon inkubacije, membrane su isprane četiri puta u puferu za ispiranje (0,05%-tni Tween u PBS-u) u trajanju od 5 min i između kratko u destiliranoj vodi te inkubirane u otopini 10% BSA u PBS-u i H₂O₂ tijekom 20 min u mraku kako bi se blokirale endogene peroksidaze. Membrane su ponovo isprane i inkubirane s EnVision reagensom (1:25 u PBS-u) tijekom 60 min. Nakon ponovnog ispiranja, imunokompleksi su vizualizirani dodatkom otopine 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (DAB) u puferu (Dako, Danska) tijekom 1-2 min (1 kap DAB-a na 1 mL pufera). Nakon bojanja, membrana je ispirana 10 min u destiliranoj vodi. Signali su kvantificirani programom Versa Doc Imaging System (Bio-Rad, SAD) koristeći Quantity One Software. Koncentracija HNE-a je određena prema baždarnoj krivulji i izražena u µM.

4.2.9. Ultrastruktura stanica *C. kessleri*

Za analizu ultrastrukture stanica, 80 mL kontrolne kulture i kultura *C. kessleri* tretiranih tijekom 72 h najvećim koncentracijama herbicida (200 µg/L S-metolaklora i 1000 µg/L terbutilazina) centrifugirano je pri 4000 okr/min 10 min. Supernatant je uklonjen, a stanice su prebačene u mikroepuvete i isprane miješanjem na vrtložnoj miješalici u 1 mL destilirane vode te centrifugiranjem pri 3000g tijekom 10 min. Nakon ponovnog uklanjanja supernatanta, stanice su prebačene u staklene bočice te fiksirane na ledu dodatkom 1 mL otopine 2%-tnog glutaraldehida u kakodilatnom puferu (pH 7,2) pri čemu su više puta vakumirane vakuum sisaljkom te ostavljene u fiksativu preko noći na 4°C. Stanice su zatim prebačene u mikroepuvete i centrifugirane pri 2300 okr/min tijekom 5 min na 4°C. Nakon uklanjanja supernatanta, isprane su 2 puta miješanjem na vrtložnoj miješalici u 1 mL kakodilatnog pufera i centrifugiranjem pri 2300 okr/min tijekom 5 min na 4°C. Nakon uklanjanja supernatanta, slijedila je postfiksacija u 1 mL 1%-tne otopine osmijevog tetroksida tijekom 60 min u mraku

te su stanice ponovo centrifugirane. Stanice su zatim isprane 2 puta u kakodilatnom puferu na opisan način te nakon uklanjanja supernatanta dehidrirane u nizu otopina rastuće koncentracije acetona (otopine 50%, 70% i 90%-tnog acetona u kakodilatnom puferu) pri čemu je uvijek dodan 1 mL otopine, sadržaj promiješan na vrtložnoj miješalici i nakon 10 min centrifugiran pri 2300 okr/min tijekom 5 min na 4°C. Stanice su prebačene u 100%-tni aceton na 15 min te ponovo centrifugirane. Zatim su prebačene u 1 mL otopine epoksi smole u 100%-tnom acetonu (1:1) na 30 min, centrifugirane te ponovo prebačene u 1 mL iste otopine na 45 min. Stanice su zatim prebačene u čistu epoksi smolu (volumena oko 500 µL) u mikroeprovete te su ostavljene u sušioniku tijekom 72 h na 64°C. Nakon sušenja su uzorci izvađeni iz mikroeproveta te su rezani dijamantrnim nožem na ultramikrotomu (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems, Njemačka). Ultratanki prerezi debljine 70-90 nm preneseni su na bakrenu mrežicu i kontrastirani u uranil acetatu i olovnom citratu te analizirani elektronskim mikroskopom (Morgagni 268D, Philips, Nizozemska). Uspoređen je broj vakuola u kontrolnim stanicama i stanicama tretiranim herbicidima. Analizirane su slike 10 nasumce odabranih mikroskopskih polja te je uključeno najmanje 200 stanica za svaki tretman i kontrolu.

4.3. Određivanje utjecaja herbicida i vodikovog peroksida na kulturu *C. kessleri* u fazi usporavanja rasta (linearna faza)

4.3.1. Uvjeti uzgoja

Kulture *C. kessleri* uzgajane su u istim uvjetima kao što je opisano u poglavlju 4.2.1. Stanice su tretirane u fazi usporavanja rasta (7-10 dana stare kulture). Početna koncentracija stanica nasadenih u 100 mL BBM-a iznosila je 3×10^6 stanica/mL.

4.3.2. Tretmani herbicidima i vodikovim peroksidom

Formulacije herbicida i H₂O₂ otopljeni su u BBM-u te su kulture tretirane sljedećim koncentracijama: 2, 50, 100 i 200 µg/L S-metolaklora; 5, 250, 500 i 1000 µg/L terbutilazina i 0,1, 1, 5 i 10 mM H₂O₂. Uzorci stanica za sve analize prikupljeni su 0, 4, 24 i 48 h nakon tretmana. Kontrolne kulture uzgajane su pri jednakim uvjetima, ali bez tretmana toksikantima. Tijekom pokusa, kulture su promiješane tri puta dnevno i razmještene unutar uzgojne komore, kako bi se umanjile prostorne razlike u osvjetljenju i temperaturi.

4.3.3. Praćenje rasta kultura

Rast kultura praćen je na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.2.3.

4.3.4. Određivanje koncentracija klorofila *a* i klorofila *b*

Koncentracije Chl*a* i Chl*b* određene su na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.2.4.

4.3.5. Analiza sadržaja reaktivnih kisikovih tvari

Za analizu sadržaja ROS-a u stanicama *C. kessleri* korištena je metoda opisana u poglavlju 4.2.5.

4.3.6. Analiza sadržaja HNE-histidinskih konjugata

4.3.6.1. Ekstrakcija topljivih proteina

Za ekstrakciju topljivih proteina, 20 mL svake kulture je centrifugirano pri 4400 okr/min tijekom 15 min. Stanice su prebačene u mikroeprevete i isprane u 1 mL fosfatnog pufera (PBS, pH 7,0). Nakon uklanjanja supernatanta, stanicama je dodano 100 μ L PBS-a te su smrznute uranjanjem u tekući dušik i usitnjavane homogenizatorom (Pellet Pestle Motor®, Kontes, SAD) tijekom 2 min na ledu. Postupak je ponovljen još 2 puta nakon čega je u svaku epruvetu dodano još 200 μ L PBS-a. Homogenati su centrifugirani pri 13400 okr/min tijekom 15 min. Supernatanti su zatim prebačeni u čistu epruvetu te su korišteni kao ekstrakti za dot-blot analizu. Koncentracija proteina u ekstraktu određena je na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.2.6.2.

4.3.6.2. Dot-blot analiza

Za analizu prisutnosti HNE-histidinskih konjugata stanicama *C. kessleri* koncentracija proteina u ekstraktu određena je na isti način kao što je opisano u poglavlju 4.2.6.2. te je korištena dot-blot metoda opisana u poglavlju 4.2.8.2.

4.4. Statistička obrada podataka

Svi pokusi izvedeni su u tri ponavljanja. Dot-blot analiza u pokusu sa stanicama u linearnoj fazi rasta izvedena je u monoplakatu te su prikazani rezultati jednog reprezentativnog pokusa. Svi ostali uzorci mjereni su u triplikatima. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardne pogreške (SE). Prilikom statističke obrade rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA). Zbog nehomogenosti varijanci podataka, izvorni podaci aktivnosti enzima APX i GR su logaritamski transformirani kako bi se zadovoljili uvjeti za analizu varijance. Značajnost utjecaja primijenjenih tretmana u odnosu na kontrolu ispitana je Tukey HSD post hoc testom (engl. *Tukey's HSD test; honestly significant difference test*). Stupanj povezanosti istraživanih parametara utvrđen je primjenom Pearsonovog koeficijenta korelacije. Za sve testove uzeta je razina značajnosti $P < 0,05$. Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific Corporation, SAD) i Statistica 8.0 (StatSoft Inc., SAD).

5. REZULTATI

5. REZULTATI

5.1. Utjecaj herbicida i vodikovog peroksida na kulturu *C. kessleri* u logaritamskoj fazi rasta

5.1.1. Prirast kulture *C. kessleri*

Prirast kulture (r) nakon tretmana herbicidima i H_2O_2 značajno se razlikovao od prirasta kontrolnih kultura (Tablica 3). Nakon 4 h tretmana S-metolaklorom samo je najniža koncentracija herbicida (2 $\mu\text{g/L}$) značajno utjecala na smanjenje prirasta u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Nakon 24 sata tretmana značajno smanjenje prirasta u usporedbi s kontrolnim kulturama (0,567 d^{-1}) utvrđeno je pri tretmanima sa 100 i 200 $\mu\text{g/L}$ (0,420 d^{-1} odnosno 0,412 d^{-1}) herbicida ($P < 0,05$). Nakon 48 h, samo je najviša koncentracija uzrokovala značajno smanjenje prirasta (0,589 d^{-1}) u odnosu na kontrolu (0,622 d^{-1}). Značajno smanjenje prirasta uzrokovale su 72 h nakon tretmana dvije više koncentracije herbicida ($P < 0,05$). Nakon 4 h tretmana terbutilazinom, prirast kultura tretiranih koncentracijama od 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ herbicida značajno se smanjio ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu), dok je nakon 24 h jedino tretman najvišom koncentracijom terbutilazina uzrokovao značajno smanjenje u odnosu na kontrolu (0,341 d^{-1}) ($P < 0,05$). Nakon 48 h tretmana dvije najviše koncentracije terbutilazina uzrokovale su značajno smanjenje u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) s vrijednostima prirasta od 0,557 d^{-1} i 0,530 d^{-1} koje se zadržalo do kraja pokusa (0,607 d^{-1} odnosno 0,588 d^{-1}). Koncentracija od 250 $\mu\text{g/L}$ inhibirala je rast stanica tek nakon 72 h (0,627 d^{-1}) ($P < 0,05$). Nakon 4 h tretmana s H_2O_2 nije bilo značajne promjene u prirastu, iako su vrijednosti bile nešto više od kontrolnih. Nakon 24 h tretmana dvije više koncentracije (0,25 i 0,5 mM H_2O_2) stimulirale su rast stanica s vrijednostima prirasta od 0,683 d^{-1} i 0,712 d^{-1} ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Nakon 48 h tretmana, prirast se smanjivao povećanjem koncentracije, ali je samo najviša koncentracija H_2O_2 uzrokovala značajno smanjenje vrijednosti (0,590 d^{-1}). Tretmani s 0,1 i 0,5 mM H_2O_2 uzrokovali su značajno smanjenje prirasta (0,637 d^{-1} odnosno 0,628 d^{-1}) 72 h nakon tretmana ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu).

Tablica 3. Prirast (r) kultura *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) i H_2O_2 (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM).

Tretman/Vrijeme	r (d^{-1})			
	4 h	24 h	48 h	72 h
Kontrola	1,533 \pm 0,073	0,567 \pm 0,002	0,622 \pm 0,000	0,650 \pm 0,000
S-metolaklor ($\mu\text{g/L}$)				
2	1,096 \pm 0,059*	0,575 \pm 0,002	0,633 \pm 0,000	0,655 \pm 0,000
50	1,402 \pm 0,131	0,562 \pm 0,002	0,617 \pm 0,001	0,644 \pm 0,000
100	1,290 \pm 0,019	0,420 \pm 0,002*	0,616 \pm 0,000	0,646 \pm 0,000*
200	1,115 \pm 0,039	0,412 \pm 0,004*	0,589 \pm 0,008*	0,632 \pm 0,000*
Terbutilazin ($\mu\text{g/L}$)				
5	1,678 \pm 0,071	0,574 \pm 0,022	0,637 \pm 0,006	0,646 \pm 0,003
250	1,750 \pm 0,071	0,531 \pm 0,028	0,633 \pm 0,007	0,627 \pm 0,003*
500	0,864 \pm 0,071*	0,475 \pm 0,018	0,557 \pm 0,003*	0,607 \pm 0,003*
1000	1,028 \pm 0,071*	0,341 \pm 0,010*	0,530 \pm 0,005*	0,588 \pm 0,002*
H_2O_2 (mM)				
0,05	1,689 \pm 0,023	0,581 \pm 0,005	0,639 \pm 0,001	0,656 \pm 0,001
0,1	1,597 \pm 0,079	0,579 \pm 0,003	0,636 \pm 0,002	0,637 \pm 0,001*
0,25	1,707 \pm 0,005	0,683 \pm 0,005*	0,621 \pm 0,000	0,648 \pm 0,001
0,5	1,670 \pm 0,078	0,712 \pm 0,011*	0,590 \pm 0,002*	0,628 \pm 0,000*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.2. Koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

Tretman S-metolaklorom je već nakon 4 h inkubacije uzrokovao smanjenje koncentracije Chla s povećanjem koncentracije herbicida (Tablica 4). Statistički značajno smanjenje klorofila u odnosu na kontrolu (0,251 mg/L Chla) uzrokovale su koncentracije 50 $\mu\text{g/L}$ (0,192 mg/L Chla), 100 $\mu\text{g/L}$ (0,167 mg/L Chla) i 200 $\mu\text{g/L}$ (0,160 mg/L Chla) ($P < 0,05$). Trend promjena koncentracije Chla praćen je promjenama u koncentraciji Chlb te je kod svih koncentracija herbicida nakon 4 h utvrđeno statistički značajno smanjenje ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (0,091 mg/L Chlb) s prosječnom vrijednošću 0,048 mg/L (Tablica 5). Nakon 24 h tretmana sve su koncentracije herbicida izuzev najniže (2 $\mu\text{g/L}$) uzrokovale značajno smanjenje koncentracije Chla (prosječna vrijednost iznosila je 0,219 mg/L) u odnosu na kontrolu (0,318 mg/L, $P < 0,05$). Slično su se mijenjale i koncentracije Chlb ($P < 0,05$) s najmanjom utvrđenom vrijednošću (0,049 mg/L) kod tretmana sa 100 $\mu\text{g/L}$ herbicida.

Zabilježene vrijednosti bile su dvostruko manje nego u kontroli (0,117 mg/L). Nakon 48 h tretmana također je uočeno smanjenje koncentracije oba pigmenta u odnosu na kontrolu. Koncentracija Chla značajno se smanjila u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) pri tretmanu s tri više koncentracije herbicida, a značajno smanjenje koncentracije Chlb uzrokovale su sve primijenjene koncentracije herbicida ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Statistički značajne promjene u koncentraciji Chla u odnosu na kontrolu zabilježene su nakon 72 h tretmana S-metolaklorom kod svih koncentracija herbicida. Koncentracija Chlb u kulturama smanjivala se s povećanjem koncentracije herbicida, pokazujući statistički značajno smanjenje ($P < 0,05$) kod dviju najviših koncentracija herbicida, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$ (0,101 mg/L i 0,070 mg/L) u odnosu na kontrolu (0,179 mg/L).

Tretman terbutilazinom uzrokovao je značajno smanjenje koncentracije Chla nakon 4 i 24 h tretmana samo kod koncentracije 500 $\mu\text{g/L}$ (4 h: 0,199 mg/L; 24 h: 0,181 mg/L) u odnosu na kontrolu (4 h: 0,251 mg/L; 24 h: 0,318 mg/L, $P < 0,05$; *Tablica 4*). Suprotno tome, tretmani su snažnije utjecali na promjene koncentracije Chlb uzrokujući značajno smanjenje pri svim koncentracijama herbicida ($P < 0,05$; *Tablica 5*). Prosječna vrijednost iznosila je 0,064 mg/L 4 h nakon tretmana, a nakon 24 h iznosila je 0,77 mg/L. Koncentracija Chla nije se značajno promijenila u odnosu na kontrolu 48 h nakon tretmana, dok je u isto vrijeme uočena redukcija Chlb pri koncentracijama od 250 $\mu\text{g/L}$ (0,093 mg/L), 500 $\mu\text{g/L}$ (0,100 mg/L) i 1000 $\mu\text{g/L}$ (0,083 mg/L). Prilikom zadnjeg uzorkovanja (72 h) značajno smanjenje koncentracije Chla u odnosu na kontrolu (0,510 mg/L) zabilježeno je kod svih koncentracija herbicida, izuzev najniže ($P < 0,05$). Vrijednosti su se smanjivale s povećanjem koncentracije herbicida, od 0,466 mg/L do 0,338 mg/L. Smanjenje koncentracije Chlb u odnosu na kontrolu (0,179 mg/L) uzrokovali su jedino tretmani s 500 $\mu\text{g/L}$ (0,087 mg/L) i 1000 $\mu\text{g/L}$ (0,085 mg/L) terbutilazina.

U kulturama tretiranim s H_2O_2 zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije Chla 4 h nakon tretmana najvišim koncentracijama H_2O_2 , od 0,25 mM (0,121 mg/L) i 0,5 mM (0,136 mg/L), dok se koncentracija Chlb smanjila kod svih tretmana ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu), s prosječnom vrijednošću od 0,054 mg/L (*Tablice 4 i 5*). Do kraja pokusa su koncentracije 0,05 mM (izuzev 48 h tretmana), 0,25 mM i 0,5 mM uzrokovale snažno smanjenje Chla u odnosu na netretirane kulture ($P < 0,05$), dok koncentracija 0,1 mM H_2O_2 nije uzrokovala značajne razlike. Nakon 72 h tretmana zabilježena je značajna redukcija u odnosu na kontrolu (0,510 mg/L) s vrijednostima od 0,287 mg/L za tretman s 0,05 mM H_2O_2 te 0,266 mg/L i 0,313 mg/L za tretmane s 0,25 i 0,5 mM H_2O_2 . Koncentracije Chlb su se do kraja pokusa značajno smanjile u odnosu na kontrolu kod svih tretmana, izuzev 0,1 mM H_2O_2 nakon 72 h.

Tablica 4. Koncentracije klorofila *a* (Chla) kultura *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM).

Chla (mg/L)				
Tretman / Trajanje	4 h	24 h	48 h	72 h
Kontrola	0,251 ± 0,000	0,318 ± 0,04	0,371 ± 0,038	0,510 ± 0,029
S-metolaklor (µg/L)				
2	0,197 ± 0,026	0,273 ± 0,018	0,336 ± 0,002	0,444 ± 0,005*
50	0,192 ± 0,068*	0,208 ± 0,036*	0,224 ± 0,003*	0,421 ± 0,041*
100	0,167 ± 0,031*	0,184 ± 0,100*	0,296 ± 0,007*	0,427 ± 0,023*
200	0,160 ± 0,026*	0,213 ± 0,090*	0,304 ± 0,036*	0,397 ± 0,023*
Terbutilazin (µg/L)				
5	0,221 ± 0,007	0,239 ± 0,032	0,347 ± 0,06	0,446 ± 0,057
250	0,219 ± 0,008	0,265 ± 0,029	0,359 ± 0,085	0,432 ± 0,077*
500	0,199 ± 0,002*	0,181 ± 0,027*	0,332 ± 0,005	0,395 ± 0,005*
1000	0,232 ± 0,006	0,245 ± 0,05	0,318 ± 0,017	0,388 ± 0,035*
Vodikov peroksid (mM)				
0,05	0,207 ± 0,003	0,199 ± 0,038*	0,295 ± 0,018	0,287 ± 0,012*
0,1	0,221 ± 0,003	0,249 ± 0,018	0,337 ± 0,018	0,472 ± 0,022
0,25	0,121 ± 0,002*	0,193 ± 0,005*	0,223 ± 0,017*	0,226 ± 0,017*
0,5	0,136 ± 0,003*	0,206 ± 0,01*	0,207 ± 0,012*	0,313 ± 0,005*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Tablica 5. Koncentracije klorofila *b* (Chl*b*) kultura *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM).

Tretman / Trajanje	Chl <i>b</i> (mg/L)			
	4 h	24 h	48 h	72 h
Kontrola	0,091 ± 0,018	0,117 ± 0,023	0,132 ± 0,025	0,179 ± 0,014
S-metolaklor (µg/L)				
2	0,057 ± 0,022*	0,084 ± 0,008	0,081 ± 0,001*	0,125 ± 0,002
50	0,054 ± 0,035*	0,059 ± 0,036*	0,060 ± 0,005*	0,123 ± 0,009
100	0,045 ± 0,021*	0,049 ± 0,046*	0,064 ± 0,013*	0,101 ± 0,010*
200	0,035 ± 0,012*	0,054 ± 0,046*	0,072 ± 0,006*	0,070 ± 0,051*
Terbutilazin (µg/L)				
5	0,067 ± 0,003*	0,068 ± 0,014*	0,112 ± 0,027	0,146 ± 0,026
250	0,072 ± 0,004*	0,079 ± 0,013*	0,093 ± 0,039	0,150 ± 0,035
500	0,060 ± 0,001*	0,085 ± 0,012*	0,100 ± 0,002	0,087 ± 0,002*
1000	0,057 ± 0,002*	0,077 ± 0,023*	0,083 ± 0,008	0,085 ± 0,041*
Vodikov peroksid (mM)				
0,05	0,051 ± 0,012*	0,065 ± 0,017*	0,052 ± 0,008*	0,068 ± 0,008*
0,1	0,055 ± 0,021*	0,055 ± 0,008*	0,077 ± 0,028*	0,127 ± 0,000
0,25	0,053 ± 0,001*	0,069 ± 0,002*	0,068 ± 0,002*	0,061 ± 0,007*
0,5	0,060 ± 0,002*	0,068 ± 0,004*	0,064 ± 0,004*	0,100 ± 0,005*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.3. Omjer klorofil *a*/klorofil *b*

Vrijednosti omjera Chl*a*/Chl*b* prikazane su u tablici 6. Omjer Chl*a*/Chl*b* u kontrolnim kulturama bio je tijekom pokusa ujednačen, s prosječnom vrijednošću od 2,771. Kod tretmana S-metolaklorom zabilježene su povećane vrijednosti koje su bile statistički značajne u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) kod tretmana višim koncentracijama od 100 µg/L (24 h: 3,712; 48 h: 4,560; 72 h: 4,194) te 200 µg/L herbicida (4h: 4,468; 24 h: 3,947; 48 h: 4,215; 72 h: 5,660). Terbutilazin je značajno utjecao na promjenu omjera Chl*a*/Chl*b* pri tretmanima višim koncentracijama, kod 500 µg/L 48 h nakon tretmana (4,506) te 1000 µg/L 4 i 72 h nakon tretmana (4 h: 4,055; 72 h: 4,563). Suprotno tretmanu herbicidima, u kulturama tretiranim s H₂O₂ uočene su više vrijednosti omjera Chl*a*/Chl*b* kod tretmana nižim koncentracijama toksikanta (0,05 i 0,1 mM). Povećanje je bilo značajno u odnosu na kontrolu tijekom cijelog pokusa za obje koncentracije ($P < 0,05$), izuzev 0,05 mM H₂O₂ 24 h nakon tretmana.

Tablica 6. Omjer klorofil a/klorofil b (Chla/Chlb) 4, 24 i 48 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM).

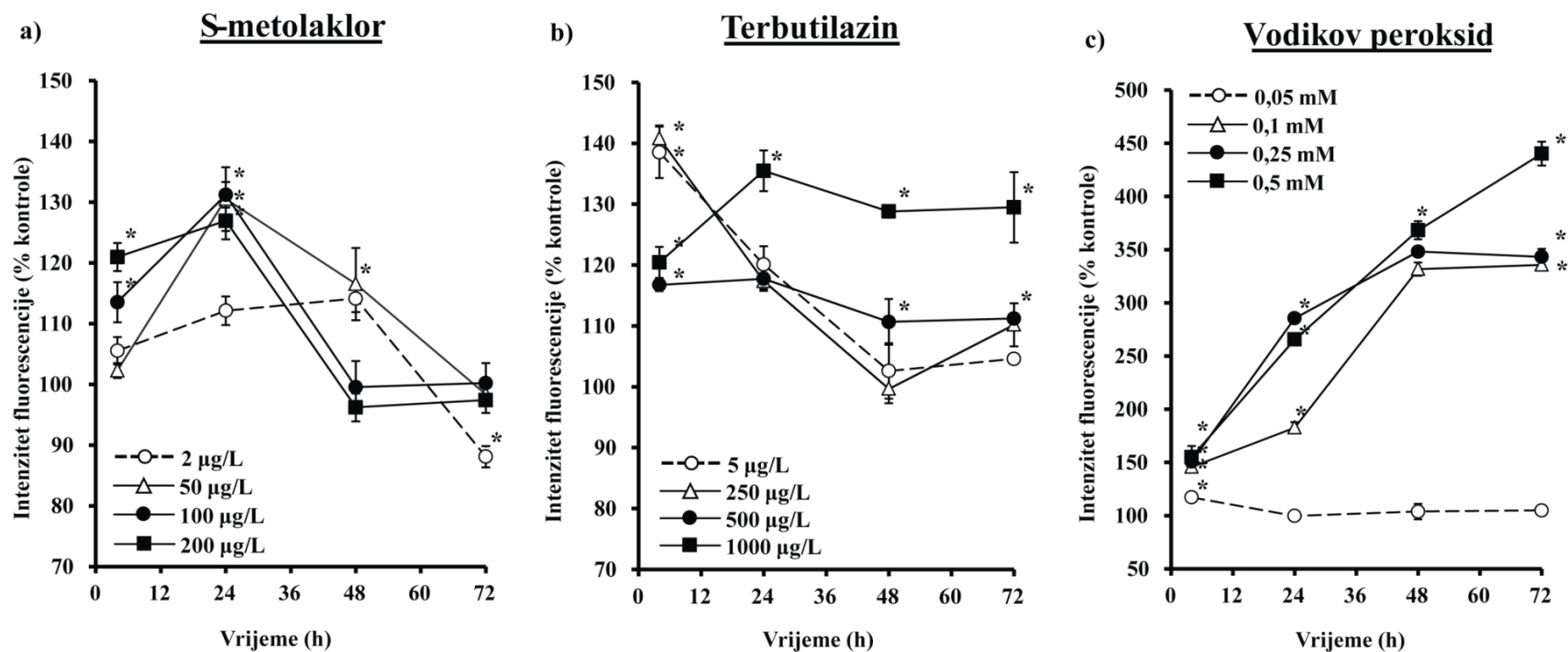
Chla/Chlb				
Tretman / Trajanje	4 h	24 h	48 h	72 h
Kontrola	2,749	2,704	2,795	2,835
S-metolaklor (µg/L)				
2	3,423	3,248	4,108	3,554
50	3,541	3,511	3,716	3,420
100	3,714	3,712*	4,560*	4,194*
200	4,468*	3,947*	4,215*	5,660*
Terbutilazin (µg/L)				
5	3,270	3,479	3,074	3,046
250	3,039	3,352	3,828	2,878
500	3,277	2,110	3,320	4,506*
1000	4,055*	3,144	3,790	4,563*
Vodikov peroksid (mM)				
0,05	4,054*	3,035	5,579*	4,171*
0,1	3,992*	4,486*	4,375*	3,693*
0,25	2,291	2,773	3,240	3,670
0,5	2,272	3,006	3,233	3,123

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.4. Sadržaj reaktivnih kisikovih tvari

S-metolaklor je uzrokovao statistički značajno povećanje sadržaja reaktivnih kisikovih tvari u odnosu na kontrolu već nakon 4 h tretmana (*Slika 7a*). Koncentracije od 100 i 200 µg/L uzrokovale su 13,5% te 21,0% veći sadržaj ROS-a od sadržaja u kontrolnim kulturama. Veće razlike u odnosu na kontrolu, s povećanjem od 31,2 i 26,9% uzrokovali su isti tretmani nakon 24 h, te tretman s 50 µg/L herbicida koji je uzrokovao povećanje od 30,5% ($P < 0,05$). Dvije najviše koncentracije uzrokovale su naglo smanjenje sadržaja ROS-a 48 h nakon tretmana. Do kraja eksperimenta, sadržaj ROS-a nije se značajno mijenjao. Smanjenje sadržaja ROS-a uočeno je i kod koncentracije od 50 µg/L herbicida, ali je vrijednost još uvijek bila za 16,5% viša od kontrole ($P < 0,05$). Nastavio se trend smanjenja vrijednosti s trajanjem tretmana. Najniža koncentracija S-metolaklora uzrokovala je statistički značajno smanjenje ROS-a u

odnosu na kontrolu (11,9%) 72 h nakon tretmana ($P<0,05$). Terbutilazin je također uzrokovao značajno povećanje sadržaja ROS-a u stanicama već nakon 4 h tretmana (*Slika 7b*), koje je bilo značajno kod svih koncentracija herbicida ($P<0,05$). Kod tretmana najvišom koncentracijom herbicida (1000 $\mu\text{g/L}$) zabilježene su slične vrijednosti tijekom cijelog pokusa, koje su bile 20 do 35% više nego u kontrolnim stanicama ($P<0,05$). Značajno povećanje sadržaja ROS-a u stanicama (10,2 i 11,2%) uzrokovala je i niža koncentracija terbutilazina (500 $\mu\text{g/L}$) nakon 48 i 72 h tretmana ($P<0,05$). H_2O_2 je izazvao kontinuirani porast ROS-a u stanicama tijekom pokusa (*Slika 7c*). Nakon 4 h tretmana, sve koncentracije su izazvale značajno stvaranje ROS-a ($P<0,05$), dok su do kraja tretmana samo kod najmanje koncentracije (0,05 mM) zabilježene vrijednosti slične kontroli. Kod tretmana s ostalim koncentracijama, sadržaj ROS-a se povećavao s trajanjem pokusa te je utvrđen višestruko veći sadržaj ROS-a nego u kontrolnim stanicama ($P<0,05$). U usporedbi s herbicidima, tretmani s H_2O_2 su izazvali značajno intenzivnije stvaranje ROS-a u stanicama *C. kessleri*.



Slika 7. Sadržaj reaktivnih kisikovih tvari (ROS) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana a) S-metolaktorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.5. Analiza antioksidacijskog statusa

5.1.5.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze

Tretman S-metolaklorom je uzrokovao značajno povećanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APX) 4 h nakon tretmana (*Slika 8a*). U odnosu na kontrolu, aktivnost APX se povećala za 16,6% pri tretmanu s 2 µg/L herbicida te za 21,3% i 14,0% kod tretmana s 50 i 100 µg/L herbicida ($P < 0,05$). Do kraja pokusa nisu zabilježene značajne promjene u aktivnosti ovog enzima, izuzev slabijeg povećanja od 3,9% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) pri tretmanu najvišom koncentracijom herbicida nakon 72 h. Pri tretmanu terbutilazinom aktivnost APX je porasla također nakon 4 h tretmana te su zabilježene vrijednosti za 9,0%, 14,1% i 12,2% veće od kontrolnih pri koncentracijama od 5, 250 i 1000 µg/L herbicida ($P < 0,05$; *Slika 8b*). Također je zabilježen i značajan porast aktivnosti APX od 15,4% nakon 24 h tretmana s 500 µg/L terbutilazina. Nakon 48 i 72 h tretmana zabilježeno je smanjenje aktivnosti APX kod svih koncentracija herbicida. Najniža koncentracija H₂O₂ uzrokovala je značajno povećanje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu 4, 24 i 48 h nakon tretmana (24 h: 8,1%; 48 h: 13,8%; 72 h: 11,6%) (*Slika 8c*). Viša koncentracija (0,1 mM) uzrokovala je značajno povećanje od 15,0% nakon 24 h te 5,5% nakon 48 h tretmana (oboje $P < 0,05$). Nakon smanjenja poslije 48 h tretmana, najviše koncentracije (0,25 i 0,5 mM H₂O₂) su uzrokovale povećanje aktivnosti APX od 9,7 i 15,5% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) 72 h nakon tretmana.

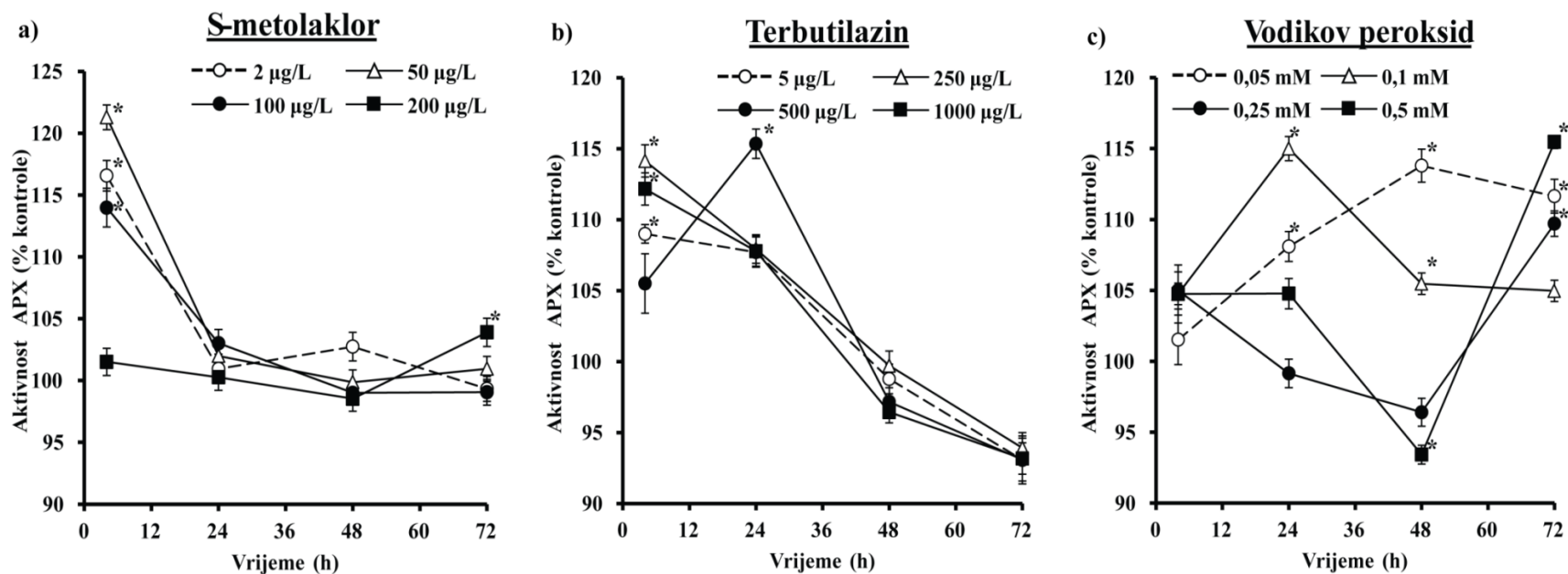
5.1.5.2. Aktivnost glutation-reduktaze

Povećana aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) pri tretmanima S-metolaklorom zabilježena je tek nakon 48 i 72 h tretmana (*Slika 9a*). Nakon 48 h tretmana, statistički značajno povećanje aktivnosti GR od 7,5% i 5,4% u odnosu na kontrolu utvrđeno je kod tretmana s 2 i 50 µg/L herbicida te povećanje od 9,6% pri tretmanu s koncentracijom od 100 µg/L ($P < 0,05$). Nakon 72 h tretmana, aktivnost GR je ostala značajno povišena kod tri više koncentracije herbicida ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Terbutilazin je uzrokovao značajnije povećanje aktivnosti GR pri nižim koncentracijama (*Slika 9b*). Koncentracija od 5 µg/L djelovala je na povećanje aktivnosti GR od 4,2% nakon 24 h te 8,6% i 8,4% nakon 48 i 72 h tretmana ($P < 0,05$). Koncentracija od 250

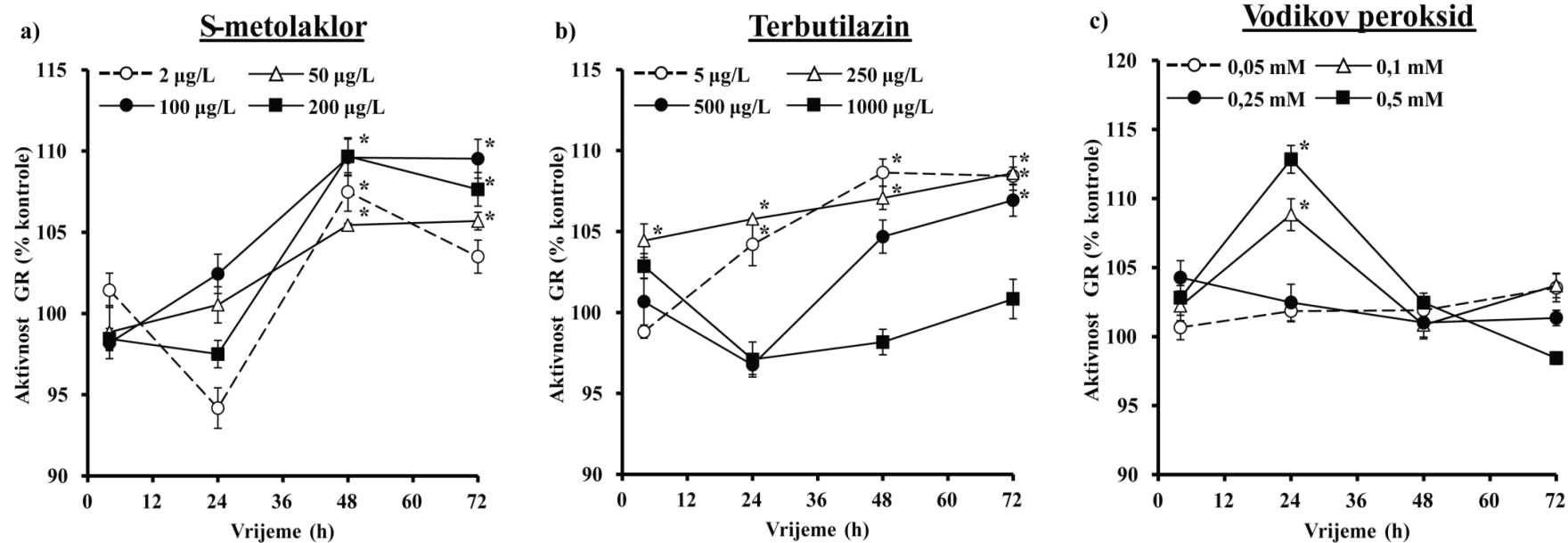
$\mu\text{g/L}$ uzrokovala je značajno kontinuirano povećanje aktivnosti tijekom cijelog pokusa, s 4,4 do 8,6% višim vrijednostima od onih u kontroli ($P < 0,05$). Nakon 72 h je također zabilježeno i značajno povećanje aktivnosti GR (6,9%) uzrokovano koncentracijom herbicida od 500 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Značajne promjene pri tretmanu s H_2O_2 uzrokovale su samo dvije koncentracije toksikanta nakon 24 h tretmana (*Slika 9c*). Koncentracija od 0,1 mM uzrokovala je povećanje aktivnosti GR od 8,83% u odnosu na kontrolu, a najviša koncentracija (0,5 mM) povećanje od 12,8% ($P < 0,05$).

5.1.5.3. Aktivnost katalaze

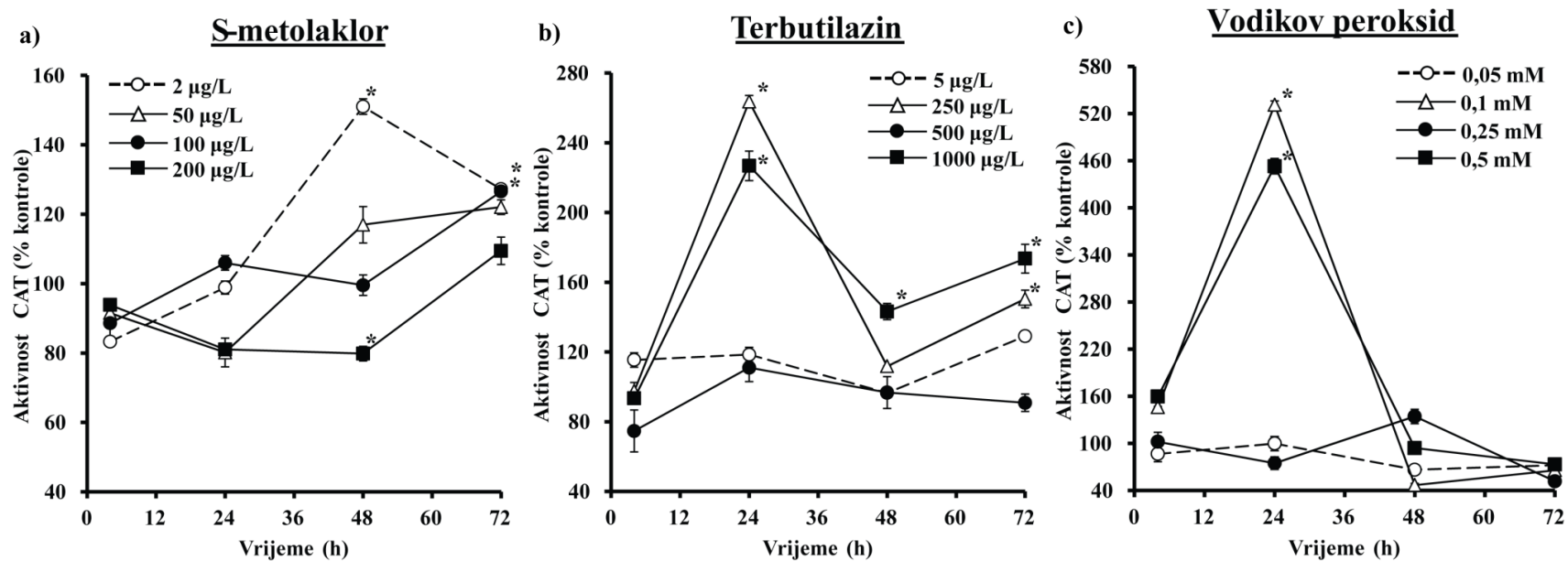
Tretman S-metolaklorom uzrokovao je značajno povećanje aktivnosti enzima katalaze (CAT) 48 i 72 h nakon tretmana (*Slika 10a*). Značajno povećanje od 51,0% (48 h) i 27,21% (72 h) u odnosu na kontrolne vrijednosti uzrokovao je tretman s 2 $\mu\text{g/L}$ herbicida te također i koncentracija od 100 $\mu\text{g/L}$ herbicida s povećanjem aktivnosti enzima od 26,5% nakon 72 h ($P < 0,05$). Od svih koncentracija, samo je najviša 200 $\mu\text{g/L}$ uzrokovala inhibiciju aktivnosti CAT 48 h nakon tretmana ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Kod tretmana terbutilazinom, najviša koncentracija herbicida (1000 $\mu\text{g/L}$) je uzrokovala povećanu aktivnost CAT, s vrijednostima dvostruko većim u odnosu na kontrolu nakon 24 h tretmana te vrijednostima višim za 43,2% i 73,5% do kraja pokusa (*Slika 10b*). Koncentracija od 250 $\mu\text{g/L}$ uzrokovala je također dvostruko povećanje aktivnosti CAT nakon 24 h tretmana te povećanje od 50,4% nakon 72 h tretmana ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Kod obje koncentracije (250 i 1000 $\mu\text{g/L}$) izražen je nagli pad aktivnosti 48 h nakon tretmana te povećanje nakon 72 h. Pri tretmanu s H_2O_2 također je izražen nagli porast aktivnosti 24 h nakon tretmana, posebno pri koncentracijama od 0,1 i 0,5 mM s aktivnostima CAT višestruko većim nego u kontroli ($P < 0,05$; *Slika 10c*). Kod koncentracije od 0,25 mM uočen je porast aktivnosti tek nakon 48 h tretmana, ali u odnosu na kontrolu nije bio statistički značajan ($P > 0,05$).



Slika 8. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana a) S-metolaktorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).



Slika 9. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana a) S-metolaktorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).



Slika 10. Aktivnost katalaze (CAT) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana a) S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.5.4. Koncentracije ukupnih karotenoida

Smanjenje sadržaja ukupnih karotenoida (Car) u stanicama *C. kessleri* u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) utvrđeno je tijekom cijelog pokusa pri tretmanu s dvije najviše koncentracije S-metolaklora (Tablica 6). Kod tretmana sa 100 $\mu\text{g/L}$ herbicida, vrijednosti su se kretale od 0,049 do 0,141 mg/L (4 do 72 h tretmana). Pri tretmanu sa 200 $\mu\text{g/L}$ herbicida, u stanicama su utvrđene vrijednosti ukupnih Car od 0,050 do 0,128 mg/L.

Terbutilazin je uzrokovao promjene u sadržaju ukupnih Car tek nakon 24 h tretmana koje je trajalo sve do kraja pokusa. Značajno smanjenje u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) uzrokovale su, kao i kod tretmana S-metolaklorom, dvije najviše koncentracije herbicida (500 i 1000 $\mu\text{g/L}$). Vrijednosti su bile ujednačene tijekom cijelog pokusa (Tablica 6).

Tretmani s H_2O_2 nisu značajno utjecali na sadržaj ukupnih karotenoida tijekom 4 i 24 h tretmana (Tablica 6). Značajna redukcija koncentracije Car u odnosu na kontrolne kulture zabilježena je nakon 48 h tretmana s 0,25 mM H_2O_2 te nakon 72 h kod tretmana istom koncentracijom kao i s 0,5 mM H_2O_2 . Kod tretmana s 0,25 mM H_2O_2 nakon 48 i 72 h su utvrđene dvostruko odnosno trostruko niže vrijednosti koncentracije Car (0,058 mg/L i 0,051 mg/L) nego u kontrolnim kulturama (0,117 mg/L i 0,168 mg/L) ($P < 0,05$).

Tablica 7. Koncentracije ukupnih karotenoida (Car) kultura *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM).

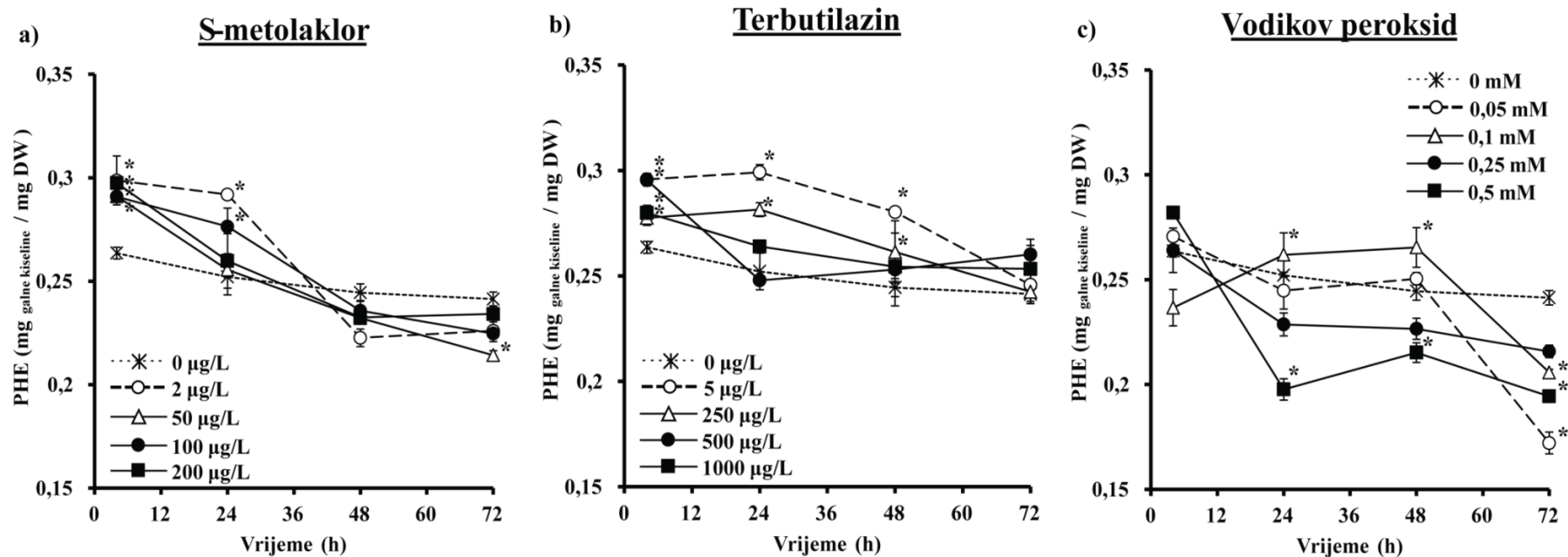
Tretman / Trajanje	Car (mg/L)			
	4 h	24 h	48 h	72 h
Kontrola	0,063 ± 0,000	0,104 ± 0,009	0,117 ± 0,009	0,168 ± 0,010
S-metolaklor (µg/L)				
2	0,060 ± 0,002	0,102 ± 0,007	0,125 ± 0,008	0,173 ± 0,004
50	0,073 ± 0,005	0,085 ± 0,008	0,116 ± 0,011	0,146 ± 0,005*
100	0,049 ± 0,001*	0,083 ± 0,011*	0,099 ± 0,010*	0,141 ± 0,010*
200	0,050 ± 0,002*	0,070 ± 0,008*	0,100 ± 0,001*	0,128 ± 0,007*
Terbutilazin (µg/L)				
5	0,062 ± 0,001	0,105 ± 0,003	0,122 ± 0,007	0,150 ± 0,004
250	0,074 ± 0,006	0,091 ± 0,004	0,117 ± 0,017	0,143 ± 0,013
500	0,051 ± 0,005	0,076 ± 0,008*	0,061 ± 0,003*	0,068 ± 0,006*
1000	0,060 ± 0,013	0,060 ± 0,011*	0,083 ± 0,011*	0,082 ± 0,002*
Vodikov peroksid (mM)				
0,05	0,057 ± 0,002	0,089 ± 0,002	0,111 ± 0,000	0,073 ± 0,006*
0,1	0,057 ± 0,010	0,082 ± 0,008	0,095 ± 0,001	0,178 ± 0,005
0,25	0,058 ± 0,000	0,089 ± 0,001	0,058 ± 0,004*	0,051 ± 0,003*
0,5	0,062 ± 0,006	0,090 ± 0,001	0,063 ± 0,004*	0,063 ± 0,003*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.5.5. Sadržaj ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola (PHE) u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana S-metolaklorom značajno se povećao u odnosu na kontrolu već nakon 4 h tretmana, a vrijednosti su se smanjivale trajanjem pokusa (Slika 11a). Nakon 4 h tretmana, sve su koncentracije uzrokovale značajno povećanje sadržaja PHE ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (0,263 mg_{galne kiseline}/mg DW), s prosječnom vrijednošću od 0,295 mg_{galne kiseline}/mg DW. Značajno povećanje je također zabilježeno i 24 h nakon tretmana koncentracijama 2 i 100 µg/L S-metolaklora (0,292 mg_{galne kiseline}/mg DW i 0,276 mg_{galne kiseline}/mg DW) u odnosu na kontrolne stanice (0,252 mg_{galne kiseline}/mg DW), $P < 0,05$. Sadržaj PHE se smanjivao trajanjem pokusa i nije bilo značajnih razlika, izuzev nakon 72 h tretmana s 50 µg/L S-metolaklora kada je zabilježeno značajno smanjenje PHE (0,214 mg_{galne kiseline}/mg DW) u odnosu na kontrolu (0,241 mg_{galne}

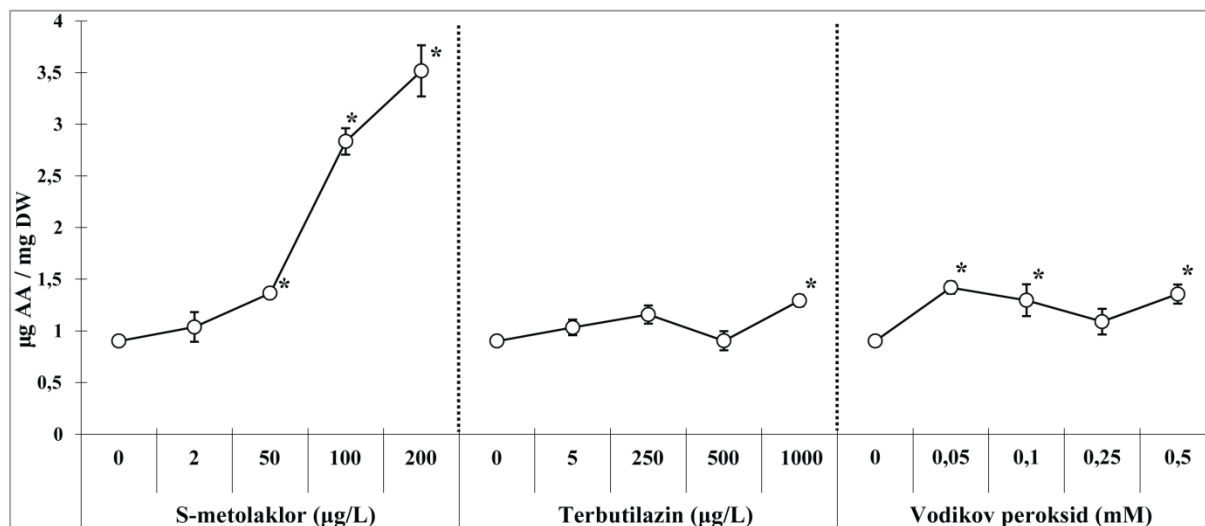
kiseline/mg DW). Kod tretmana terbutilazinom također je vidljiv trend smanjenja sadržaja PHE s trajanjem pokusa (*Slika 11b*). Sve primijenjene koncentracije terbutilazina uzrokovale su značajno povećanje u sadržaju PHE 4 h nakon tretmana u odnosu na kontrolu, s prosječnom vrijednošću od 0,287 mg_{galne kiseline}/mg DW. Nakon 24 i 48 h tretmana jedino su stanice tretirane dvjema nižim koncentracijama terbutilazina (5 i 250 µg/L) imale vrijednosti PHE značajno više od kontrole (24 h: 0,299 mg_{galne kiseline}/mg DW i 0,281 mg_{galne kiseline}/mg DW; 48 h: 0,280 mg_{galne kiseline}/mg DW i 0,261 mg_{galne kiseline}/mg DW). 72 h nakon tretmana nije bilo značajnih razlika u sadržaju PHE između stanica tretiranih terbutilazinom i kontrolnih stanica. Tretman s H₂O₂ nakon 4 h nije značajno utjecao na promjene u sadržaju PHE u stanicama (*Slika 11c*). Samo je 0,1 mM H₂O₂ uzrokovao sniženje PHE (0,264 mg_{galne kiseline}/mg DW) u usporedbi s kontrolom (0,237 mg_{galne kiseline}/mg DW). Do kraja pokusa zabilježeno je značajno smanjenje u odnosu na kontrolu pri najvišoj koncentraciji H₂O₂ (0,5 mM). Koncentracija 0,1 mM H₂O₂ uzrokovala je statistički značajno povećanje sadržaja PHE 24 h (0,262 mg_{galne kiseline}/mg DW) i 48 h nakon tretmana (0,265 mg_{galne kiseline}/mg DW) te također smanjenje u odnosu na kontrolu 72 h nakon tretmana (0,206 mg_{galne kiseline}/mg DW) ($P < 0,05$). Tretman s 0,05 mM H₂O₂ nije pokazao značajne promjene u odnosu na kontrolu 24 i 48 h nakon tretmana, uzrokujući značajno smanjenje sadržaja PHE tek 72 h nakon tretmana (0,172 mg_{galne kiseline}/mg DW). Najveći sadržaj PHE utvrđen je u stanicama 24 h nakon tretmana najnižom koncentracijama herbicida terbutilazina (0,299 mg_{galne kiseline}/mg DW) i metolakloru (0,298 mg_{galne kiseline}/mg DW) 4 h nakon tretmana.



Slika 11. Sadržaj ukupnih fenola (PHE) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) i H_2O_2 (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.5.6. Koncentracija askorbinske kiseline

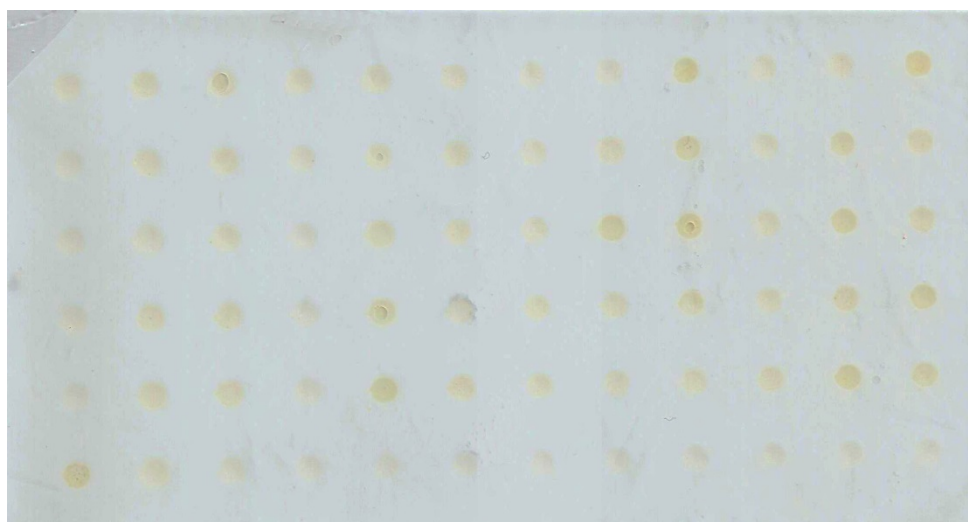
Tretmani herbicidima i H_2O_2 uzrokovali su promjene u sadržaju askorbinske kiseline (AA) nakon 72 h u stanicama *C. kessleri* (Slika 12). Sve primijenjene koncentracije S-metolaklora izuzev najniže (2 $\mu\text{g/L}$), značajno su utjecale na povećanje sadržaja AA u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Sadržaj AA se povećavao s porastom koncentracije herbicida, a vrijednosti su se kretale od 1,037 $\mu\text{g/mg DW}$ do 3,516 $\mu\text{g/mg DW}$. Kod tretmana terbutilazinom, samo je najviša koncentracija (1000 $\mu\text{g/L}$) uzrokovala statistički značajno povećanje sadržaja AA u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Tretman s H_2O_2 je uzrokovao značajno povećanje sadržaja AA u odnosu na kontrolu pri svim koncentracijama, izuzev 0,25 mM. Najveći sadržaj AA u stanicama uzrokovala je najniža koncentracija H_2O_2 (1,420 $\mu\text{g/mg DW}$), a osim sniženja uzrokovanog tretmanom s 0,25 mM H_2O_2 (1,090 $\mu\text{g/mg DW}$), kod dvije preostale koncentracije (0,1 i 0,5 mM H_2O_2) zabilježene su vrijednosti više nego u kontrolnim stanicama ($P < 0,05$). Najveći sadržaj AA imale su stanice tretirane najvišom koncentracijom S-metolaklora (3,516 $\mu\text{g/mg DW}$) kod kojih je utvrđeno gotovo četverostruko povećanje u odnosu na kontrolu (0,902 $\mu\text{g/mg DW}$).



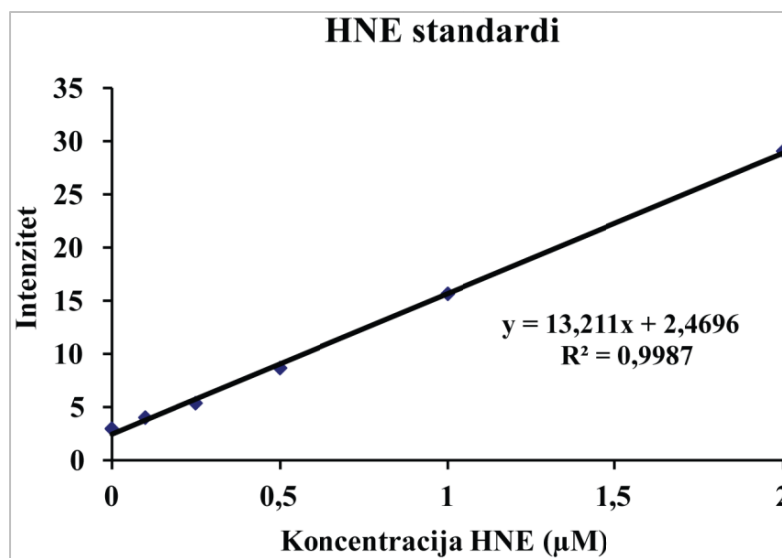
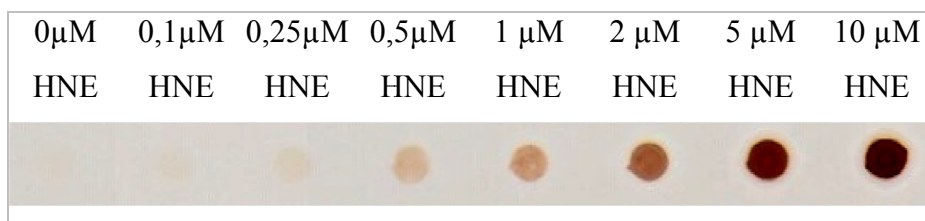
Slika 12. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u stanicama *C. kessleri* 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) i H_2O_2 (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.1.6. Koncentracija 4-hidroksi-2-nonenala

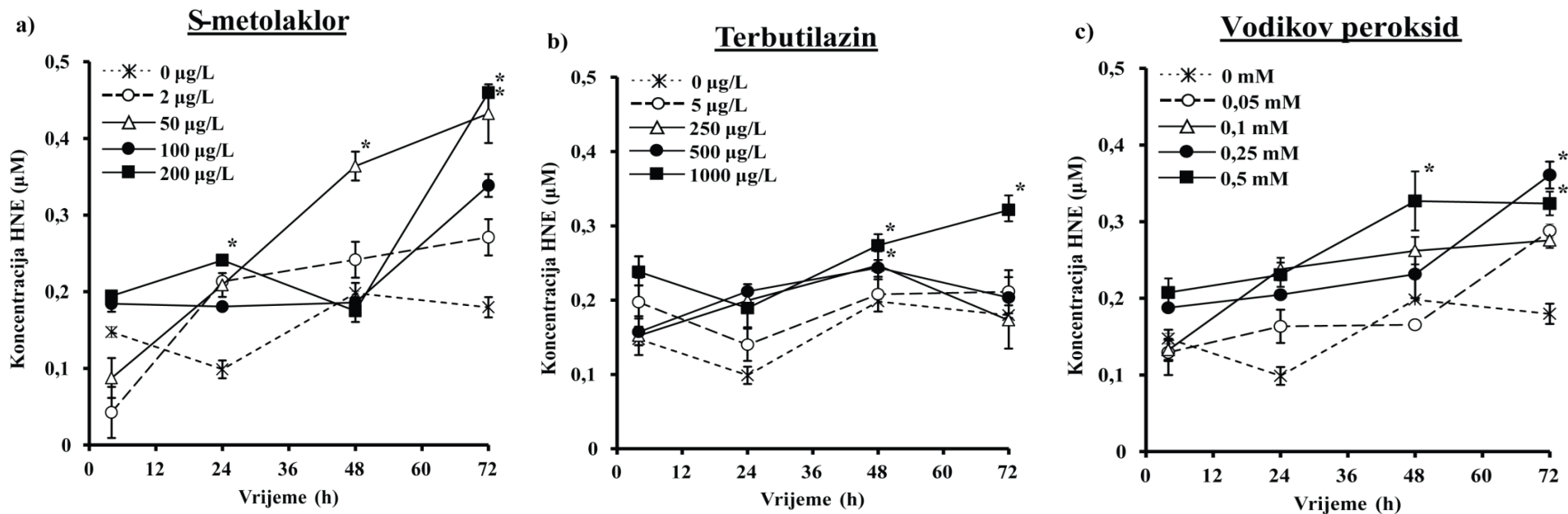
Koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) u stanicama *C. kessleri* kretale su se u rasponu od 0,043 do 0,460 μM (Slika 13 i 14). Učinak herbicida i H_2O_2 na stvaranje HNE-a prikazano je na slici 15. Kod tretmana S-metolaklorom, koncentracija HNE-a u stanicama značajno se povećala tek nakon 48 h tretmana koncentracijom od 50 $\mu\text{g/L}$ herbicida dosežući značajno višu vrijednost od 0,363 μM u odnosu na kontrolu (0,198 μM), $P < 0,05$. Povećane koncentracije HNE-a od 0,432 μM i 0,460 μM zabilježene su također i 72 h nakon tretmana koncentracijama 50 $\mu\text{g/L}$ i 200 $\mu\text{g/L}$ herbicida. Kao i i tretman S-metolaklorom, terbutilazin je također uzrokovao značajno povećanje koncentracije HNE-a u odnosu na kontrolu 48 h nakon tretmana. Promjene vrijednosti koncentracija HNE-a uzrokovane dvjema višim koncentracijama herbicida (0,243 i 0,273 μM) značajno su se razlikovale od kontrolne vrijednosti ($P < 0,05$). Koncentracija HNE-a se također povećala i 72 h nakon tretmana najvišom koncentracijom herbicida (0,321 μM), $P < 0,05$. Značajno povećanje koncentracije HNE-a u odnosu na kontrolu zabilježeno je također pri tretmanu najvišom koncentracijom H_2O_2 (0,5 mM) s ujednačenim vrijednostima nakon 48 h (3,326 μM) i 72 h inkubacije (0,323 μM), $P < 0,05$. Povećani sadržaj HNE-a u stanicama uzrokovala je i niža koncentracija toksikanta (0,25 mM) s vrijednošću od 0,360 μM ($P < 0,05$).



Slika 13. Primjer nitrocelulozne membrane nakon vizualizacije imunokompleksa dodatkom otopine 3,3'-diaminobenzidin-tetrahidroklorida (metoda dot-blot; proteinski ekstrakti *C. kessleri*).



Slika 14. Intenzitet standarda (0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5 i 10 μ M HNE u 1%-tnom BSA) i baždarna krivulja za određivanje koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala.

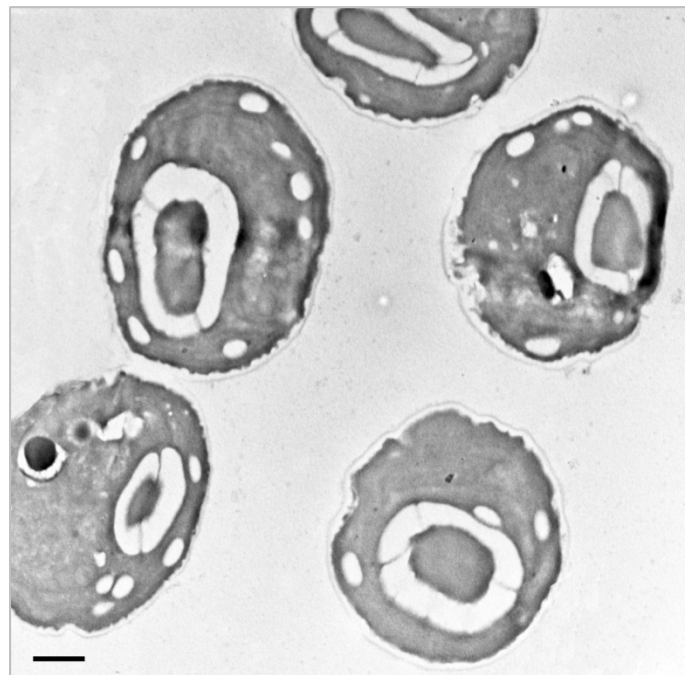


Slika 15. Koncentracija 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) u stanicama *C. kessleri* 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mM). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

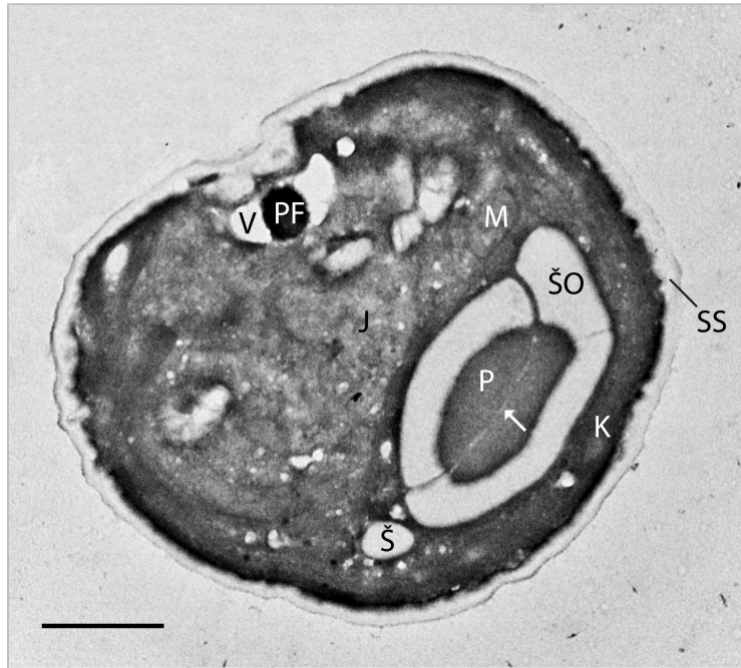
5.1.7. Ultrastruktura stanica *C. kessleri*

Uspoređena je ultrastruktura stanica *C. kessleri* kontrolnih kultura i stanica tretiranih najvišim koncentracijama herbicida (200 µg/L S-metolaklora i 1000 µg/L terbutilazina) tijekom 72 h.

U kontrolnim kulturama su dominirale pojedinačne stanice (*Slika 16*). Karakteristična stanica kontrolne kulture *C. kessleri* (*Slika 17*) obavijena je rigidnom staničnom stijjenkom koja je vezana uz staničnu membranu. Veći dio stanice obuhvaća parijetalno smješteni kloroplast s gusto zbijenim, paralelno grupiranim tilakoidima. U središtu kloroplasta se nalazi krupni pirenoid obavijen širokim škrobnim ovojem i podijeljen s dva grupirana tilakoida (*Slika 17*, bijela strelica). Kod nekih stanica je škrobni ovoj oko pirenoida dodatno podijeljen ogrankom tilakoida te je sastavljen od tri, a rjeđe i više dijelova. U kloroplastu se nalazi jedno ili više škrobnih zrnaca. Jezgra je smještena blago ekscentrično. U citoplazmi je također vidljiva jedna ili rjeđe, više vakuola s polifosfatnim tjelešcem.



Slika 16. Ultrastruktura stanica *C. kessleri* kontrolne kulture; povećanje 7100:1; linija predstavlja 1 µm.

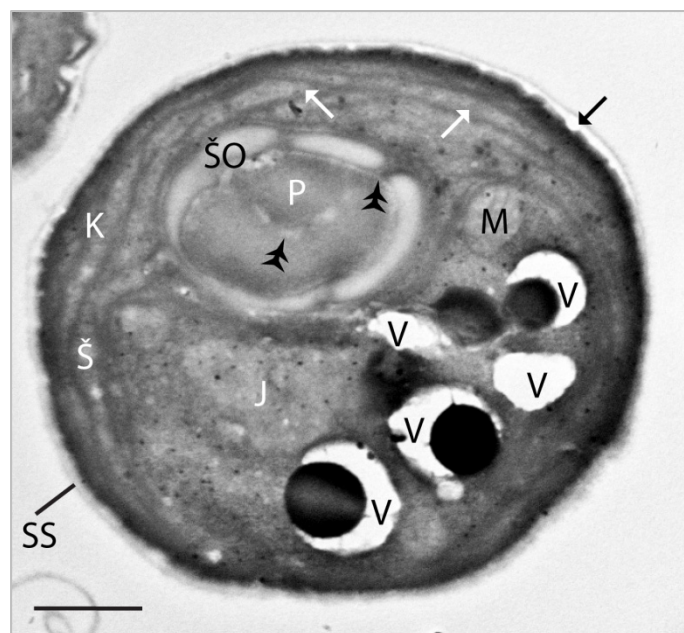


Slika 17. Ultrastruktura karakteristične kontrolne stanice: jezgra (J), kloroplast (K), pireloid (P) podijeljen s dva tilakoida (strelica) i obavijen škrobnim ovojem (ŠO), mitohondrij (M), stanična stijenka (SS), škrobno zrnce (Š), vakuola (V) s polifosfatnim tjelešcem (PF); povećanje 18000:1; linija predstavlja 1 μm .

U stanicama tretiranim S-metolaklorom uočavaju se različite morfološke promjene (*Slika 18*). Na većini stanica vidljiva su oštećenja stanične stijenke koja se na pojedinim dijelovima odvaja od stanične membrane (*Slika 18 i 19*, crne strelice). Došlo je do gubitka integriteta kloroplasta i redukcije strukture tilakoidnog sustava. Vidljive su degradacijske promjene poput odvajanja susjednih i širenja pojedinačnih tilakoida koji poprimaju valovitu strukturu te se gubi njihov pravilan, paralelan raspored (*Slika 18 i 19*, bijele strelice). Došlo je do razgradnje škrobnih zrnaca uz nastanak vezikula različitih veličina. Veličina pirenoida se smanjila, kao i debljina škrobnog ovoja. Za razliku od kontrolnih stanica, više nisu vidljiva dva karakteristična grupirana tilakoida koja dijele pireloid i škrobni ovoj, već su na tom mjestu vidljivi samo preostali prošireni kanalići (*Slike 18 i 19*, dvostruke strelice). Došlo je također do povećanja veličine i broja vakuola u stanicama. Za razliku od kontrolnih kultura u kojima je u svega 10% stanica prisutno više od tri vakuole, u stanicama tretiranim S-metolaklorom je vakuolizacija uočena u 35% analiziranih stanica. U tretiranim kulturama prisutne su stanice u različitim fazama staničnog ciklusa te je vidljiv velik broj sporangija (*Slika 18*), što nije zamijećeno u kontrolnim kulturama.



Slika 18. Morfološke promjene stanica *C. kessleri* tretiranih S-metolaklorom: crna strelica - odvajanje stanične stijenke, bijela strelica - oštećenja kloroplasta, dvostruka strelica - promjene pirenoida, zvjezdica - sporangij u fazi sazrijevanja spora, vakuola – V; povećanje 5600:1; linija predstavlja 1 μm .



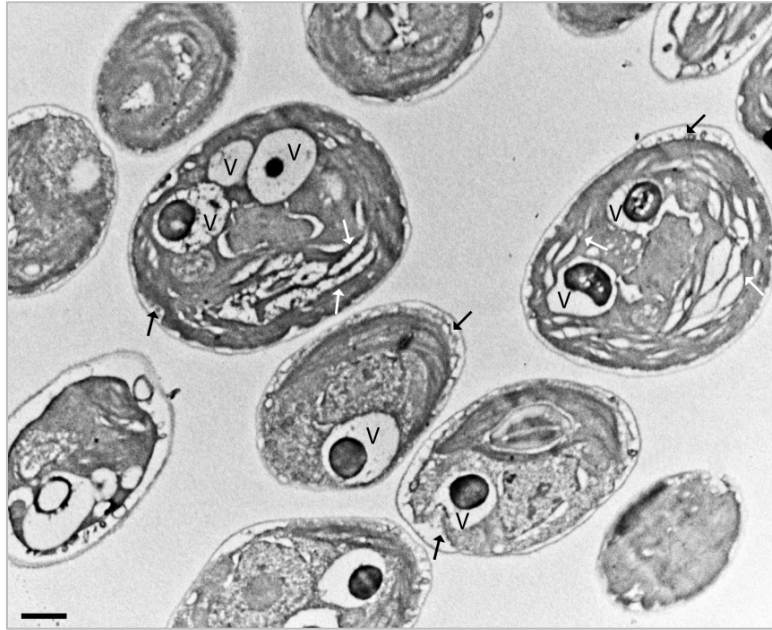
Slika 19. Promjene u ultrastrukturi stanice *C. kessleri* tretirane S-metolaklorom: crna strelica - odvajanje stanične stijenke, bijela strelica - oštećenja kloroplasta, jezgra (J), kloroplast (K), pirenoid (P) s kanalićem na mjestu nekadašnjih tilakoida (dvostruka strelica) i obavijen škrobnim ovojem (ŠO), mitohondrij (M), stanična stijenka (SS), škrobno zrnca (Š), vakuola (V), povećanje 11000:1; linija predstavlja 1 μm .

Osim sporangija koji nakon dvije uzastopne diobe imaju uobičajen, paran broj spora (četiri spore), tretman S-metolaklorom je uzrokovao i nastanak sporangija koji u fazi prije otpuštanja sadrže samo tri spore (*Slika 20*).



Slika 20. *C. kesleri* - sporangij s tri autospore kod tretmana S-metolaklorom, povećanje 14000:1; linija predstavlja 1 μm .

Kod stanica tretiranih terbutilazinom također se kao i kod tretmana S-metolaklorom uočavaju degradacijske promjene organela i ostalih staničnih struktura (*Slika 21*). Vidljivo je odvajanje stanične stijenke od stanične membrane (*Slika 21* i *22*, crne strelice). Izražene su deformacije kloroplasta koji su izgubili karakterističnu lamelarnu strukturu, što je posljedica dilatacije i odvajanja tilakoida uz nastanak velikih vrećastih proširenja. Snažna redukcija strukture tilakoidnog sustava, kao i u stanicama tretiranim S-metolaklorom, vidljiva je kroz valovite tilakoide i nestanak njihovog pravilnog paralelnog rasporeda (*Slike 21* i *22*). Uočljiva su veća pojedinačna škrobna zrnca u procesu razgradnje. Pirenoid je smanjen, s reduciranim škrobnim ovojem. U tretiranim stanicama također je uočen povećan broj vakuola (34% stanica s više od tri vakuole, u odnosu na 10% stanica u kontroli) od kojih se pojedine stapaju i zauzimaju velik dio volumena stanice (*Slika 22*). U odnosu na kontrolne kulture, prisutan je veći broj stanica u diobi (*Slike 23* i *24*), s pojavom sporangija većih od 14 μm (*Slika 24*).



Slika 21. Morfološke promjene stanica *C. kessleri* tretiranih terbutilazinom: crna strelica - odvajanje stanične stijenke, bijela strelica - oštećenja kloroplasta, vakuola – V; povećanje 5600:1; linija predstavlja 1 μm .



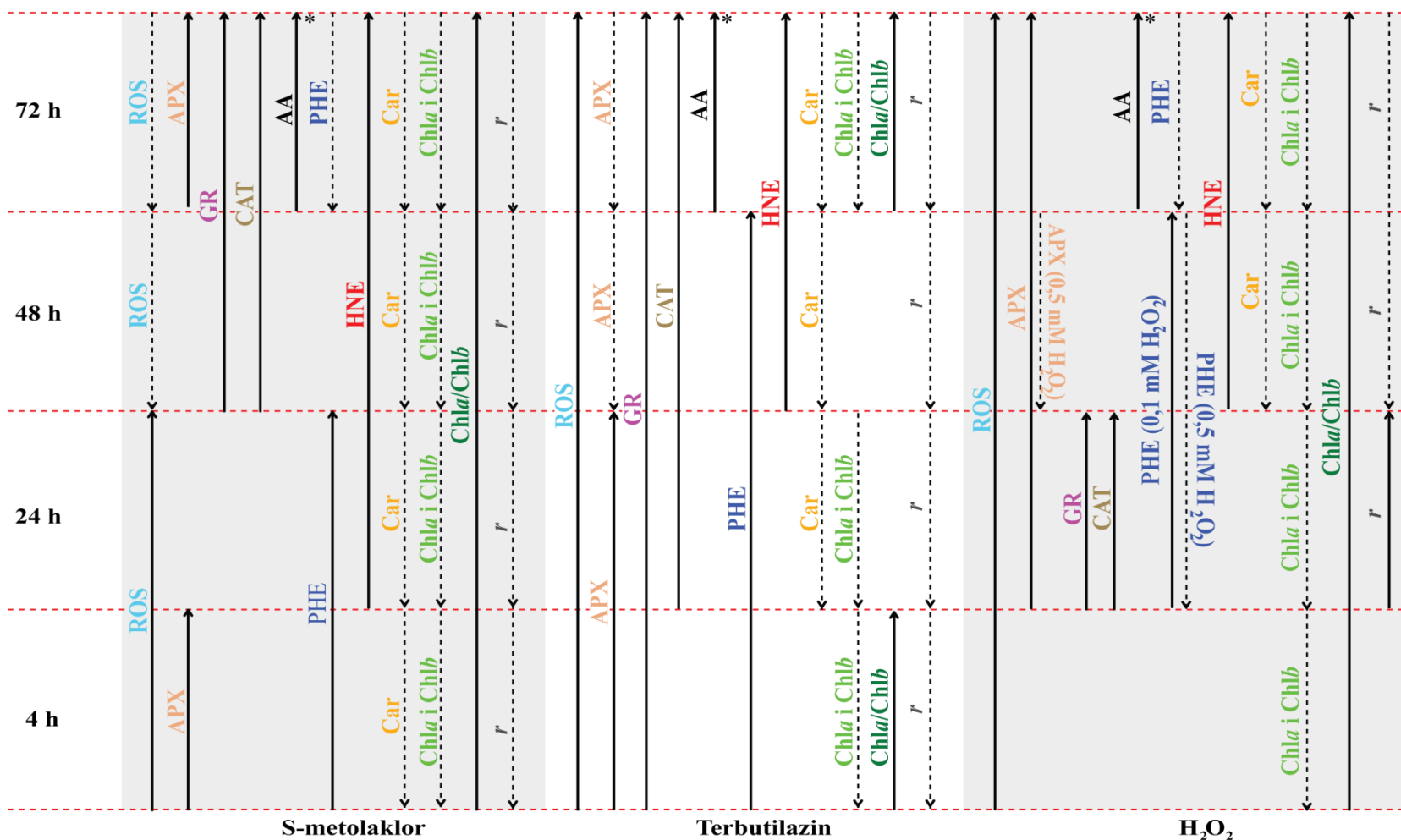
Slika 22. Promjene u ultrastrukturi stanice *C. kessleri* tretirane terbutilazinom: crna strelica - odvajanje stanične stijenke, bijela strelica - oštećenja kloroplasta, jezgra (J), kloroplast (K), pirenoid (P) s kanalićem na mjestu nekadašnjih tilakoida (dvostruka strelica) i obavijen škrobnim ovojem (ŠO), mitohondrij (M), stanična stijenka (SS), škrobno zrnice (Š), vakuola (V) s polifosfatnim tjelešcem (PF), povećanje 14000:1; linija predstavlja 1 μm .



Slika 23. *C. kessleri* - sporangij u fazi sazrijevanja spora, povećanje 11000:1; linija predstavlja 1 μm .



Slika 24. *C. kessleri* - sporangiji (zvjezdica označava sporangij veličine preko 14 μm), povećanje 4400:1; linija predstavlja 1 μm .



Slika 25. Sažeti prikaz promjena istraživanih parametara u logaritamskoj fazi rasta kulture *C. kessleri*; ↑ povećanje, ↓ smanjenje, *mjereno 72 h nakon tretmana, ROS - sadržaj reaktivnih kisikovih tvari, APX - aktivnost askorbat-peroksidaze, GR - aktivnost glutation-reduktaze, CAT - aktivnost katalaze, AA - koncentracija askorbinske kiseline, PHE - sadržaj ukupnih fenola, Car - koncentracija karotenoida, Chla - koncentracija klorofila *a*, Chlb - koncentracija klorofila *b*, Chla/Chlb - omjer klorofil *a*/klorofil *b*, HNE - koncentracija HNE-a, *r* - prirast kulture.

5.1.8. Korelacijska povezanost prirasta, koncentracije klorofila *a*, koncentracije klorofila *b*, omjera klorofil *a*/klorofil *b*, sadržaja reaktivnih kisikovih tvari, parametara antioksidacijskog statusa i koncentracije 4-hidroksi-2-nonenala

Kako bi se utvrdio stupanj povezanosti između ispitivanih parametara tijekom tretmana herbicidima i H₂O₂ izračunati su koeficijenti korelacije uzevši u obzir vrijednosti izmjerene u stanicama na početku pokusa (0 h) te 4, 24, 48 i 72 h nakon tretmana (*Tablica 8*).

U kontrolnim kulturama je uočena značajna pozitivna korelacija između prirasta (OD₇₅₀) te koncentracija Chla i Chlb. Prirast je bio pozitivno koreliran s aktivnošću enzima APX, a negativna veza je utvrđena s aktivnošću enzima GR. Koncentracija Chla bila je u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom Chlb, koncentracijom Car i s aktivnošću enzima APX. Koncentracija Chlb bila je također u pozitivnoj vezi s ista dva parametra. Omjer Chla/Chlb je bio negativno koreliran s aktivnošću enzima GR. Također je i aktivnost enzima APX u kontroli bila negativno korelirana s aktivnošću enzima GR.

Pod utjecajem tretmana S-metolaklorom, prirast je bio pozitivno koreliran s koncentracijom Chla. Koncentracija Chlb bila je negativno korelirana s omjerom Chla/Chlb te koncentracijom AA. Također je uočena značajna negativna korelacija aktivnosti enzima APX s aktivnošću enzima CAT. Tretman terbutilazinom utjecao je na značajnu povezanost više parametara nego tretman S-metolaklorom. Prirast je također bio pozitivno koreliran s koncentracijom Chla, koja je bila u pozitivnoj vezi s koncentracijom Chlb te s koncentracijom Car. Koncentracija Chla je kod ovog tretmana bila negativno korelirana s omjerom Chla/Chlb. I koncentracija Chlb je također bila u negativnoj vezi s omjerom Chla/Chlb, a pozitivno korelirana s koncentracijom karotenoida. Omjer Chla/Chlb bio je negativno koreliran s koncentracijom Car. Sadržaj ROS-a bio je negativno koreliran s aktivnošću enzima GR, koja je bila značajno negativno korelirana s koncentracijom HNE-a. Aktivnost enzima CAT bila je u negativnoj vezi s koncentracijom PHE u stanici, koji su bili negativno korelirani s koncentracijom AA.

Tablica 8. Statistički značajni koeficijenti korelacije (r) između prirasta, koncentracije klorofila *a*, koncentracije klorofila *b*, omjera klorofil *a*/klorofil *b*, sadržaja ROS-a, parametara antioksidacijskog statusa i koncentracije HNE-a te pripadajuće *P*-vrijednosti.

		Kontrola	S-metolaklor	Terbutilazin	H ₂ O ₂
OD ₇₅₀	Chla	r=0,9841 P=0,016	r=0,9989 P=0,001	r=0,9709 P=0,029	
	Chlb	r=0,9766 P=0,023			
	APX	r=0,9991 P=0,001			
	GR	r=-0,9626 P=0,037			
Chla	Chlb	r=0,9992 P=0,001		r=0,9678 P=0,032	
	Chla/Chlb			r=-0,9593 P=0,041	
	Car	r=0,9900 P=0,010		r=0,9637 P=0,036	r=0,9635 P=0,037
	APX	r=0,9870 P=0,013			
Chlb	Chla/Chlb		r=-0,9908 P=0,009	r=-0,9995 P=0,001	
	Car	r=0,9947 P=0,005		r=0,9796 P=0,020	
	APX	r=0,9808 P=0,019			
	AA		r=-0,9584 P=0,042		
Chla/Chlb	Car			r=-0,9761 P=0,024	
	GR	r=-0,9741 P=0,026			
ROS	GR			r=-0,9728 P=0,027	
APX	GR	r=-0,9514 P=0,049			
	CAT		r=-0,9911 P=0,009		
GR	HNE			r=-0,9677 P=0,032	
CAT	PHE			r=-0,9954 P=0,005	r=-0,9833 P=0,017
PHE	AA			r=-0,9620 P=0,038	

5.2. Utjecaj herbicida i vodikovog peroksida na kulturu *C. kessleri* u linearnoj fazi rasta

5.2.1. Prirast kulture *C. kessleri*

Utjecaj S-metolaklora, terbutilazina i H₂O₂ na prirast kulture (*r*) *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana prikazan je u tablici 9. Tretman S-metolaklorom uzrokovao je smanjenje prirasta kulture *C. kessleri*. Nakon 4 h utvrđeno je značajno smanjenje prirasta ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu) kod svih koncentracija, osim tretmana sa 100 µg/L herbicida. Najniže vrijednosti utvrđene su kod tretmana najnižim koncentracijama S-metolaklora, 2 i 50 µg/L (0,954 odnosno 0,863) u usporedbi s kontrolnim kulturama (1,110). Nakon 24 h tretmana nisu zabilježene značajne razlike u prirastu, dok je nakon 48 h inhibiran rast kod svih koncentracija pokazujući statističku značajnost samo kod najviših koncentracija herbicida, 100 i 200 µg/L (1,223 odnosno 1,322) u odnosu na kontrolu (1,417) ($P < 0,05$). Terbutilazin je djelovao stimulatивно na rast kultura te je nakon početne inhibicije rasta (4 h nakon tretmana), utvrđeno postupno povećanje prirasta nakon 24 i 48 h tretmana. Statistički značajan prirast u odnosu na kontrolu zabilježen je pri koncentracijama 5, 250 i 500 µg/L herbicida ($P < 0,05$). Najveći prirast uzrokovala je najniža koncentracija terbutilazina 24 h (1,496) i 48 h (1,831) nakon tretmana. Tretman s H₂O₂ također je stimulatивно djelovao na rast kultura, uzrokujući najviše vrijednosti prirasta. Najniža koncentracija H₂O₂ (0.1 mM) uzrokovala je statistički značajnu stimulaciju rasta ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolne kulture) zabilježenu 24 i 48 h nakon tretmana (1,721 odnosno 1,894). Suprotno tome, povećane koncentracije H₂O₂ uzrokovale su jaku inhibiciju rasta pokazujući statističku značajnost ($P < 0,05$ u usporedbi s kontrolom) kod dviju najviših koncentracija, s niskim vrijednostima prirasta nakon 24 h (5 mM: 0,898; 10 mM: 0,805) i 48 h (5 mM: 0,744; 10 mM: 0,685) tretmana.

Tablica 9. Prirast (r) kultura *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) i H_2O_2 (0,1, 1, 5 i 10 mM).

Tretman/Vrijeme	r		
	4 h	24 h	48 h
Kontrola	1,110 \pm 0,008	1,178 \pm 0,011	1,417 \pm 0,003
S-metolaklor ($\mu\text{g/L}$)			
2	0,954 \pm 0,052*	1,156 \pm 0,005	1,322 \pm 0,003
50	0,863 \pm 0,031*	1,160 \pm 0,003	1,370 \pm 0,005
100	1,127 \pm 0,079	1,117 \pm 0,003	1,223 \pm 0,003*
200	1,053 \pm 0,028*	1,223 \pm 0,003	1,322 \pm 0,006*
Terbutilazin ($\mu\text{g/L}$)			
5	1,021 \pm 0,011	1,496 \pm 0,063*	1,831 \pm 0,006*
250	0,879 \pm 0,008	1,400 \pm 0,003*	1,818 \pm 0,008*
500	0,948 \pm 0,008	1,420 \pm 0,003*	1,678 \pm 0,002*
1000	1,076 \pm 0,028	1,303 \pm 0,006	1,466 \pm 0,011
H_2O_2 (mM)			
0,1	0,981 \pm 0,003	1,721 \pm 0,003*	1,894 \pm 0,006*
1	0,990 \pm 0,003	1,113 \pm 0,005	0,941 \pm 0,079
5	0,995 \pm 0,005	0,898 \pm 0,079*	0,744 \pm 0,006*
10	1,049 \pm 0,018	0,805 \pm 0,003*	0,685 \pm 0,011*

Prirast kultura je izražen kao omjer vrijednosti optičke gustoće (OD_{750}) kultura nakon 4, 24 i 48 h pokusa i vrijednosti OD_{750} na početku pokusa (0 h). Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.2.2. Koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

Tretman S-metolaklorom nije uzrokovao značajne promjene u koncentraciji Chla i Chlb u odnosu na kontrolu tijekom cijelog pokusa (Tablica 10; Tablica 11). Vrijednosti su se kretale od 0,475 mg/L 4 h nakon tretmana (200 $\mu\text{g/L}$ S-metolaklora) do 0,813 mg/L 48 h nakon tretmana (100 $\mu\text{g/L}$ S-metolaklora). Uzevši u obzir sve tretmane, prosječne vrijednosti su iznosile 0,519 mg/L nakon 4 h, 0,560 mg/L nakon 24 h i 0,791 mg/L 48 h nakon tretmana. Terbutilazin je uzrokovao statistički značajno povećanje koncentracije Chla 24 i 48 h nakon tretmana ($P < 0,05$; Tablica 10). Najviše vrijednosti Chla u odnosu na kontrolu (24 h: 0,505 mg/L; 48 h: 0,828 mg/L) izmjerene su pri koncentracijama od 1000 $\mu\text{g/L}$ (24 h: 0,661 mg/L) i 250 $\mu\text{g/L}$ herbicida (48 h: 1,002 mg/L). Zabilježeno je i značajno smanjenje koncentracije Chlb u odnosu na kontrolu (4 h: 0,237 mg/L; 24h: 0,207 mg/L; 48 h: 0,340 mg/L) prilikom

svih tretmana terbutilazinom (osim najveće koncentracije od 1000 µg/L herbicida) nakon svakog uzorkovanja (*Tablica 11*). Vrijednosti su se kretale od 0,087 mg/L (5 µg/L herbicida) do 0,271 mg/L (1000 µg/L herbicida) izmjerenih nakon 4 h tretmana. Tretman s 0,1 mM H₂O₂ uzrokovao je povećanje koncentracije Chla 24 i 48 h nakon tretmana (24 h: 0,583 mg/L; 48 h: 0,814 mg/L) dok su tretmani s višim koncentracijama (1, 5 i 10 mM) u isto vrijeme uzrokovali snažno smanjenje u koncentraciji ovog pigmenta ($P < 0,05$ u usporedbi s kontrolom; *Tablica 10*). Najniže vrijednosti Chla utvrđene su pri tretmanu s 5 mM H₂O₂ (24 h: 0,022 mg/L; 48 h: 0,043 mg/L). U stanicama je također zabilježena i snažna redukcija Chlb (*Tablica 11*). Najniže vrijednosti izmjerene su 24 h nakon tretmana s 0,1 i 1 mM H₂O₂ (0,05 mg/L za oba tretmana).

Tablica 10. Koncentracije Chla kultura *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM).

Tretman / Trajanje	Chla (mg/L)		
	4 h	24 h	48 h
Kontrola	0,578 ± 0,162	0,505 ± 0,031	0,828 ± 0,140
S-metolaklor (µg/L)			
2	0,511 ± 0,057	0,575 ± 0,014	0,796 ± 0,110
50	0,549 ± 0,064	0,557 ± 0,039	0,751 ± 0,030
100	0,543 ± 0,047	0,517 ± 0,023	0,813 ± 0,020
200	0,475 ± 0,010	0,591 ± 0,027	0,804 ± 0,030
Terbutilazin (µg/L)			
5	0,593 ± 0,140	0,596 ± 0,170*	0,860 ± 0,120*
250	0,578 ± 0,070	0,588 ± 0,130*	1,002 ± 0,050*
500	0,414 ± 0,010	0,609 ± 0,130*	0,878 ± 0,110*
1000	0,620 ± 0,010	0,661 ± 0,110*	0,935 ± 0,110*
Vodikov peroksid (mM)			
0,1	0,481 ± 0,040	0,583 ± 0,020*	0,814 ± 0,020*
1	0,625 ± 0,120	0,183 ± 0,020*	0,113 ± 0,000*
5	0,461 ± 0,010	0,022 ± 0,000*	0,043 ± 0,010*
10	0,281 ± 0,010	0,034 ± 0,000*	0,057 ± 0,020*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Tablica 11. Koncentracije Chlb kultura *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM).

Tretman / Trajanje	Chlb (mg/L)		
	4 h	24 h	48 h
Kontrola	0,237 ± 0,010	0,207 ± 0,010	0,340 ± 0,020
S-metolaklor (µg/L)			
2	0,209 ± 0,019	0,232 ± 0,018	0,310 ± 0,020
50	0,230 ± 0,029	0,231 ± 0,097	0,301 ± 0,018
100	0,229 ± 0,020	0,219 ± 0,020	0,308 ± 0,020
200	0,203 ± 0,020	0,234 ± 0,020	0,316 ± 0,027
Terbutilazin (µg/L)			
5	0,087 ± 0,010*	0,089 ± 0,027*	0,212 ± 0,010*
250	0,160 ± 0,010*	0,088 ± 0,026*	0,120 ± 0,020*
500	0,117 ± 0,010*	0,103 ± 0,017*	0,115 ± 0,020*
1000	0,271 ± 0,010	0,254 ± 0,010	0,140 ± 0,010
Vodikov peroksid (mM)			
0,1	0,142 ± 0,010	0,056 ± 0,010	0,106 ± 0,096
1	0,106 ± 0,000	0,052 ± 0,026	0,188 ± 0,009
5	0,342 ± 0,019	0,239 ± 0,039	0,102 ± 0,000
10	0,150 ± 0,010	0,145 ± 0,037	0,119 ± 0,017

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.2.3. Omjer klorofil a/klorofil b

Suprotno od tretmana terbutilazinom i H₂O₂, izlaganje stanica S-metolakloru nije uzrokovalo značajne razlike u omjeru Chla/Chlb s obzirom na kontrolne kulture (2,430 tijekom cijelog pokusa) neovisno o trajanju tretmana i koncentraciji (Tablica 12). Terbutilazin je uzrokovao povećanje omjera Chla/Chlb u stanicama nakon tretmana s najnižom koncentracijom (5 µg/L) uzrokujući dvostruko veće vrijednosti (4h: 6,752 mg/L; 24 h: 6,662 mg/L) u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Najniža koncentracija H₂O₂ (0,1 mM) uzrokovala je tijekom cijelog pokusa povećanje omjera Chla/Chlb u odnosu na kontrolu (48 h: 7,645; $P < 0,05$), dok su ostale koncentracije u isto vrijeme uzrokovale značajno smanjenje ($P < 0,05$).

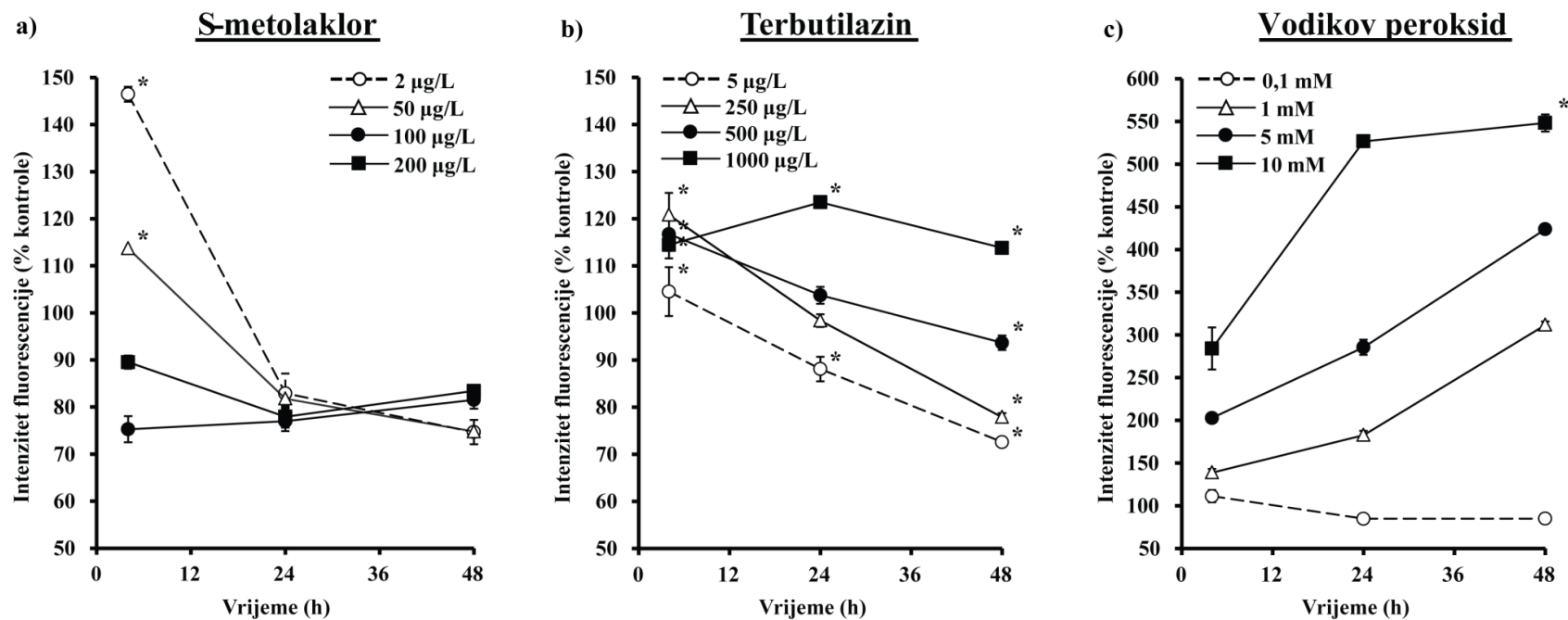
Tablica 12. Omjer Chla/Chlb 4, 24 i 48 h nakon tretmana S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM).

Tretman / Trajanje	Chla/Chlb		
	4 h	24 h	48 h
Kontrola	2,430	2,430	2,430
S-metolaklor (µg/L)			
2	2,444	2,472	2,566
50	3,382	2,406	2,491
100	2,367	2,352	2,636
200	2,340	2,525	2,538
Terbutilazin (µg/L)			
5	6,752*	6,662*	4,056
250	3,604	6,624	8,346
500	3,521	5,873	7,610
1000	2,287	2,601	6,662*
Vodikov peroksid (mM)			
0,1	3,375	10,327	7,645*
1	5,884	3,495	0,603*
5	1,348*	0,095	0,428*
10	1,870*	0,234	0,485*

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

5.2.4. Sadržaj reaktivnih kisikovih tvari

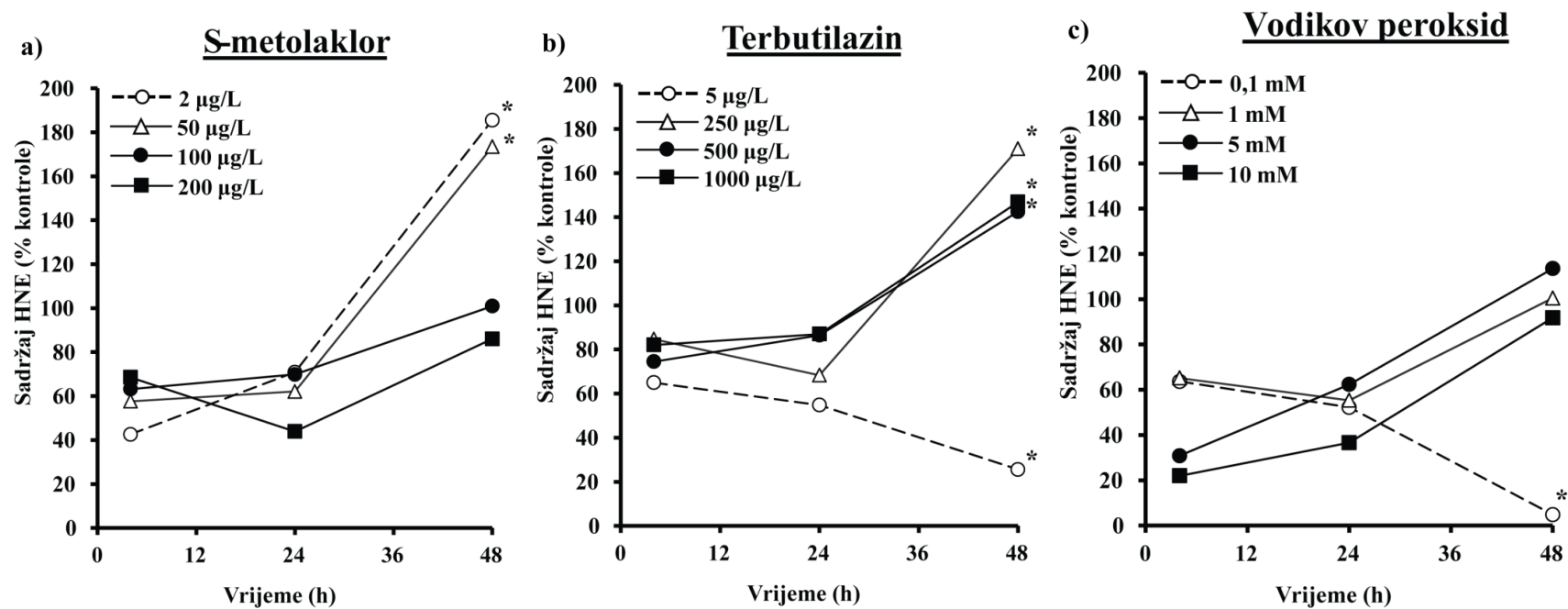
Tretmani S-metolaklorom, terbutilazinom i H_2O_2 značajno su utjecali na sadržaj ROS-a u stanicama *C. kessleri* (Slika 26). Pri tretmanu S-metolaklorom, samo su najniže koncentracije herbicida uzrokovale značajno povećanje ROS-a u stanicama *C. kessleri* već nakon 4 h tretmana. U odnosu na kontrolne stanice, sadržaj ROS-a se povećao za 46,5% kod stanica tretiranih s 2 $\mu\text{g/L}$ herbicida te za 13,7% veći kod koncentracije od 50 $\mu\text{g/L}$ herbicida ($P < 0,05$). Više koncentracije ovog herbicida i duže izlaganje (24 i 48 h) uzrokovali su smanjenje sadržaja ROS-a u stanicama do kraja eksperimenta. Terbutilazin je pokazao drugačije djelovanje. Sve četiri testirane koncentracije herbicida uzrokovale su značajno povećanje sadržaja ROS-a već nakon 4 h tretmana ($P < 0,05$). Povećano stvaranje ROS-a u stanicama u odnosu na kontrolu također je zabilježeno 24 h nakon izlaganja višim koncentracijama herbicida, pokazujući statistički značajno povećanje od 23,5% kod najviše koncentracije ($P < 0,05$), dok je kod koncentracija 5 $\mu\text{g/L}$ zabilježeno značajno smanjenje od 11,9% u odnosu na kontrolu. Nakon 48 h tretmana nižim koncentracijama od 5, 250 i 500 $\mu\text{g/L}$ zabilježeno je smanjenje sadržaja ROS-a u stanicama alga za 27,4% kod koncentracije 5 $\mu\text{g/L}$ te za 22,1% i 6,3% kod dvije više koncentracije terbutilazina ($P < 0,05$). Pri tretmanu najvišom koncentracijom herbicida, utvrđeno je povećanje od 13,8% ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). U stanicama tretiranim s H_2O_2 , sadržaj ROS-a se povećavao s trajanjem tretmana i povećanjem koncentracije toksikanta. Samo najniža koncentracija H_2O_2 (0,1 mM) nije utjecala na stvaranje ROS-a. Kod tretmana najvišom koncentracijom (10 mM), sadržaj ROS-a u stanicama alga se do kraja pokusa povećao više od pet puta u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Ako se usporede maksimalne vrijednosti ROS-a, četverostruko veći sadržaj zabilježen je u stanicama *C. kessleri* tretiranim s H_2O_2 , u odnosu na stanice tretirane S-metolaklorom i terbutilazinom.



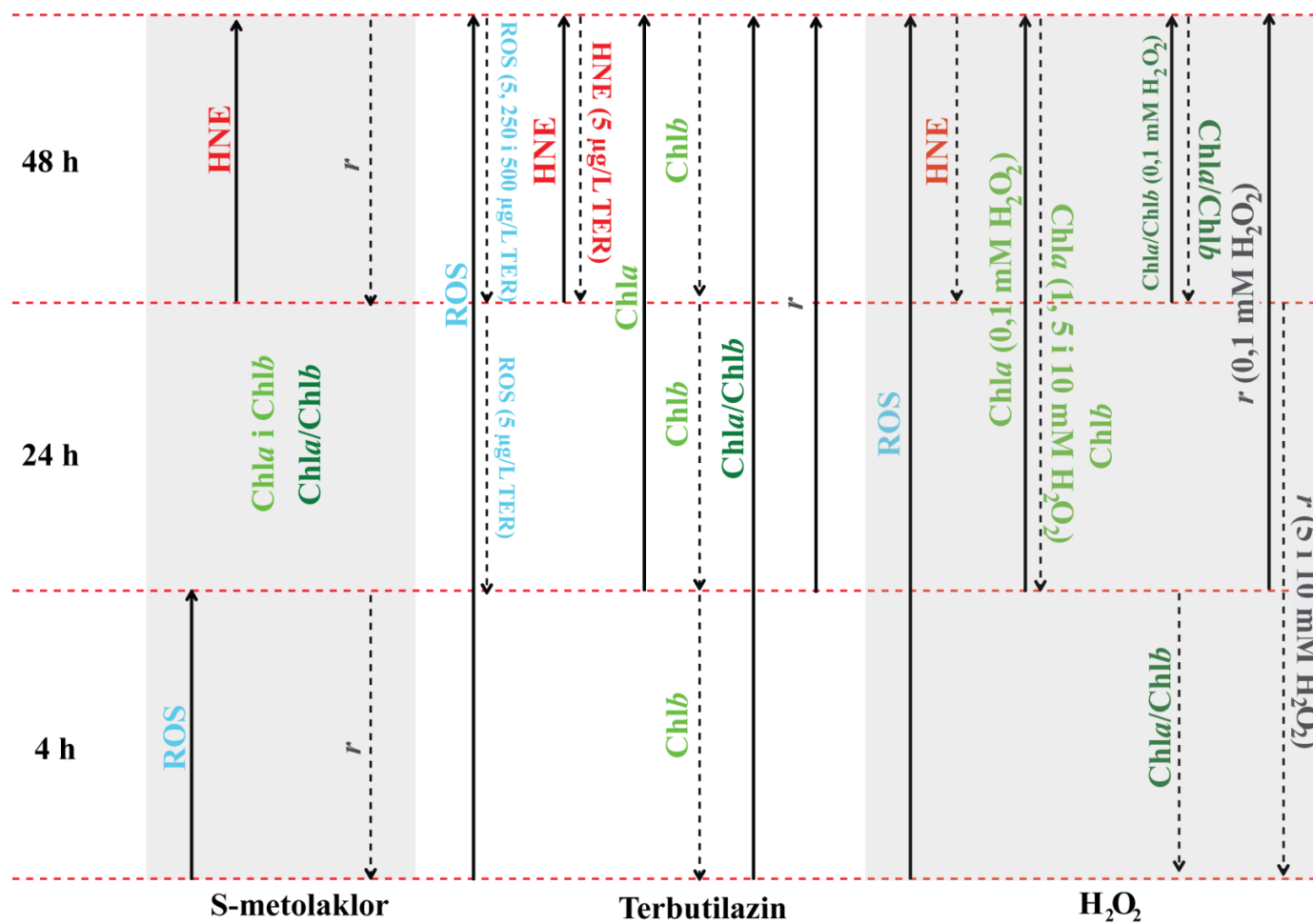
Slika 26. Sadržaj ROS-a u stanicama *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana a) S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$)

5.2.5. Sadržaj HNE-histidinskih konjugata

Promjene u sadržaju HNE-histidinskih (HNE-His) konjugata u proteinskim ekstraktima *C. kessleri* nakon tretmana toksikantima prikazane su na slici 27. Kod stanica tretiranih S-metolaklorom tijekom 4 i 24 h sadržaj HNE-His konjugata bio je niži od sadržaja u kontrolnim stanicama za 30 do 60%. Nakon 48 h inkubacije, kod tretmana dvjema nižim koncentracijama uočen je značajan porast sadržaja HNE-His konjugata, i to za 85,5% kod tretmana s 2 µg/L te za 73,4% kod tretmana s 50 µg/L herbicida ($P < 0,05$ u odnosu na kontrolu). Kod dviju viših koncentracija su zabilježene vrijednosti slične vrijednostima u kontrolnim stanicama. Terbutilazin je pokazao slično djelovanje. Nakon 4 i 24 h tretmana koncentracija HNE-His konjugata bila je niža nego u kontrolnim stanicama, ali je 48 h nakon tretmana zabilježen porast kod svih tretmana, osim najmanje koncentracije herbicida (5 µg/L) koja je uzrokovala značajno smanjenje sadržaja HNE-His konjugata za 74,4% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Kod tretmana s H₂O₂ količina HNE-His konjugata je rasla trajanjem tretmana kod viših koncentracija, ali su vrijednosti bile niže od onih utvrđenih u kontrolnim stanicama. Samo su vrijednosti nakon 24 i 48 h tretmana najnižom koncentracijom (0,1 mM H₂O₂) bile za 47,8 odnosno 95,2% niže nego u kontroli ($P < 0,05$).



Slika 27. Sadržaj HNE-His konjugata u stanicama *C. kessleri* 4, 24 i 48 h nakon tretmana a) S-metolaklorom (2, 50, 100 i 200 µg/L), b) terbutilazinom (5, 250, 500 i 1000 µg/L) i c) H₂O₂ (0,1, 1, 5 i 10 mM). Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih kultura) ± SE. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).



Slika 28. Sažeti prikaz promjena istraživanih parametara u linearnoj fazi rasta kulture *C. kessleri*; ↑povećanje, ↓smanjenje, ROS - sadržaj reaktivnih kisikovih tvari, Chla - koncentracija klorofila *a*, Chlb - koncentracija klorofila *b*, Chla/Chlb - omjer klorofil *a*/klorofil *b*, HNE - sadržaj HNE-histidinskih konjugata, *r* - prirast kulture.

5.2.6. Korelacijska povezanost između prirasta, koncentracije klorofila *a*, koncentracije klorofila *b*, omjera klorofil *a*/klorofil *b*, sadržaja reaktivnih kisikovih tvari i sadržaja HNE-histidinskih konjugata

Kako bi se utvrdio stupanj povezanosti između ispitivanih parametara tijekom tretmana herbicidima i H₂O₂ izračunati su koeficijenti korelacije uzevši u obzir vrijednosti izmjerene u stanicama na početku pokusa (0 h) te 4, 24 i 48 h nakon tretmana (*Tablica 13*).

U kontrolnim kulturama je uočena značajna pozitivna korelacija između prirasta (OD₇₅₀) te koncentracija Chl*a* i Chl*b*. Prirast je bio negativno koreliran sa sadržajem HNE-His konjugata. Također su u kontrolnim kulturama bile pozitivno korelirane koncentracije Chl*a* i Chl*b*. Nije bilo značajne povezanosti omjera Chl*a*/Chl*b* i sadržaja ROS-a s nekim od istraživanih parametara.

Kod tretmana herbicidima i H₂O₂ uočeno je više značajnih korelacija. Tretman S-metolaklorom utjecao je na pozitivnu korelaciju između prirasta i koncentracija Chl*a* i Chl*b* te na snažnu negativnu korelaciju sa sadržajem ROS-a. Također je uočena pozitivna veza između koncentracije Chl*a* i koncentracije Chl*b* kao i s omjerom Chl*a*/Chl*b*. Koncentracija Chl*b* također je bila u pozitivnoj korelaciji s omjerom Chl*a*/Chl*b*. Od istraživanih parametara pri tretmanu terbutilazinom, s prirastom je pozitivno korelirala koncentracija Chl*a*, a negativno sadržaj ROS-a. Koncentracija Chl*b* negativno je korelirala s omjerom Chl*a*/Chl*b*, a uočena je pozitivna veza između sadržaja ROS i HNE-His konjugata u stanicama. Kod tretmana s H₂O₂ prirast je bio pozitivno koreliran s koncentracijom Chl*a* te s omjerom Chl*a*/Chl*b*. Kao i pri tretmanima herbicidima, također je zabilježena negativna korelacija sa sadržajem ROS-a u stanicama. Uočena je pozitivna veza između koncentracije Chl*a* i omjera Chl*a*/Chl*b*. Značajna negativna korelacija utvrđena je između koncentracije Chl*a* kao i omjera Chl*a*/Chl*b* sa sadržajem ROS-a pri tretmanu s H₂O₂.

Tablica 13. Statistički značajni koeficijenti korelacije (r) između prirasta, koncentracije Chla, koncentracije Chlb, omjera Chla/Chlb, sadržaja ROS-a i sadržaja HNE-His konjugata te pripadajuće P-vrijednosti.

		Kontrola	S-metolaklor	Terbutilazin	H ₂ O ₂
OD₇₅₀	Chla	r=0,9875 P=0,020	r=0,7059 P=0,010	r=0,7945 P=0,002	r=0,7795 P=0,003
	Chlb	r=0,9583 P=0,003	r=0,7257 P=0,008		
	Chla/Chlb				r=0,8743 P=0,000
	ROS		r=-0,8903 P=0,000	r=-0,8197 P=0,001	r=-0,7276 P=0,007
	HNE	r=-0,9987 P=0,032			
Chla	Chlb	r=0,982 P=0,000	r=0,9939 P=0,000		
	Chla/Chlb		r=0,8663 P=0,000		r=0,835 P=0,001
	ROS				r=-0,8265 P=0,001
Chlb	Chla/Chlb		r=0,8074 P=0,001	r=-0,7837 P=0,003	
Chla/Chlb	ROS				r=-0,7608 P=0,004
ROS	HNE			r=0,6811 P=0,015	

6. RASPRAVA

6. RASPRAVA

Različite vrste zagađivala predstavljaju potencijalnu toksičnu opasnost u prehrambenim lancima vodenih ekosustava. S ciljem razumijevanja odgovora na stres u stanicama alga, kultura *Chlorella kessleri* izložena je herbicidima različitog djelovanja, koji su često prisutni u površinskim i podzemnim vodama (Guzzella i sur., 2006). S-metolaklor pripada skupini kloroacetanilida, a terbutilazin triazinskim herbicidima. U prvom pokusu alge su tretirane u ekspanzionalnoj (logaritamskoj) fazi rasta. U ovoj fazi, rast kultura nije limitiran ni intenzitetom svjetlosti ni koncentracijom hranjivih tvari te je povećanje biomase alga (izražene kroz suhu tvar, broj stanica ili optičku gustoću) po jedinici vremena, u svakom trenutku proporcionalno biomasi populacije (Becker, 1994). Početni broj stanica bio je manji kako bi se omogućilo da kultura za vrijeme trajanja pokusa ostane u ekspanzionalnoj fazi, a volumen kulture je osigurao dovoljan broj stanica za mjerenje promjena u prirastu kulture, koncentraciji Chla i Chlb, sadržaju ROS-a i koncentraciji HNE-a te za ispitivanje antioksidacijskog odgovora i ultrastrukture stanica *C. kessleri* nakon 4, 24, 48 i 72 sata tretmana herbicidima i H₂O₂. Drugi pokus je proveden s većim početnim brojem stanica koje su tretirane u fazi usporavanja rasta (linearna faza rasta) te su promjene istraživanih parametara (prirast kultura, koncentracije Chla i Chlb, sadržaj ROS-a i HNE-His konjugata) praćene 4, 24 i 48 sata nakon tretmana. U kulturama koje su u linearnoj fazi rasta, kojima se nakon inokulacije ne dodaje niti uklanja medij, karakteristično je postupno usporavanje logaritamskog rasta. Dioba stanica je uznapredovala do te mjere da dolazi do međusobnog zasjenjenja stanica te svjetlost postaje limitirajući čimbenik rasta. Specifični prirast kulture se smanjuje i povećanje biomase postaje gotovo linearno. Kultura ostaje u ovoj fazi sve do nastanka limitacije rasta uzrokovane nedostatkom nutrijenata ili povećanom respiracijom (Becker, 1994). Istraživanja su pokazala da se ovisno o fazi rasta kultura (lag, ekspanzionalna, linearna, stacionarna i faza odumiranja) mijenjaju i osnovne fiziološke i biokemijske osobine stanica (MacIntyre i Cullen, 2005) te dolazi do razlika u otpornosti stanica na tretmane toksikantima i bolesti, kao i do promjena u sastavu pojedinih staničnih tvari, posebice proteina i lipida (Fidalgo i sur., 1998). Dokazano je da se u linearnoj fazi rasta u stanicama povećava sadržaj ukupnih lipida pa tako i masnih kiselina (Mansour i sur., 2003). Uz veću biomasu alga, to je bio i osnovni razlog izbora ove faze rasta kulture *C. kessleri* u drugom pokusu za istraživanje učinaka oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije. Unatoč tim osobitostima, u provođenju toksikoloških istraživanja prema standardnim testovima (ISO 8692, 1989; OECD, 2011) dana je prednost kulturama u ekspanzionalnoj fazi rasta jer one

imaju brz i uravnotežen rast koji nije limitiran te su vrlo osjetljive na promjene i brzo reagiraju (Källquist, 2001). Lukavský (1994) ističe da je u testovima toksičnosti važno izabrati odgovarajuću koncentraciju inokuluma stanica, jer toksikanti djeluju sukladno masi suhe tvari, a ne volumenu kulture.

Koncentracije herbicida primijenjene u oba pokusa nešto su više od uobičajenih koje se mogu detektirati u površinskim vodama. Važnost istraživanja utjecaja kratkotrajnog izlaganja organizama višim koncentracijama herbicida naglašavaju Cedergreen i sur. (2004). Kratkotrajnim izlaganjem herbicidima, ovisno o mehanizmu njihova djelovanja, mogu nastati dugotrajne posljedice (Vallotton i sur., 2008a; Vallotton i sur., 2008b). Uz dvije vrste herbicida, kultura alga je tretirana i različitim koncentracijama H_2O_2 , poznatog prooksidansa i posrednika oksidacijskog stresa, odabranog kao pozitivna kontrola. Svojestvo molekule H_2O_2 da lako prolazi kroz višeslojne stanične stijenke i membrane, ostajući neutralna pri fiziološkom pH, omogućuje njezin brzi transport (Chance i sur., 1979). Iz tog je razloga pri tretmanu s H_2O_2 koncentracija ovog spoja u mediju za kratko vrijeme jednaka onoj u stanici (Takeda i sur., 1995). Unatoč tome, istraživanja su pokazala veliku sposobnost alga za brzu razgradnju ovog toksikanta (Kay i sur., 1984).

Rezultati pokazuju da se pod utjecajem sva tri toksikanta ROS stvara vrlo brzo, već nakon 4 sata tretmana (*Slike 7 i 26*). U logaritamskoj fazi rasta povećan sadržaj ROS-a bio je uzrokovan s tri više koncentracije (50, 100 i 200 $\mu\text{g/L}$), a u linearnoj fazi s nižim koncentracijama S-metolaklora. Sadržaj ROS-a se smanjivao trajanjem tretmana te je u linearnoj fazi vidljiv nagli pad nakon 24 sata tretmana, a u logaritamskoj nakon 48 sati tretmana pa sve do kraja pokusa. Osnovno djelovanje S-metolaklora temelji se na inhibiciji enzima odgovornog za nastanak masnih kiselina vrlo dugog lanca (VLCFA) pri čemu se narušava ravnoteža u sastavu masnih kiselina u membranama, što za posljedicu ima njihovu smanjenu rigidnost i propusnost (Götz i Böger, 2004). Ovo istraživanje također ukazuje da S-metolaklor djeluje i kroz druge mehanizme koji mogu rezultirati oksidacijskim stresom i lipidnom peroksidacijom. Naime, Štajner i sur. (2004) pretpostavljaju da su uzrok takvom djelovanju toksični metaboliti i ROS koji nastaje fotolitičkom razgradnjom ovog herbicida ili djelovanjem mikroorganizama. Samim procesima deklorinacije nastaju velike količine ROS-a, posebice $\cdot\text{OH}$, što može biti jedan od uzroka prooksidativnog učinka S-metolaklora. Posljedica takvog djelovanja je inhibicija rasta kultura *C. kessleri* u oba pokusa, sa značajnim smanjenjem prirasta kultura u logaritamskoj i linearnoj fazi (*Tablice 3 i 9*). Liu i Xiong (2009)

su istraživanjem toksičnosti dvaju enantiomera metolakloru u kulturi alga *Chlorella pyrenoidosa*, indirektno kroz povećanje aktivnosti enzima katalaze, dokazali stvaranje ROS-a u stanicama koje je bilo praćeno inhibicijom rasta.

Kod tretmana terbutilazinom sadržaj ROS-a je porastao primjenom svih koncentracija herbicida, pri čemu su više koncentracije (500 i 1000 µg/L) održavale povišenu razinu ROS-a tijekom cijelog pokusa. To potvrđuje i sam mehanizam djelovanja terbutilazina kao inhibitora fotosustava II koji zaustavlja prijenos elektrona u reakcijskom centru i time uzrokuje stvaranje većih količina ROS-a, uglavnom $^1\text{O}_2$ (Rutherford i Krieger-Liszkay, 2001). Tri niže koncentracije terbutilazina pokazale su stimulativni učinak na rast kulture *C. kessleri* u linearnoj fazi, vidljiv kroz povišen prirast kulture nakon 24 i 48 sati tretmana te smanjen sadržaj ROS-a. Ovakav stimulirajući učinak nižih koncentracija nekog spoja, koji je u većim dozama toksičan, naziva se hormeza. Osim kroz stimulaciju rasta, takav učinak u biljaka može se očitovati i kroz povećanje sadržaja proteina, povećanje biomase, suhe i svježe tvari, visine stabljike te kroz pojavu otpornosti na patogene (Duke i sur., 2006). Sličan stimulirajući učinak niskih koncentracija triazinskog herbicida terbutrina na prirast, uz povećanje koncentracije pigmenta, proteina te volumena stanica utvrđen je istraživanjem kulture alga *C. vulgaris* (Rioboo i sur., 2002). Pojavu hormetičkog utjecaja terbutilazina na rast nekih vrsta makrofita utvrdili su i Cedergreen i sur. (2004). U daljnjim su istraživanjima Cedergreen i sur. (2007), ispitujući hormetički utjecaj devet vrsta herbicida na biljke i alge, utvrdili da je kod tretmana terbutilazinom u više od 50% krivulja doza-učinak zabilježen porast u odnosu na kontrolu. Hormetički učinak terbutilazina, vidljiv kroz povećan prirast kulture *C. kessleri* mogao je biti posljedica prilagodbe stanica na povišenu razinu ROS-a aktivacijom antioksidacijskih mehanizama.

Stanice u eksponencijalnoj fazi bile su podložnije stvaranju ROS-a, čija je razina kod tretmana najvišim koncentracijama ostala povišena do kraja pokusa (Slika 26). To je istovremeno uzrokovalo i značajno smanjenje prirasta kulture s povećanjem koncentracije herbicida. Brojni testovi na algama dokazali su akutnu toksičnost triazinskih herbicida (Ma i sur., 2003, 2006), koju potvrđuju i naši rezultati sa stanicama u eksponencijalnoj fazi. Unatoč tome, ne treba zanemariti činjenicu da je djelovanje herbicida inhibitora fotosustava II na alge često reverzibilno i da razgradnjom samog herbicida ili njegovim uklanjanjem iz medija slijedi brzi oporavak kultura (Vallotton i sur., 2008b).

U usporedbi s tretmanima herbicidima, sadržaj ROS-a nastalog tretmanom s H_2O_2 bio je puno veći i rastao je povećanjem koncentracije i trajanjem tretmana. Ovakvo prooksidacijsko djelovanje H_2O_2 dokazano je brojnim istraživanjima (Collén i Davison, 1997; Lin i Kao,

1998). Rezultati tretmana pokusa na stanicama u linearnoj fazi rasta pokazali su da je jedino niža koncentracija H₂O₂ (0,1 mM) stimulirala rast stanica nakon 24 i 48 sati tretmana, dok su više koncentracije H₂O₂ (1, 5 i 10 mM) značajno inhibirale rast *C. kessleri*. Ovi rezultati nisu iznenađujući budući da je poznato algicidno djelovanje H₂O₂ (Kay i sur., 1984; Vänninen i Koskula, 1998). Za razliku od pokusa sa stanicama u linearnoj fazi rasta, za tretman u eksponencijalnoj fazi odabran je raspon puno nižih koncentracija. Razlog tome su preliminarna istraživanja kojima je utvrđeno da je manji inokulum stanica u eksponencijalnoj fazi vrlo brzo i nepovoljno reagirao na više koncentracije H₂O₂ (1, 5 i 10 mM) već nakon 4 sata. Dvije više koncentracije H₂O₂ primijenjene na kulturi *C. kessleri* u logaritamskoj fazi (0,25 i 0,5 mM) djelovale su stimulatивно na rast nakon 24 h tretmana, ali je do kraja pokusa uočeno smanjenje prirasta. Alge fotosintezom (Collén i sur., 1995) kao i enzimatskim putem kroz oksidacijski prasak uzrokovan nekim oblikom fizičkog ili kemijskog stresa stvaraju mjerljive koncentracije H₂O₂ (Mydlarz i Jacobs, 2004; Box i sur., 2008). Kao rezultat takvog otpuštanja H₂O₂ te fotokemijskog nastanka i unosa iz atmosfere, koncentracije ovog spoja u površinskim vodama mogu varirati od 10⁻⁸ do 10⁻⁵ M (Cooper i Zika, 1983; Skurlatov i Ernestova, 1998). Istraživanja su pokazala da se u prirodnim, kao i laboratorijskim uvjetima, odvija brza fotolitička razgradnja H₂O₂ te razgradnja djelovanjem mikroorganizama, posebice fitoplanktona (Drábková i sur., 2007; Takeda i sur., 1995). Pojava stimulacije rasta pri tretmanu s H₂O₂ može se objasniti prilagodbom *C. kessleri* na niže koncentracije ovog spoja. U oba pokusa je utvrđena značajna negativna korelacija između prirasta i sadržaja ROS-a u stanicama *C. kessleri* nakon svih tretmana, izuzev tretmana s H₂O₂ u pokusu sa stanicama u eksponencijalnoj fazi rasta, što pokazuje da je sam rast kulture bio uvjetovan količinom ROS-a (Tablice 8 i 13).

Uslijed nemogućnosti stanica da u potpunosti neutraliziraju štetno djelovanje ROS-a, dolazi do oksidacije ω-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina u reakcijama lipidne peroksidacije kojima nastaje nezasićeni aldehid 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Zbog svoje velike reaktivnosti, HNE stupa u reakcije s makromolekulama u stanici, posebice proteinima, DNA i lipidima uzrokujući daljnja oštećenja (Esterbauer i sur., 1991). Vežući se na histidinske, cisteinske i lizinske ostatke, stvara stabilne konjugate s proteinima te ga je moguće detektirati u stanicama primjenom specifičnih monoklonskih protutijela (Živković i sur., 2005).

U pokusu sa stanicama u linearnoj fazi rasta, jedino je nakon tretmana terbutilazinom utvrđena pozitivna korelacija ($r=0,6811$; $P=0,015$) između sadržaja ROS-a i HNE-His konjugata. Iako nije postojala pozitivna korelacija kod ostalih tretmana, sadržaj HNE-a se

povećavao do kraja pokusa, ukazujući na napredovanje reakcija lipidne peroksidacije. Napredovanje lipidne peroksidacije potvrđuju i istraživanja Pflugmachera i sur. (2007), koji su zabilježili najviše koncentracije HNE-a u stanicama morske makroalge *Fucus vesiculosus* 48 sati nakon izlaganja cijanobakterijskom toksinu nodularinu. Propagaciju lipidne peroksidacije u tilakoidnim membranama primarnih listova kukuruza tretiranih triazinima također su objasnili El-Shintinawy i Selim (1995). Ovi su autori utvrdili da tretmani uzrokuju 80%-tnu inhibiciju aktivnosti fotosustava II te istovremene promjene u biosintezi nezasićenih masnih kiselina. Pri tome se sadržaj linolenske kiseline smanjuje u korist manje zasićenih masnih kiselina (stearinske, oleinske i linolne), što dovodi do promjena u fluidnosti tilakoidnih membrana. Progresija lipidne peroksidacije dokazana je i povećanim koncentracijama HNE-a nastalim u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana kloroacetanilidnim herbicidom S-metolaklorom te se može povezati s promjenama u biosintezi lipida koje narušavaju funkcionalnost membrana (Götz i Böger, 2004). Nastanak HNE-His konjugata nakon tretmana s H₂O₂ također je zabilježeno u stanicama kvasaca transformiranih desaturazom koji sadrže višestruko nezasićene masne kiseline (Čipak i sur., 2006).

Intenzitet lipidne peroksidacije u stanicama alga uglavnom se istražuje metodom određivanja koncentracije nastalog malondialdehida (Choo i sur., 2004; Sabatini i sur., 2009). Prisutnost ostalih reaktivnih aldehida u algama slabo je istražena, a vezana je uglavnom uz karakteristične vrste nezasićenih aldehida, specifičnih za pojedine skupine alga. Tako su primjerice dekadial i dekatrienal specifični za pojedine vrste dijatomeja, a nastaju kao odgovor stanica na mehanička oštećenja ili druge oblike stresa (Pohnert, 2002). Laboratorijska istraživanja pokazala su bioaktivno djelovanje ovih aldehida na reproduktivni sustav njihovih predatora (Pohnert, 2005). Mali broj istraživanja vezan je uz pojavu HNE-a u stanicama alga. Njegova prisutnost u tkivima morskih makroalga uglavnom upućuje na oštećenja uzrokovana lipidnom peroksidacijom (Pflugmacher i sur., 2007; Box i sur., 2008), ali njegova uloga u ovim organizmima nije razjašnjena. Porast koncentracije HNE-a u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana terbutilazinom može upućivati na njegovo bioaktivno djelovanje. Takav učinak je prethodno zabilježen kod humanih tumorskih stanica (Žarković i sur., 1993). Bioaktivno djelovanje HNE-a u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana terbutilazinom koje se očitovalo povećanim prirastom alga analogno je prilagodbi humanih malignih stanica na tretman HNE-om. Pojava HNE-His konjugata u kontrolnim stanicama u obje faze rasta alga (*Slike 15 i 27*) te značajna negativna korelacija između prirasta i sadržaja HNE-a u pokusu sa stanicama u linearnoj fazi ukazuju na njegovu fiziološku aktivnost u normalnom staničnom metabolizmu. HNE-proteinskih konjugata u mitohondrijima stanica

vrste *Arabidopsis* sp. utvrđeni također i u netretiranim kulturama, dovode u pitanje način popravka ovih proteina i mehanizme njihovog uklanjanja (Winger i sur., 2005).

Istraživanja na humanim tkivima su pokazala da je akumulacija HNE-proteinskih konjugata prilikom patoloških stanja čest i dugotrajan proces (Cherkas i sur., 2009) što upućuje na činjenicu da ih stanice ne mogu adekvatno metabolizirati.

Alge su razvile različite mehanizme za sprječavanje nekontroliranih oksidacijskih reakcija čija su osnova antioksidacijski enzimi te antioksidansi male molekulske mase, poput askorbinske kiseline (AA), fenolnih spojeva (PHE), karotenoida (Car) i glutationa (GSH) (Mittler, 2002). Najvažniji antioksidacijski enzimi koji imaju ključnu ulogu u reguliranju količine ROS-a u različitim dijelovima stanice su superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT) te enzimi askorbat-glutationskog ciklusa, askorbat-peroksidaza (APX), glutation-reduktaza (GR) i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR). Osnovna uloga CAT i enzima askorbat-glutationskog ciklusa je neutralizacija H_2O_2 u stanicama alga. Unatoč različitim svojstvima i potrebama ovih enzima oni djeluju u sprezi vrlo učinkovito. CAT ima veliku učinkovitost, ali mali afinitet za supstrat tako da djeluje obično pri većim koncentracijama H_2O_2 (Halliwell, 1974). APX koristi askorbat kao reducens i ima veći afinitet za H_2O_2 te ga uklanja čak i pri nižim koncentracijama na specifičnim lokacijama u stanici (Dalton i sur., 1986). Sukladno tim svojstvima, mijenjala se i aktivnost enzima u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana S-metolaklorom. Aktivnost APX se povećala vrlo brzo, već nakon 4 sata tretmana, inducirana istovremenim povećanjem sadržaja ROS-a (*Slika 8a*). Suprotno tome, aktivnost CAT se povećala tek nakon 48 i 72 sata tretmana (*Slika 10a*), što je uzrokovalo i značajno smanjenje sadržaja ROS-a. To je potvrđeno i značajnom negativnom korelacijom ($r=-0,9911$; $P=0,009$) između aktivnosti CAT i APX pri tretmanu S-metolaklorom. S obzirom na primarni mehanizam djelovanja metolaklora kroz inhibiciju sinteze lipida, stvaranje ROS-a je potaknuto tek indirektno, oštećenjem membrana ili nastankom njegovih reaktivnih metabolita. Liu i Xiong (2009) su pri dužem tretmanu (96 sati) S-metolaklorom s koncentracijama u rasponu od 10 do 200 $\mu\text{g/L}$ također i u stanicama alge *C. pyrenoidosa* zabilježili povišenu aktivnost CAT, koja se povećanjem koncentracije herbicida naglo inhibirala. Aktivnost GR je porasla nakon 48 i 72 sata tretmana (*Slika 9a*). Pretpostavka je da je nešto kasnija aktivacija ovog enzima, čijim djelovanjem se regenerira potrebni GSH u stanici, uzrokovana većom koncentracijom HNE-a u stanicama *C. kessleri*. Konjugacija s GSH jedan je od osnovnih mehanizama detoksifikacije HNE-a u stanicama (Esterbauer i sur. 1991; Siems i sur., 1998), ali također i put detoksifikacije herbicida (Foyer i sur., 1995).

Schmidt i Kunert (1986) su dokazali da se aktivnošću ovog enzima kod biljaka ublažavaju toksične posljedice lipidne peroksidacije uzrokovane tretmanom herbicidima.

Tretman terbutilazinom uzrokovao je porast aktivnosti APX nakon 4 sata, dok je nagli porast aktivnosti CAT uočen tek nakon 24 sata tretmana (*Slike 8b i 10b*). Vidljivo je da je aktivnost APX inhibirana visokim sadržajem ROS-a pri višim koncentracijama herbicida, dok je aktivnost CAT ostala povišena, ili na razini aktivnosti kontrolnih stanica. Suprotno tome, aktivnost GR je povećana pri nižim koncentracijama herbicida (*Slika 9b*). H₂O₂ je uzrokovao istovremeno povećanje aktivnosti sva tri antioksidacijska enzima nakon 24 sata tretmana, a zabilježen je izrazito veliki porast aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (*Slike 8c, 9c i 10c*). Nakon porasta, uočeno je naglo smanjenje aktivnosti svih istraživanih enzima, osim APX.

Istraživanja su pokazala da uslijed tretmana herbicidima dolazi do akumulacije AA u stanicama alga (Fodorpataki i sur., 2009). Osim što AA djeluje kao elektron donor u reakciji s $\cdot\text{OH}$ za kojeg ne postoji enzimatski detoksifikacijski mehanizam, također je supstrat za APX (Carvalho i sur., 2004). Sva tri toksikanta (S-metolaklor, terbutilazin i H₂O₂) uzrokovala su povećanje koncentracije AA u odnosu na kontrolu nakon 72 sata (*Slika 12*), a povećanje je bilo najizraženije kod S-metolaklora, gdje je kod najviše koncentracije zabilježena 3,9 puta veća vrijednost nego u kontroli. Schmidt i Kunert (1986) smatraju da akumulacija ovog metabolita predstavlja jednu od glavnih strategija obrane biljaka od toksičnih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, nastalih djelovanjem herbicida.

Fenolni spojevi također predstavljaju snažne antioksidanse u stanicama alga štiteći ih od oksidativnih oštećenja. Poznato je da se akumulacija ovih sekundarnih metabolita povećava u uvjetima dugotrajnog stresa uzrokovanog različitim stresnim čimbenicima, primjerice metalima (D'Sauza i Devaraj, 2012) ili UV zračenjem (Duval i sur., 2000). Međutim, u stanicama *C. kessleri* najviše koncentracije ukupnih fenola utvrđene su već nakon 4 sata primjene oba herbicida i njihova se koncentracija smanjivala trajanjem tretmana (*Slika 11a i b*). Kod tretmana s H₂O₂ zabilježeno je značajno smanjenje sadržaja fenola u odnosu na kontrolu, osim pri tretmanu s koncentracijom od 0,1 mM (*Slika 11c*). Razlozi ovog smanjenja mogu biti višestruki. Tretman herbicidom dikvatom, čije djelovanje se temelji na stvaranju kisikovih radikala (uglavnom $\cdot\text{O}_2^-$), uzrokuje smanjenje sadržaja fenolnih kiselina u stanicama vodenih biljaka (Woodward i sur., 1974). Pretpostavlja se da djeluje kroz direktnu inhibiciju sinteze fenolnih kiselina ili njezinih prekursora te sprječava stvaranje esterskih derivata. Mogući uzrok smanjenja može biti i razgradnja fenola oksidativnom polimerizacijom (Mayer i Harel, 1979).

Klorofil *a* je kao osnovni pigment u svim vrstama alga odgovoran za apsorpciju svjetlosne energije, dok se sastav pomoćnih pigmenta razlikuje kod pojedinih taksonomskih skupina. U kompleksima za apsorpciju, zelene alge sadrže *Chlb* kao jedan od pomoćnih pigmenta. Omjer ova dva pigmenta (*Chla/Chlb*) je indirektni pokazatelj djelovanja fotosustava II kao i same fotosintetske učinkovitosti (Răcuciu i Creangă, 2007). Sadržaj pigmenta je vrlo osjetljiv parametar te se koristi za ispitivanje odgovora stanica alga na toksičnost različitih zagađivala kao što su teški metali (Sabatini i sur., 2009) i herbicidi (Liu i Xiong, 2009). Osjetljivost ovog parametra je također vidljiva iz pozitivne korelacije *Chla* s prirastom u oba pokusa (Tablice 8 i 13). Kod tretmana S-metolaklorom, nije bilo značajnih promjena u koncentracijama *Chla* i *Chlb* kao ni u omjeru ova dva pigmenta u stanicama *C. kessleri* u linearnoj fazi rasta. Dobiveni rezultati upućuju da testirane koncentracije herbicida nisu utjecale na sintezu ovih pigmenta. Suprotno tome, snažno povećanje koncentracije *Chla*, kao i povećanje omjera *Chla/Chlb* zabilježeno je nakon 24 i 48 sati tretmana terbutilazinom (Tablice 10-12). Ovo povećanje može se objasniti kao učinak ozelenjavanja (engl. *greening*) koji predstavlja jedan od mehanizama obrane tretiranih biljaka i alga s ciljem proizvodnje veće količine elemenata fotosustava II, klorofila i karotenoida, kako bi se povećala fotosintetska učinkovitost te ublažile posljedice tretmana herbicidima (Abbaspoor i sur., 2005). To je vidljivo i kroz istovremeno smanjenje sadržaja ROS-a te povećani prirast stanica *C. kessleri*. H_2O_2 je uzrokovao značajno smanjenje koncentracije pigmenta, izuzev tretmana 0,1 mM otopinom, koja je uzrokovala povećanje koncentracije *Chla* i *Chlb* sukladno povećanju prirasta *C. kessleri*. Tretman višim koncentracijama imao je učinak bijeljenja (engl. *bleaching*) koji se povećavao porastom koncentracije H_2O_2 i trajanjem tretmana. Ova pojava rezultat je razgradnje klorofila (Sairam i Srivastava, 2000). Pokus sa stanicama u logaritamskoj fazi rasta pokazao je suprotan učinak herbicida na sastav fotosintetskih pigmenta. Oba herbicida uzrokovala su značajno smanjenje koncentracija *Chla* i *Chlb* (Tablice 4 i 5). S-metolaklor je uzrokovao smanjenje koncentracije oba pigmenta od početka tretmana. Dokazano je da se pri tretmanu kultura *C. pyrenoidosa* S-metolaklorom koncentracije *Chla* i *Chlb* smanjuju sukladno inhibiciji prirasta s povećanjem koncentracije herbicida (Liu i Xiong, 2009). Isti autori utvrdili su i enantioselektivni učinak metolaklora, pri čemu je S- enantiomer uzrokovao dva do tri puta veće smanjenje koncentracije ovih pigmenta od manje toksičnog R- enantiomera. Kod tretmana terbutilazinom, snažniji utjecaj viših koncentracija herbicida (250, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) na sniženje *Chla* zabilježen je tek nakon 72 sata tretmana. Suprotno tome, značajan utjecaj terbutilazina na sniženje *Chlb* bio je vidljiv

već nakon 4 i 24 sata tretmana kod svih koncentracija. Blokirajući transport elektrona u fotosustavu II, terbutilazin uzrokuje stvaranje tripletnog klorofila i $^1\text{O}_2$ koji mogu odstraniti vodik iz molekula nezasićenih lipida pri čemu stvaraju lipidne radikale i započinju lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Rutherford i Krieger-Liszkay, 2001). Oksidacijskim oštećenjima lipida i proteina vezanih za klorofile, dolazi do prekida u prijenosu energije te do odvajanja klorofila od zaštitnih pigmenata karotenoida. Takve izdvojene molekule klorofila uzrokuju daljnje stvaranje $^1\text{O}_2$ i oštećenja membrana.

Oba herbicida uzrokovala su značajno povećanje omjera Chla/Chlb kod viših koncentracija. Tretman s H_2O_2 je i u ovom pokusu uzrokovao značajno smanjenje koncentracije oba pigmenta, ali i povišene vrijednosti omjera Chla/Chlb pri nižim koncentracijama (0,05 i 0,1 mM).

U pokusu sa stanicama u logaritamskoj fazi rasta, više koncentracije herbicida i H_2O_2 su uzrokovale značajno smanjenje sadržaja Car u odnosu na kontrolne stanice, koje je bilo posebno izraženo nakon 72 sata tretmana. Ovi pigmenti imaju izrazito važnu ulogu u stanicama alga, gdje osim što povećavaju spektar fotosintetski aktivnog zračenja, također služe zaštiti sustava skupljača svjetlosti, štiteći pigmente Chla i Chlb od fotokemijskih oštećenja uzrokovanih ROS-om, posebice $^1\text{O}_2$. Smanjenje koncentracije ukupnih Car i njihove antioksidativne učinkovitosti u stanicama *C. kessleri* uzrokovano tretmanima, uz smanjenje koncentracije Chla i Chlb, ukazuje na oštećenje fotosintetskog sustava (Hagen i sur., 1993). Takav učinak je suprotan rezultatima brojnih istraživanja u kojima se akumulacija Car u različitim stresnim uvjetima povezuje s njihovim učinkovitim antioksidacijskim djelovanjem (Ip i Chen, 2005; Kobayashi i sur, 1997).

Nakon 72 sata tretmana herbicidima došlo je do promjena u ultrastrukturi stanica *C. kessleri* vidljivih kroz razlike u organizaciji stanice i degradaciji gotovo svih staničnih struktura. Oba herbicida uzrokovala su oštećenja stanične stijenke te njezino odvajanje od membrane. Najveće promjene su uočene u građi kloroplasta te samoj organizaciji tilakoidnog sustava (Slike 19 i 22). One se očituju kroz nestanak pravilnog rasporeda i grupiranja tilakoida te njihovo proširenje i valovitu strukturu. Kod S-metolaklora se ti učinci pripisuju djelovanju herbicida na inhibiciju sinteze VLCFA zbog čega dolazi do promjene sastava masnih kiselina u membranama koje uvjetuju njezinu propusnost i rigidnost (Götz i Böger, 2004). Liu i Xiong (2009) otkrili su slične promjene pri tretmanu stanica alga *C. pyrenoidosa* s istom koncentracijom S-metolaklora, ali pri dužem izlaganju (96 sati), što dokazuje veću osjetljivost *C. kessleri*. Terbutilazin djeluje kroz stvaranje ROS-a u kloroplastima, uzrokujući lipidnu

peroksidaciju i proteolizu proteinskih kompleksa u tilakoidnim membranama, čime se objašnjavaju nastale promjene tilakoidnog sustava u kloroplastu *C. kessleri* uslijed djelovanja herbicida. Dokaz lipidne peroksidacije predstavlja i povećanje koncentracije HNE-a u stanicama nakon 72 sata tretmana, koji također uzrokuje oksidativna oštećenja membrana (Esterbauer i sur., 1991).

Kloroplasti imaju dobro organizirani tilakoidni sustav koji je svojom građom i funkcijom podređen optimalnom iskorištavanju svjetlosti za što učinkovitije odvijanje fotosinteze (Allen i Forsberg, 2001). Oštećenjem kloroplasta i samom degradacijom tilakoida dolazi do nemogućnosti učinkovitog odvijanja fotosinteze, što potvrđuje i istovremeno značajno smanjenje koncentracije Chla i Chlb, omjera Chla/Chlb te koncentracije ukupnih Car u stanicama *C. kessleri*. Osim navedenih promjena, uočljiva je i uznapredovala razgradnja škrobnih zrnaca, kao i smanjenje volumena pirenoida i njegovog škrobnog ovoja (*Slike 18, 19 i 22*), što ukazuje na promjene u metabolizmu stanice. Razgradnja škroba u stanicama također ukazuje na poremećenu osmotsku ravnotežu i smanjenu učinkovitost fotosinteze uzrokovanu djelovanjem herbicida. Slične promjene u stanicama *C. vulgaris* uočili su Estevez i sur. (2001) nakon tretmana željezom. Pirenoidi su proteinske strukture smještene u kloroplastima mnogih fotosintetskih alga. Osim što služe kao važna determinacijska karakteristika, oni su i središta fiksacije i koncentracije ugljikovog dioksida zbog velikog sadržaja enzima Rubisco. Istraživanjem građe pirenoida jednostanične zelene alge *Chlamydomonas reinhardtii* otkriveno je da se u pirenoidu i škrobnom ovojju nalazi 99,59% ukupne količine enzima Rubisco u stanici, što ukazuje na veliku važnost pirenoida u fotosintezi (He i sur., 2003). Degradacija pirenoida nakon tretmana S-metolaklorom i terbutilazinom, uz prekid izmjene tvari s kloroplastom preko dva karakteristična grupirana tilakoida upućuje na smanjenu učinkovitost fotosinteze (*Slike 18, 19 i 22*).

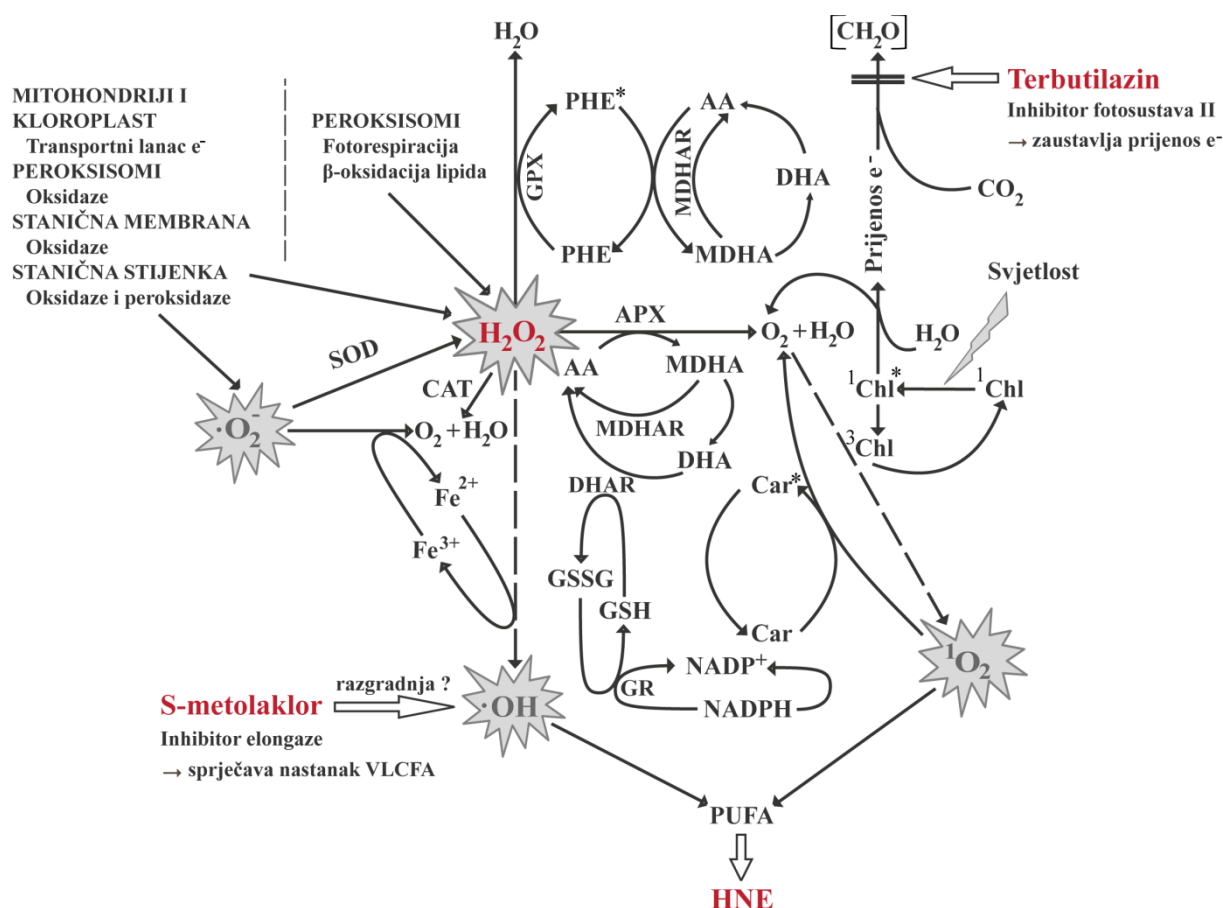
U biljaka i alga, vakuolizacija predstavlja jedan od mehanizama neutralizacije različitih ksenobiotika, uključujući herbicide. Većina tih spojeva konjugira s GSH te se određenim mehanizmima transportira u vakuole u kojima se detoksificira (Martinoia i sur., 2000). Istraživanja detoksifikacije metolaklora dokazala su da se ovaj herbicid konjugiran s GSH prenosi u vakuolu ATP-ovisnim nosiocima smještenim u tonoplastu (Martinoia i sur., 1993). Povećana vakuolizacija zamijećena je u više od 30% stanica *C. kessleri* kod oba tretmana te ukazuje na značajne procese detoksifikacije. Slične promjene u ultrastrukturi stanica praćene vakuolizacijom zabilježene su kao rezultat izlaganja kulture alga *Chlorella fusca* organometalnim spojevima prisutnim u industrijskim otpadnim vodama (Wong i sur., 1997)

te u stanicama *C. kessleri* tretiranim organofosfornim herbicidom glifosatom (Romero i sur., 2011).

Većina fitoplanktonskih alga pokazuje dnevnu periodičnost u sintezi staničnih tvari kao i usklađenost diobe stanice. To je posebno izraženo kod alga koje rastu u aklimatiziranim kulturama pri određenom fotoperiodu i imaju sinkroniziranu diobu stanice u točno određenom dijelu dnevnog ciklusa. U uvjetima provedenog eksperimenta, optimalno vrijeme uzorkovanja je bilo usklađeno prema fotoperiodu od 16 sati svjetlosti i 8 sati tame (Preisig i Andersen, 2005). Za razliku od kontrolne kulture u kojoj su gotovo sve stanice završile diobu, dioba stanica tretiranih herbicidima bila je asinkrona, što dokazuje pojava stanica u različitim fazama ciklusa (*Slike 18 i 23*). U kulturi tretiranoj S-metolaklorom, zamijećeni su i sporangiji koji sadrže 3 spore u fazi otpuštanja. To se razlikuje od uobičajenog parnog broja autospora (stanica kćeri) nastalih uzastopnim diobama (2-4-8-16 stanica) iz ishodišne (majčinske) stanice (Yamamoto i sur., 2005). Pojava nastanka manjeg broja autospora zabilježena je kod tretmana *C. vulgaris* triazinskim herbicidom terbutrinom (Rioboo i sur., 2009), što se povezuje sa zaustavljanjem staničnog ciklusa u G1 fazi u kojoj stanice povećavaju volumen te sintetiziraju RNA i proteine potrebne za mitozu. Ti metabolički procesi ovisni su o energiji proizvedenoj fotosintezom pa Rioboo i sur. (2009) ukazuju da je nemogućnost postizanja kritične veličine stanica potrebne za diobu citoplazme nakon mitoze i nastanak manjeg broja spora moguće povezati s djelovanjem ovog herbicida na inhibiciju fotosinteze. Manji broj autospora nakon tretmana S-metolaklorom (*Slika 20*) mogao bi ukazati da ovakvo djelovanje na diobu stanice nije ograničeno samo na herbicide inhibitore fotosinteze.

Terbutilazin je također uzrokovao asinkronu diobu stanica te je zabilježen i nastanak uvećanih sporangija, veličine preko 14 μm (*Slika 24*). Neki autori smatraju da je pojava uvećanih sporangija povezana s inhibicijom stanične diobe i sprječavanjem nastanka autospora, kao i s promjenama u propusnosti staničnih membrana uzrokovanih oksidacijskim stresom nastalim uslijed tretmana herbicidima (Romero i sur., 2011).

U okviru ovog istraživanja prisutnost HNE-a inducirana tretmanom herbicidima prvi put je dokazana u stanicama jednostaničnih zelenih alga. Većina procesa kojima se stvara ROS u stanicama alga je spora pri normalnim uvjetima, međutim, različiti ksenobiotici i toksični metali ih uvelike pospešuju. Unatoč složenim antioksidativnim mehanizmima, povišene koncentracije HNE-a utvrđene su prilikom tretmana s oba herbicida (*Slika 29*).



Slika 29. Shematski prikaz nastanka reaktivnih kisikovih tvari i 4-hidroksi-2-nonenala u stanicama *C. kessleri* nakon tretmana S-metolaklorom, terbutilazinom i H₂O₂, reakcije i antioksidativni mehanizmi.

Iako se HNE-u najčešće pripisuju toksični učinci, još nije dovoljno poznato njegovo djelovanje u prijenosu signala i prilagodbi stanica biljaka i alga na oksidacijski stres. Budući da završni produkti lipidne peroksidacije tvore relativno stabilne konjugate, moguće ih je utvrditi i nakon smanjenja koncentracije toksikanata u vodi. Kako su životinjske stanice nesposobne metabolizirati više koncentracije HNE-a, može se pretpostaviti da bi njegov prijenos na više trofičke razine mogao dovesti do neželjenih posljedica. Alge imaju sposobnost akumulacije različitih vrsta ksenobiotika i posjeduju cijeli spektar biomarkera koji mogu služiti za određivanje utjecaja zagađivala i procjenu kakvoće vodenih ekosustava (Torres i sur., 2008). Utvrđivanje prisutnosti reaktivnih aldehida u stanicama alga bi uz standardne testove toksičnosti mogla biti pogodna metoda za procjenu onečišćenja voda spojevima kao što su pesticidi, boje na bazi metala i ostala zagađivala koja uzrokuju oksidacijski stres.

Alge predstavljaju osnovni izvor hrane za mnoge zooplanktonske vrste, ličinačke stadije kukaca i rakova, mekušce te pojedine vrste riba. Nutritivna vrijednost pojedine vrste alga ovisi o različitim karakteristikama, kao što su oblik, veličina, probavljivost i toksičnost. Međutim, glavna odrednica kvalitete hrane koja se prenosi na ostale trofičke razine prehranbenih lanaca je njihov biokemijski sastav (masne kiseline, proteini, šećeri, minerali i vitamini) te je potrebno pratiti njegove promjene kao i nastanak te bioakumulaciju toksičnih metabolita pod utjecajem različitih stresnih čimbenika. Takva istraživanja imaju veliku važnost jer upravo alge imaju veliku ulogu prilikom ulaska i prijenosa različitih vrsta ksenobiotika u prehranbenim lancima vodenih ekosustava.

Rezultati ovog rada pomoći će u daljnjim istraživanjima bioloških posljedica zagađivanja putem latentno prisutnih produkata lipidne peroksidacije u algama, temeljnim sastavnicama prehranbenog lanca slatkovodnih biocenoza te pomoći u rasvijetljavanju uloge reaktivnih aldehida u prilagodbi na stresne uvjete.

7. ZAKLJUČAK

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Herbicidi S-metolaklor i terbutilazin, kao i vodikov peroksid značajno su utjecali na stvaranje ROS-a u stanicama *C. kessleri* u različitim fazama rasta.
2. U logaritamskoj fazi rasta, oba herbicida su smanjila prirast kulture *C. kessleri*. U linearnoj fazi rasta, S-metolaklor je uzrokovao smanjenje, a terbutilazin povećanje prirasta *C. kessleri*. Povećani prirast alga nakon tretmana terbutilazinom u linearnoj fazi, kao i smanjenje koncentracije ROS-a ukazuje na prilagodbu stanica na stres. H_2O_2 je pri višim koncentracijama uzrokovao značajno smanjenje prirasta kultura u obje faze rasta.
3. Koncentracija HNE-His konjugata povećavala se u stanicama *C. kessleri* s trajanjem tretmana u obje faze rasta, što upućuje na progresiju lipidne peroksidacije u stanicama alga. Niže koncentracije HNE-a utvrđene su i u netretiranim stanicama, što ukazuje na njegovu fiziološku ulogu.
4. Enzimatski i neenzimatski antioksidacijski odgovor stanica *C. kessleri* u logaritamskoj fazi nije bio učinkovit pri višim koncentracijama toksikanata, što je rezultiralo lipidnom peroksidacijom.
5. U logaritamskoj fazi rasta S-metolaklor i terbutilazin, kao i H_2O_2 uzrokovali su značajno smanjenje koncentracije Chla i Chlb. U linearnoj fazi, S-metolaklor nije uzrokovao promjene u koncentraciji fotosintetskih pigmenata, dok je terbutilazin utjecao na povećanje koncentracije Chla te smanjenje koncentracije Chlb.
6. Najviše koncentracije oba herbicida uzrokovale su promjene u ultrastrukturi stanica *C. kessleri*. Došlo je do promjene u građi kloroplasta i organizaciji tilakoidnog sustava, smanjenja pirenoida i škrobnog ovoja, odvajanja stanične stijenke i povećane vakuolizacije.
7. Prisutnost i akumulacija HNE-proteinskih konjugata prvi put je otkrivena u stanicama jednostaničnih zelenih alga u uvjetima oksidacijskog stresa izazvanog tretmanima herbicidima i H_2O_2 .
8. Alge izložene djelovanju herbicida akumuliraju HNE-His konjugate i predstavljaju potencijalnu toksičnu opasnost u prehrambenim lancima vodenih ekosustava.

9. Metoda otkrivanja HNE-modificiranih proteina u *C. kessleri* bi uz standardne testove toksičnosti mogla indicirati na onečišćenje okoliša spojevima koji uzrokuju oksidacijski stres.
10. *Chlorella kessleri* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje prilagodbe stanica na reaktivne aldehide nastale u uvjetima oksidacijskog stresa te uloge samih reaktivnih aldehida u prilagodbi stanica na stresne uvjete.

8. LITERATURA

8. LITERATURA

Abbaspoor M, Teicher HB, Streibig JC (2005) The effect of root-absorbed PSII inhibitors on Kautsky curve parameters in sugar beet. *Weed Res* 46: 226-235

Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS (2004) Production of antioxidant by the green alga *Dunaliella salina*. *Int J Agri Biol* 6: 49-57

Abd El-Baky HH, El Baz FK, El-Baroty GS (2009) Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects in vitro toward hepatotoxicity model. *Afr J Pharm Pharmacol* 3: 133-139

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol* 105: 121-126

Allen JF, Forsberg J (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* 6: 317-326

Alscher RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plantarum* 77: 457-464

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82: 1227-1238

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plantarum* 85: 235-241

Awasthi YC, Sharma R, Sharma A, Yadav S, Singhal SS, Chaudhary P, Awasthi S (2008) Self-regulatory role of 4-hydroxynonenal in signaling for stress-induced programmed cell death. *Free Radic Biol Med* 45: 111-118

Becker EW (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge

Bendritter M, Maupoil V, Vergely C, Dalloz F, Briot F, Rochette L (1998) Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: effects of iron chelators. *Fund Clin Pharmacol* 12: 510-516

Bischoff HW, Bold CH (1963) Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ Texas Publ* 6318, 32-36

Blée E (2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci* 7: 315-322

Blée E (1998) Phytooxylipins and plant defence reactions. *Prog Lipid Res* 37: 33-72

Boellmann F, Guettouche T, Guo Y, Fenna M, Mnayer L, Voellmy R (2004) DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 41000-41005

Böger P, Matthes B, Schmalfuß J (2000) Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. *Pest Manag Sci* 56: 497-508

Borović Šunjić S, Čipak A, Rabuzin F, Wildburger R, Žarković N (2005) The influence of 4-hydroxy-2-nonenal on proliferation differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cells. *Biofactors* 24: 141-148

Borowitzka MA (1995) Microalgae source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7: 3-15

Box A, Sureda A, Terrados J, Pons A, Deudero S (2008) Antioxidant response and caulerpenyne production of the alien *Caulerpa taxifolia* (Vahl) epiphytized by the invasive algae *Lophocladia lallemandii* (Montagne). *J Exp Mar Biol Ecol* 364: 24-28

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

Brown MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Rev Biochem* 52: 223-61

Butterfield DA (2002) Amyloid beta-peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: Implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. *Free Radic Res* 36: 1307-1313

Carafa R, Wollgast J, Canuti E, Ligthart J, Dueri S, Hanke G, Eisenreich SJ, Viaroli P, Zaldivar JM (2007) Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69: 1625-1637

Carvalho AM, Neto AMP, Tonon AP, Pinto E, Cardozo KHM, Brigagão MRPL, Barros MP, Torres MA, Magalhães P, Campos SCG, Guaratini T, Sigaud-Kutner TCS, Falcão VR, Colepicolo P (2004) Circadian protection against oxidative stress in algae. *Hypnos* 1: 142-157

Cedergreen N, Spliid NH, Streibig JC (2004) Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicide. *Ecotoxicol Environ Saf* 58: 314-323

Cedergreen N, Streibig JC, Kudsk P, Mathiassen S, Duke SO (2007) The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose Response* 5: 150-162

Chaufan G, Juarez A, Basack S, Ithuralde E, Sabatini SE, Genovese G, Oneto ML, Kesten E, Rios de Molina MC (2006) Toxicity of hexachlorobenzene and its transference from microalgae (*Chlorella kessleri*) to crabs (*Chasmagnathus granulatus*). *Toxicology* 227: 262-270

Cherkas A, Yelisyeyeva O, Semen K, Žarković K, Kaminskyy D, Gašparović AC, Jaganjac M, Lutsyk A, Waeg G, Žarković N (2009) Persistent accumulation of 4-hydroxynonenal-protein adducts in gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication. Coll Antropol 33: 815-821

Choo KS, Snoeijjs P, Pedersén M (2004) Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. J Exp Mar Biol Ecol 298: 111-123

Collén J, Del Río MJ, García-Reina G, Pedersén M (1995) Photosynthetic production of hydrogen peroxide by *Ulva rigida* C. Ag. (Chlorophyta). Planta 196: 225-230

Collén J, Davison IR (1997) *In vivo* measurement of active oxygen production in the brown alga *Fucus evanescens* using 2',7'-dichloro-2,7-difluorofluorescein diacetate. J Phycol 33: 643-648

Couderchet M, Vernet G (2003) Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. Ecotox Environ Saf 55: 271-277

Cooper WJ, Zika RG (1983) Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. Science 220: 711-712

Curzio M, Torrielli MV, Giroud JP, Esterbauer H, Dianzani MU (1982) Neutrophil chemotactic responses to aldehydes. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 36: 463-476

Čipak A, Hasslacher M, Tehlivets O, Collinson EJ, Živković M, Matijević T, Wonisch W, Waeg G, Dawes IW, Žarković N, Kohlwein SD (2006) *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation. Free Radic Biol Med 40: 897-906

Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3811-3815

Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E (2010) Effects of pesticides on freshwater diatoms. Rev Environ Contam Toxicol 203: 87-103

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell Mol Life Sci 57: 779-795

DeLorenzo ME, Scott GI, Ross PE (2001) Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. Environ Toxicol Chem 20: 84-98

Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy, of 23 October 2000

D'Souza RM, Devaraj VR (2012) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in hyacinth bean under zinc stress. *Afr Crop Sci J* 20: 17-29

Duval B, Shetty K, Thomas WH (2000) Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J Appl Phycol* 11: 559-566

Drábková M, Admiraal W, Maršálek B (2007) Combined exposure to hydrogen peroxide and light-selective effects on cyanobacteria, green algae, and diatoms. *J Environ Sci Technol* 41: 309-314

Duke SO, Cedergreen N, Velini E, Belz RG (2006) Hormesis: is it an important factor in herbicide use and allelopathy? *Outlooks Pest Manag* 16: 29-33

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128.

Estevez MS, Malanga G, Puntarulo S (2001) Iron-dependent oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Plant Sci* 161: 9-17

European Union, Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off J Eur Communities* 41 (L330/32-54)

Eurostat (2007) The Use of Plant Protection Products in the European Union, 1992-2003, str. 222

Fidalgo JP, Cid A, Torres E, Sukenik A, Herrero C (1998) Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 166: 105-116

Fodorpataki L, Bartha C, Keresztes ZG (2009) Stress-physiological reactions of the green alga *Scenedesmus opoliensis* to water pollution with herbicides. *Anal Univ Oradea, Fas Biol*, XVI/1: 51-56

Fott B, Nováková M (1969) A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. U: Fott B (ur.) *Studies in phycology*, str. 10-74. Academia, Prague.

Foyer CH, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol* 109, 1047-1057

- Gala WR, Giesy JP (1993) Using the carotenoid biosynthesis inhibiting herbicide, Fluridone, to investigate the ability of carotenoid pigments to protect algae from the photo-induced toxicity of anthracene. *Aquat Toxicol* 27: 61-70
- Gardner HW, Weisleder D, Plattner RD (1991) Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max*. *Plant Physiol* 97: 1059-1072
- Gardner HW, Hamberg M (1993) Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia faba* L.). *J Biol Chem* 268: 6971-6977
- Gardner HW, Grove MJ (1998) A route to 4S-hydroperoxy-2E-nonenal and related products. *Plant Physiol* 116: 1359-1366
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I, De Brabanter J, De Cooman L (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24: 1477-1486
- Gonzalez-Barreiro O, Rioboo C, Herrero C, Cid A (2006) Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environ Pollut* 144: 266-271
- Götz T, Böger P (2004) The very-long-chain fatty acid synthase is inhibited by chloroacetamides. *Z Naturforsch* 59: 549-553
- Goodwin T, Britton G (1988) Distribution and analysis of carotenoids. U: Goodwin TW (ur.) *Plant Pigments*, str. 61-132. Academic Press, Padstow, Cornwall
- Grechkin A (1998) Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* 37: 317-352
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX (2011) Microalgae as sources of carotenoids. *Mar Drugs* 9: 625-644
- Guiry W (2013) U: Guiry MD, Guiry GM *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 20 December 2012
- Guzzella L, Pozzoni F, Giuliano G (2006) Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ Pollut* 142: 344-353
- Hagen C, Braune W, Birckner E, Vogel K, Hader DP (1993) Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Girod) Rostafinski (Volvocales). V. Influences on photomovement. *Plant Cell Environ* 16: 991-995
- Halliwell B (1974) Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytol* 73: 1075-1086

- Hajimahmoodi M, Ali Faramarzi M, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N (2009) Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* 22: 43-50
- Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulations in plants. *Plant Growth Regul* 21: 79-102
- He P, Zhang D, Chen D, Liu Q, Wu W (2003) Gold immunolocalization of Rubisco and Rubisco activase in pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algae* 18: 121-127
- Heri W, Pfister F, Carroll B, Parshley T, Nabors JB (2008) Production, development, and registration of triazine herbicides. U: LeBaron HM, Mc Farland, JE, Burnside OC (ur.) *The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture*, str. 31-45. Elsevier Science, Amsterdam
- Hess FD (2000) Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci* 48: 160-170
- Holvoet KMA, Seuntjens P, Vanrolleghem PA (2007) Monitoring and modeling pesticide fate in surface waters at the catchment scale. *Ecol Model* 209: 53-64
- Hu WW, Fengl ZH, Eveleigh J, Iyer G, Pan JS, Amin S, Chung FL, Tang MS (2002) The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 23: 1781-1789
- Imbusch R, Mueller MJ (2000) Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F1 (phytoprostanes F1) in plants. *Plant Physiol* 124: 1293-1303
- Ip PF, Chen F (2005) Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Process Biochem* 40: 3491-3496
- Iriani D, Suriyaphan O, Chaiyanate N (2011) Effect of iron concentration on growth, protein content and total phenolic content of *Chlorella* sp. cultured in basal medium. *Sains Malays* 40: 353-358
- ISO 8692 (1989) Water quality - Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Scenedesmus capricornutum*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jaganjac M, Matijević T, Cindrić M, Čipak A, Mrakovčić L, Gubisch W, Žarković N (2010) Induction of CMV-1 promoter by 4-hydroxy-2-nonenal in human embryonic kidney cells. *Acta Biochim Polym* 57: 179-183
- Juárez AB, Vélez CG, Iñiguez AR, Martínez DE, Rodríguez MC, Vigna MS, Ríos de Molina MC (2011) A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia* 50: 413-421

Källquist T (2001) New OECD TG „Marine Algae Inhibition Test“. Development of ecotoxicity and toxicity testing of chemicals: proceedings of the Fourth Nordic Network Meeting, 9-11 October, Hurdalsjøen, Norway, str. 76-80. Nordic Council of Ministers, Copenhagen

Kaloyanova-Simeonova F (1998) Pesticides in Danube River and tributaries. Proceedings of Subregional warness raising workshop on persistent organic pollutants (POPs). Kranjska Gora, Slovenia, 11-14 May 1998, IOMC, 272-283

Kato J, Yamahara T, Tanaka K, Takio S, Satoh T (1997) Characterization of catalase from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. J Plant Physiol 151: 262-268

Kay SH, Quimby PC Jr, Ouzts JD (1984) Photo-enhancement of hydrogen peroxide toxicity to submersed vascular plants and algae. J Aquat Plant Manage 22: 25-34

Klejduš B, Lojtková L, Plaza M, Snóblová M, Stěrbová D (2010) Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1217: 7956-7965

Kobayashi M, Kakizono T, Nishio N, Nagui S, Kurimura Y, Tsuji Y (1997) Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. Appl Microbiol Biotechnol 48: 351-356

Komárek J, Fott B (1983) Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. U: Huber Pestalozzi G (ur.) Das Phytoplankton des Süßwassers 7. Teil, 1E., str. 1-1044. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart

König GM, Wright AD (1993) Algal secondary metabolites and their pharmaceutical potential. ACS Symp Ser 534: 276-296

Krienitz L, Hegewald EH, Hepperle D, Huss VAR, Rohr T, Wolf M (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen nov (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Phycologia 43: 529-542

LaFond SI, Jerrell JP, Cadwallader KR, Artz WE (2011) Formation of 4-hydroxy-2-(*E*)-nonenal in a corn-soy oil blend: a controlled heating study using a french fried potato model. J Am Oil Chem Soc 88: 763-772

Leavitt JRC, Penner D (1979) In vitro conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. J Agric Food Chem 27: 533-536

Li L, Hamilton RF, Kirichenko A, Holian A (1996) 4-Hydroxynonenal-induced cell death in murine alveolar macrophages. Toxicol Appl Pharmacol 139: 135-143

Lin JN, Kao CH (1998) Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot Bull Acad Sin* 39: 161-165

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

Liu W, Akhand AA, Kato M, Yokoyama I, Miyata T, Kurokawa K, Uchida K, Nakashima I (1999) 4-Hydroxynonenal triggers an epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J Cell Sci* 112: 2409-2417

Loeffler C, Berger S, Guy A, Durand T, Bringmann G, Dreyer M, von Rad U, Durner J, Mueller MJ (2005) B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. *Plant Physiol* 137: 328-340

Lukavský J (1992) The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Wat Res* 26: 1409-1413

Lukavský J (1994) Miniaturized algal growth bioassay. U: Aubrecht G, Dickand G, Prentice C (ur.) Monitoring of ecological change in wetlands of Middle Europe. Proc. International Workshop, Linz Austria, 1993., IWRB Publication No. 30, str. 151-156. Stapfia 31, Slimbridge, Linz

Ma J, Lin F, Wang S, Xu L (2003) Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull Environ Contam Toxicol* 71: 594-601

Ma J, Wang S, Wang P, Ma L, Chen X, Xu R (2006) Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 63: 456-462

MacIntyre HL, Cullen JJ (2005) Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae U: Andersen RA (ur.) Algal culturing techniques, str. 287-327. Elsevier Academic Press, London

Malanga G, Calmanovici G, Puntarulo S (1997) Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol Plant* 101: 455-462

Mallick N (2004) Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga (*Chlorella vulgaris*): response of the antioxidant system. *J Plant Physiol* 161: 591-597

Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* 157: 183-193

Mansour MP, Volkman JK, Blackburn SI (2003) The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry* 63: 145-153

- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249
- Martinoia E, Massonneau A, Frangne N (2000) Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol* 41: 1175-1186
- Matthes B, Böger P (2002) Chloroacetamides affect the plasma membrane. *Z. Naturforsch.* 57c: 843-852
- Mayer AM, Harel E (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215
- Miranda MS, Sato S, Mancini-Filho J (2001) Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special conditions. *Boll Chim Farm* 140: 165-168
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Müller K, Bach M, Hartmann H, Spiteller M, Frede HG (2002) Point- and nonpoint-source pesticide contamination in the Zwester Ohm Catchment, Germany. *J Environ Qual* 31: 309-318
- Munoz MJ, Ramos C, Tarazona JV (1996) Bioaccumulation and toxicity of hexachlorobenzene in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Aquat Toxicol* 35: 211-220
- Mydlarz LD, Jacobs RS (2004) Comparison of an inducible oxidative burst in free-living and symbiotic dinoflagellates reveals properties of the pseudopterosins. *Phytochemistry* 65: 3231-3241
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Nedeva D, Pouneva I, Toncheva-Panova T (2008) Profiles of antioxidant isoenzymes in the pathosystem *Scenedesmus-Phlyctidium* after treatment with plant growth regulators. *J Gen Appl Microbiol* 34: 361-376
- Němcová Y, Kalina T (2000) Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Algol Stud* 100: 95-105
- Ng, HYF, Clegg SB (1997) Atrazine and metolachlor losses in runoff events from an agricultural watershed: the importance of runoff components. *Sci Total Environ* 193: 215-228
- Nikookar K, Moradshahi A, Kharati M (2004) Influence of salinity on the growth, pigmentation and ascorbate peroxidase activity of *Dunaliella salina* isolated from Maharlu salt Lake in Shiraz. *Iran J Sci Technol* 28: 117-125

NOVA (2003) National Environmental Research Institute (NERI), Database for pesticides. National Surveillance of Water and Atmosphere. Ministry of the Environment, Denmark

Noordermeer MA, Feussner I, Kolbe A, Veldink GA, Vliegenthart JFG (2000) Oxygenation of (3Z)-alkenals to 4-hydroxy-(2E)-alkenals in plant extracts: a nonenzymatic process. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 112-116

OECD (2011) OECD guidelines for testing of chemicals. Freshwater alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD, Paris, France

Orosa M, Torres E, Fidalgo P, Abalde J (2000) Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal Applied Phycol* 12: 553-556

Oxford Biomedical Research (2001) Glutathione reductase assay. Spectrophotometric assay for glutathione reductase Product No. FR 19

Pavlič Ž, Stjepanović B, Horvatić J, Peršić V, Puntarić D, Čulig J (2006) Comparative sensitivity of green algae to herbicides using Erlenmeyer flask and microplate growth-inhibition assays. *Bull Environ Contam Toxicol* 76: 883-890

Pérez J, Domingues I, Soares AM, Loureiro S (2011) Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures *Ecotoxicology* 20: 1167-1175

Pflugmacher S, Olin M, Kankaanpaa H (2007) Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). *Mar Environ Res* 64: 149-159

Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042

Pohnert G (2002) Phospholipase A2 Activity Triggers the Wound-Activated Chemical Defense in the Diatom *Thalassiosira rotula*. *Plant Physiology* 129: 103-111

Pohnert G (2005) Diatom/Copepod Interactions in Plankton: The Indirect Chemical Defense of Unicellular Algae. *Chem Bio Chem* 6: 946-959

Poli G, Parola M (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 22: 287-305

Poljak-Blaži M, Jaganjac M, Sabol I, Mihaljević B, Matovina M, Grce M (2011) Effect of ferric ions on reactive oxygen species formation, cervical cancer cell lines growth and E6/E7 oncogene expression. *Toxicol In Vitro* 25: 160-6

Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T (2005) Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Warasan Songkhla Nakharin* 27: 1179-1187

- Preisig HR, Andersen RA (2005) Algal Culturing Techniques. U: Andersen RA (ur.) Historical Review of Algal Culturing Techniques, str. 1-12. Elsevier Academic Press, London
- Qian HF, Chen W, Sheng GD, Xu XY, Liu WP, Fu ZW (2008) Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*. *Aquat Toxicol* 88: 301-307
- Răcuciu M, Creangă D-E (2007) Influence of water-based ferrofluid upon chlorophylls in cereals. *J Magn Magn Mater* 311: 291-294
- Rennenberg H (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochem* 21: 2771-2781
- Rioboo C, Gonzales O, Herrero C, Cid A (2002) Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat Toxicol* 59: 225-235
- Rioboo C, O'Connor JE, Prado R, Herrero C, Cid A (2009) Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions *Aquat Toxicol* 94: 229-237
- Romero DM, Ríos de Molina MC, Juárez AB (2011) Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 741-747
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, del Río LA, Palma JM (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol* 170: 43-52
- Rutherford W, Krieger-Liszkay A (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends Plant Sci* 26: 648-653
- Sabatini SE, Juarez AB, Eppis MR, Bianchi L, Luquet CM, Rios de Molina MdC (2009) Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1200-1206
- Sairam RK, Srivastava GC (2000) Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biol Plantarum* 42: 381-386
- Sakihama Y, Yamasaki H (2002) Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biol Plantarum* 45: 249-254
- Sampey BP, Stewart BJ, Petersen DR (2007) Ethanol-induced modulation of hepatocellular extracellular signal-regulated kinase-1/2 activity via 4-hydroxynonenal. *J Biol Chem* 282: 1925-1937

- Sano S, Ueda M, Kitajima S, Takeda T, Shigeoka S, Kurano N, Miyachi S, Miyake C, Yokota A (2001) Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. *Plant Cell Physiol* 42: 433-40
- Scandalios JG (1992) Regulation of the antioxidant defense genes Cat and Sod of maize. U: Scandalios JG (ur.) *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, str. 117-152. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schmidt A, Kunert KJ (1986) Lipid Peroxidation in Higher Plants. The role of glutathione reductase. *Plant Physiol* 82: 700-702
- Schreck R, Rieber P, Bauerle PA (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 10: 2247-2258
- Serrano A, Llobell A (1993) Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 190: 199-205
- Sharma R, Brown D, Awasthi S, Yang Y, Sharma A, Patrick B, Saini MK, Singh SP, Zimniak P, Singh SV, Awasthi YC (2004) Transfection with 4-hydroxynonenal-metabolizing glutathione S-transferase isozymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *Eur. J. Biochem* 271: 1690-1701
- Shigeoka S, Nakano Y, Kitaoka S (1980) Purification and some properties of L-ascorbic-acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 201: 121-127
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305-1319
- Siems WG, Pimenov AM, Esterbauer H, Grune T (1998) Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism. *J Biochem* 123: 534-539
- Sies H (1985) *Oxidative stress*. Orlando, Academic press
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158
- Skurlatov YL, Ernestova LS (1998) The impact of human activities on freshwater aquatic systems. *Acta Hydrochim Hydrobiol* 26: 5-12
- Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 291-314

Smith RG, Henry YK, Mattson MP, Appel SH (1998) Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 44: 696-699

Strickland JD, Parsons TR (1968) A Practical Handbook of Seawater Analysis. Bulletin 168, str. 311. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa

Štajner D, Konstantinović B, Popović B, Meseldžija M, Anđelić A (2004) S-metolachlor effect on antioxidant status in seeds of *Amaranthus retroflexus* L. *Acta herb* 13: 545-554

Šunjić SB, Čipak A, Rabuzin F, Wildburger R, Žarković N (2005) The influence of 4-hydroxy-2-nonenal on proliferation, differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cells. *Biofactors* 24: 141-148

Takaichi S (2011) Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar Drugs* 9: 1101-1118

Takeda H (1991) Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *J Phycol* 27: 224-232

Takeda T, Yokota A, Shigeoka S (1995) Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant Cell Physiol* 36: 1089-1095

Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S (1997) Metabolism of hydrogen peroxide by tile scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* 99: 49-55

Takeda T, Yoshimura K, Yoshii M, Kanahoshi H, Miyasaka H, Shigeoka S (2000) Molecular characterization and physiological role of ascorbate peroxidase from halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80 strain. *Arch Biochem Biophys* 376: 82-90

Tripathi BN, Mehta SK, Amar A, Gaur JP (2006) Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu²⁺ and Zn²⁺. *Chemosphere* 62: 538-544

UNESCO (1966) Determination of Phytoplankton Pigments in Sea Water. Report of SCOR-UNESCO Working Group 17. Monographs on Oceanographic Methodology 1, str. 69, Paris

Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, Ikemoto M, Ara H, Nakanuma Y (2002) Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 37: 176-183

Torres MA, Barros MP, Campos SC, Pinto E, Rajamani S, Sayre RT, Colepicolo P (2008) Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 71: 1-15

Ustinova I, Krienitz L, Huss VAR (2001) *Closteriopsis acicularis* (G.M. Smith) Belcher et Swale is a fusiform alga closely related to *Chlorella kessleri* Fott et Nováková (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Eur J Phycol* 36: 341-351

Vallotton N, Moser D, Eggen RIL, Junghans M, Chevre N (2008a) S-metolachlor pulse exposure on the alga *Scenedesmus vacuolatus*: effects during exposure and the subsequent recovery. *Chemosphere* 73: 395-400

Vallotton N, Eggen RIL, Escher BI, Krayenbühl J, Chèvre N (2008b) Effect of pulse herbicidal exposure on *Scenedesmus vacuolatus*: a comparison of two photosystem II inhibitors. *Environ Toxicol Chem* 27: 1399-1407

Vänninen I, Koskula H (1998) Effect of hydrogen peroxide on algal growth, cucumber seedlings and the reproduction of shore flies (*Scatella stagnalis*) in rockwool. *Crop Prot* 17: 547-553

Waeg G, Dimsity G, Esterbauer H (1996) Monoclonal antibodies for detection of 4-hydroxynonenal modified proteins *Free Radic Res* 25: 149-59

Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struc Biol* 2: 388-393

White AL, Jahnke L (2002) Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of β -carotene in two *Dunaliella* spp. *Plant Cell Physiol* 43: 877-884

Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Mol Breed* 1: 207-228

Winger AM, Millar AH, Day DA (2005) Sensitivity of plant mitochondrial terminal oxidases to the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). *Biochem J* 387: 865-870

Woodward RE, Silver WS, Mansell RL (1974) Herbicide-Related changes in phenolic acid content of field-grown *Hydrilla*. *Hyacinth Contr J* 12: 35-37

Wong SL, Nakamoto L, Wainwright JF (1997) Detection of organometallic complexes in wastewaters using algal assays. *Arch Environ Contam Toxicol* 32: 358-366

Xu H, Miao X, Wu Q (2006) High quality biodiesel production from a microalgae *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126: 499-507

Yamamoto M, Kurihara I, Kawano S (2005) Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221: 766-775

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in parkinson disease. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2696-2701

Žarković N, Ilić Z, Jurin M, Schaur RJ, Puhl H, Esterbauer H (1993) Stimulation of HeLa cell growth by physiological concentrations of 4-hydroxynonenal. Cell Biochem Funct 11: 279-86

Žarković N, Lončarić I, Čipak A, Jurić G, Wonisch W, Borović S, Waeg G, Vuković T, Žarković K (2001) Patofiziološke značajke sekundarnih glasnika slobodnih radikala i oksidativni stres. U: Bradamante V, Lacković Z (ur.) Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa, str. 13-32. Medicinska naklada, Zagreb

Žarković N (2003) 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. Mol Aspects Med 24: 281-291

Živković M, Žarković K, Škrinjar Lj, Waeg G, Poljak-Blaži M, Borović Šunjić S, Schaur RJ, Žarković N (2005) A new method for detection of HNE-histidine conjugates in rat inflammatory cells. Croat Chem Acta 78: 91-98

<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/32100>

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/623.htm>

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/1027.htm>

9. SAŽETAK

9. SAŽETAK

Jednostanične zelene alge su široko rasprostranjene u vodenim ekosustavima, vrlo su osjetljive na različite vrste toksikanata te brzo reagiraju. Kultura alga *Chlorella kessleri* Fott et Nováková je u dvije faze rasta (logaritamskoj i linearnoj) izložena djelovanju dvaju herbicida, kloroacetanilida S-metolaklora i triazina terbutilazina te prooksidansa H₂O₂. Praćen je utjecaj tretmana na stvaranje reaktivnih kisikovih tvari (ROS), koncentraciju fotosintetskih pigmenta, antioksidacijski odgovor i ultrastrukturu stanica. Intenzitet lipidne peroksidacije praćen je preko nastanka produkta oksidacije ω-6 višestruko nezasićenih masnih kiselina, 4-hidroksi-2-nonenala (HNE), primjenom specifičnih monoklonskih protutijela na HNE-histidinske (HNE-His) konjugate. Toksikanti su značajno utjecali na stvaranje ROS-a u stanicama *C. kessleri* u različitim fazama rasta što je rezultiralo nastankom HNE-a te promjenama u prirastu i koncentraciji klorofila *a* i klorofila *b*. Povećani prirast alga nakon tretmana terbutilazinom u linearnoj fazi, uz povećan sadržaj HNE-a i smanjen sadržaj ROS-a ukazuju na prilagodbu stanica na stres. Sadržaj HNE-His konjugata se povećavao s trajanjem tretmana u obje faze rasta što upućuje na progresiju lipidne peroksidacije u stanicama alga. Lipidna peroksidacija ukazuje da djelovanje proučavanih antioksidacijskih enzima (katalaze, askorbat-peroksidaze i glutation-reduktaze) te neenzimatskih antioksidansa (fenola, askorbinske kiseline i karotenoida) nije bilo dovoljno učinkovito pri višim koncentracijama toksikanata u logaritamskoj fazi rasta. Niže koncentracije HNE-a utvrđene su i u netretiranim stanicama, što ukazuje na njegovu fiziološku ulogu. Toksični utjecaj herbicida na *C. kessleri* vidljiv je i kroz promjene u građi kloroplasta, organizaciji tilakoidnog sustava, razgradnju škroba, smanjenje pirenoida i škrobnog ovoja te odvajanja stanične stijenke i povećanu vakuolizaciju. Prisutnost i akumulacija HNE-proteinskih konjugata prvi put je otkrivena u stanicama jednostaničnih zelenih alga, kao rezultat oksidacijskog stresa izazvanog tretmanima herbicidima i H₂O₂. Iako se HNE-u najčešće pripisuju toksični učinci, još nije dovoljno poznato njegovo djelovanje u prijenosu signala i prilagodbi biljnih i algalnih stanica na oksidacijski stres. Kako su životinjske stanice nesposobne adekvatno metabolizirati HNE, može se pretpostaviti da bi njegov prijenos na trofičkim razinama mogao predstavljati potencijalnu toksičnu opasnost u prehrambenim lancima vodenih ekosustava. Ova metoda bi uz standardne testove toksičnosti mogla indicirati na onečišćenje okoliša spojevima koji uzrokuju oksidacijski stres. *Chlorella kessleri* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje prilagodbe stanica na reaktivne aldehide nastale u uvjetima oksidacijskog stresa te njihovu ulogu u prilagodbi stanica na stresne uvjete.

10. SUMMARY

10. SUMMARY

Unicellular green algae are widely distributed inhabiting different types of aquatic environments. They are very sensitive to wide range of pollutants rapidly taking up and responding to them. Two herbicides, chloroacetanilide S-metolachlor and triazine terbuthylazine, as well as prooxidant H₂O₂ were applied in order to study the response to oxidative stress of *Chlorella kessleri* Fott et Nováková culture growing in two phases (logarithmic and linear growth). The influence of these toxicants on reactive oxygen species (ROS) production, photosynthetic pigment concentration, antioxidative response and algal cell ultrastructure was monitored. Lipid peroxidation end-product 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) was detected using the antibody specific for the HNE-histidine (HNE-His) adducts.

The results obtained by this study demonstrate that toxicants applied to algae generate intracellular ROS resulting in the production of HNE, inducing growth alterations and changes in chlorophyll *a* and chlorophyll *b* content. Increased growth rate after terbuthylazine treatment in linear phase of growth, followed by decreased ROS levels and higher HNE content show adaptation of *C. kessleri* cells to oxidative stress. The amount of HNE-His adducts increased by the end of the experiment in both growth phases indicating the progression of lipid peroxidation. Lipid peroxidation detected in logarithmic phase of growth indicates the limited effectiveness of measured enzymatic (catalase, ascorbat-peroxidase and glutathione reductase) as well as non-enzymatic antioxidants (phenolics, ascorbic acid and carotenoids). Low HNE concentrations were detected even in untreated, control *C. kessleri* emphasising its physiological role in these organisms. Toxicity of these herbicides is also seen through the changes in chloroplast structure and the organization of the thylakoid membrane system, as well as through starch metabolism, decreased size of pyrenoid and its surrounding starch sheet, cell wall separation and increased vacuolisation. Presence and accumulation of HNE was detected for the first time in the cells of green unicellular algae, produced in the conditions of herbicide and H₂O₂-induced oxidative stress. Though many deleterious effects have been attributed HNE, its role in signaling and adaptation to stress in plants and algae, remains to be fully characterized. As animal cells are incapable to adequately metabolize HNE one could assume that algae intoxicated in this manner, in combination with HNE, could also serve as a potential biohazard in aquatic food webs. As an addition to the standard toxicity tests, the evaluation of HNE-protein adducts in *C. kessleri* might indicate environmental pollution with oxidative stress-inducing compounds. *C. kessleri* can be used as a model to further study cellular hormetic adaptation to oxidative stress-derived aldehydes.

11. ŽIVOTOPIS

11. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Osijeku 5. listopada 1981. godine. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala sam studij biologije i kemije. Diplomirala sam 2006. godine te stekla zvanje profesora biologije i kemije na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, gdje sam trenutno zaposlena kao asistent na Zavodu za ekologiju voda, Laboratoriju za ekologiju alga. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala sam 2006. godine. Od 2008. godine suradnik sam na projektu „Zaštita voda Kopačkog rita - ekološke interakcije Dunava i poplavnog područja“ (MZOŠ 285-0000000-2674) čiji je voditelj prof. dr. sc. Jasna Vidaković.

U nastavnom radu sudjelujem u izvođenju vježbi iz kolegija Preddiplomskog studija biologije (Anatomija biljaka, Morfologija biljaka, Alge, gljive i lišajevi, Terenska nastava II i Fitoplankton) te kolegija Ekologija kopnenih voda na Diplomskom znanstvenom studiju biologije.

U koautorstvu sam objavila tri znanstvena rada citirana u bazi Current Contents te sam sudjelovala na više znanstvenih skupova u Republici Hrvatskoj i inozemstvu.

U sklopu projekta SEE ERA-NET boravila sam na usavršavanju i položila tečaj „Toxic cyanobacteria in drinking water sources - problem and sanitation“ u Veszpremu, Mađarska, 2008. godine.

Član sam Hrvatskog biološkog društva, Hrvatskog botaničkog društva i Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

Popis publikacija:

Znanstveni radovi objavljeni u CC bazi:

1. Stević F, Mihaljević M, **Špoljarić D** (2013) Changes of phytoplankton functional groups in a floodplain lake associated with hydrological perturbations. *Hydrobiologia*: 709: 143-158
2. **Špoljarić D**, Čipak A, Horvatić J, Andrišić L, Waeg G, Žarković N, Jaganjac M (2011) Endogenous 4-hydroxy-2-nonenal in microalga *Chlorella kessleri* acts as a bioactive indicator of pollution with common herbicides and growth regulating factor of hormesis. *Aquat Toxicol* 105: 552-558

3. Mihaljević M, **Špoljarić D**, Stević F, Cvijanović V, Hackenberger Kutuzović (2010) The influence of extreme floods from the River Danube in 2006 on phytoplankton communities in a floodplain lake: Shift to a clear state. *Limnologica* 40: 260-268

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Vuković R, Štolfa I, Žuna Pfeiffer T, **Špoljarić D**, Ćavar I, Krstin Lj (2012) Antioxidative response of stevia leaves to low temperature treatment. 6th Central European Congress on Food, Abstract book, Jovanka Lević (ur.), Novi Sad, Srbija, 155-155
2. Stević F, Mihaljević M, **Špoljarić D**, Cvijanović V (2009) Floods as a disturbance factor for cyanobacterial bloom in a temperate floodplain lake. 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.), Zagreb, Hrvatsko biološko društvo 1885, Osijek, 121-122
3. **Špoljarić D**, Majić S, Stević F, Ozimec S (2009) Monitoring of meadow populations of two orchid species in the vicinity of Zmajevac (Baranja). 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.), Zagreb, Hrvatsko biološko društvo 1885, Osijek, 137-138
4. Vidaković J, Mihaljević M, Stević F, **Špoljarić D**, Palijan G, Čerba D, Galir A, Cvijanović V (2009) Invasive species in the floodplain waters of Kopački Rit Nature Park. 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik sažetaka, Besendorfer V, Kopjar N, Vidaković-Cifrek Ž, Tkalec M, Bauer N, Lukša Ž (ur.), Zagreb, Hrvatsko biološko društvo 1885, Osijek, 307-308
5. Stević, F, Mihaljević M, **Špoljarić D**, Cvijanović V (2008) Sustaining biodiversity of the Kopački rit Nature Park (Danubian floodplain in Croatia, Europe). Capitalizing on Wetlands International Conference. Washington, D. C., 354-354
6. **Špoljarić D**, Mihaljević M, Stević F, Hackenberger Kutuzović B, Cvijanović V (2008) Planktonic diatoms in a floodplain lake (Kopački Rit Nature Park, Croatia) under extremely high flooding conditions on the River Danube. 20th International Diatom Symposium, Zbornik sažetaka, Jasprica N, Car A, Čalić M (ur.), Sveučilište u Dubrovniku, Dubrovnik, 225-225

7. **Špoljarić D**, Horvatić J, Waeg G, Čipak A, Jaganjac M, Peršić V, Žarković N (2007) HNE produced during the lipid peroxidation process in freshwater green alga (*Chlorella kessleri* FOTT et NOVÁK). Abstracts of the Inter-Domain & Inter-Action COST Meeting "Oxygen, Stress and Lipids", Zbornik sažetaka, Dubrovnik, 37-37