

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Martina Varga

Fiziološki odgovor vrste *Lemna gibba* na djelovanje ionskog koloidnog srebra

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Fiziološki odgovor vrste *Lemna gibba* na djelovanje ionskog koloidnog srebra

Martina Varga

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Zavodu za agroekologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku

Mentor/i: Izv. prof. dr. sc. Janja Horvatić
Doc. dr. sc. Ivna Štolfa

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Vodena leća *Lemna gibba* L. izložena je djelovanju ionskog koloidnog srebra u potpunoj hranjivoj otopini i otopini sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora. Akumulacija srebra u tkivu *L. gibba* u potpunoj hranjivoj otopini uzrokovala je smanjeni rast, apsciziju frondova, narušavanje ravnoteže nutrijenata te oštećenje fotosintetskog sustava. Pojava oksidacijskog stresa u stanicama *L. gibba* ukazuje na neučinkovitost antioksidacijskog odgovora na toksičnost ionskog koloidnog srebra. Akumulacija srebra u stanicama bila je manja u uvjetima smanjenih koncentracija dušika i fosfora. Iako je pri smanjenim koncentracijama dušika i fosfora na 50 i 25% antioksidacijski odgovor vrste *L. gibba* bio bolji, došlo je do pojave oksidacijskog stresa kao posljedice toksičnog djelovanja srebra. Vrsta *L. gibba* bila je najosjetljivija na djelovanje srebra u hranjivoj otopini s 10% koncentracije dušika i fosfora pri čemu je oksidacijski stres rezultat sinergističkog djelovanja smanjene dostupnosti nutrijenata i akumulacije srebra. Vodena leća *L. gibba* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje štetnog djelovanja metala u uvjetima različitih koncentracija nutrijenata.

Broj stranica: 153

Broj slika: 47

Broj tablica: 22

Broj literaturnih navoda: 240

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Lemna gibba*, srebro, dušik, fosfor, oksidacijski stres, antioksidacijski odgovor

Datum obrane: 10. srpnja 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Prof. dr.sc. Zdenko Lončarić**, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera, predsjednik povjerenstva
2. **Prof. dr. sc. Janja Horvatić**, izvanredna profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, mentor 1 i član
3. **Doc. dr. sc. Ivna Štolfa**, docentica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, mentor 2 i član
4. **Prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek**, izvanredna profesorica Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, član
5. **Prof. dr. sc. Vera Cesar**, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjela za biologiju, član
6. **Prof. dr. sc. Tihana Teklić**, redovita profesorica Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, zamjena

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; 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

Physiological response of *Lemna gibba* exposed to ionic colloidal silver

Martina Varga

Thesis performed at: Plant ecophysiology laboratory of the Department of Biology Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and Department for agroecology of the Faculty of Agriculture in Osijek

Supervisor/s: Janja Horvatić, PhD, Associate Professor

Ivna Štolfa, PhD, Assistant Professor

Short abstract:

Lemna gibba L. plants were treated with ionic colloidal silver in full strength nutrient solution and the solution with decreased nitrogen and phosphorus concentrations. Silver accumulation in plants grown in full strength nutrient solution resulted in inhibition of growth, induction of frond abscission, disruption of cell nutrient balance as well as damage to photosynthetic pigments. Oxidative stress in *L. gibba* cells indicated insufficient antioxidative response to toxic effects of silver. Silver accumulation in tissue was lower when plants were exposed to silver in growth medium with decreased nitrogen and phosphorus concentrations. In plants grown in nutrient solution with 50% and 25% nitrogen and phosphorus concentrations oxidative stress was caused solely by silver toxicity, despite better antioxidative response. *L. gibba* was the most sensitive to silver toxicity in nutrient solution with 10% nitrogen and phosphorus concentrations when oxidative stress resulted from synergistic interaction of decreased nutrient concentrations and silver accumulation. *L. gibba* can be used as a model for further study of harmful metal effects on plants in varying nutrients concentrations.

Number of pages: 153

Number of figures: 47

Number of tables: 22

Number of references: 240

Original in: Croatian

Key words: *Lemna gibba*, silver, nitrogen, phosphorus, oxidative stress, antioxidative response

Date of the thesis defense: 10. July 2015.

Reviewers:

1. **Zdenko Lončarić**, PhD, Full Professor, Faculty of Agriculture, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, commission president
2. **Janja Horvatić**, PhD, Associate Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, supervisor 1 and member
3. **Ivna Štolfa**, PhD, Assistant Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, supervisor 2 and member
4. **Željka Vidaković-Cifrek**, PhD, Associate Professor, Faculty of Science, University of Zagreb, member
5. **Vera Cesar**, PhD, Full Professor, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology, member
6. **Tihana Teklić**, PhD, Full Professor, Faculty of Agriculture, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, substitute

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za Biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Zavodu za agroekologiju Poljoprivrednog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u sklopu projekta „Nutrijenti i razvoj plutajućih makrofita i algi u Istočnoj Hrvatskoj“ (285-0000000-3175) voditeljice izv. prof. dr. sc. Janje Horvatić.

Zahvala

Najiskrenije se zahvaljujem mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Janji Horvatić i doc. dr. sc. Ivni Štolfa na stručnoj pomoći prilikom odabira teme i brojnim savjetima kojima su me usmjeravale tijekom mog znanstveno-istraživačkog rada. Hvala na ukazanom povjerenju, prenesenom znanju i iskustvima, te vremenu i strpljenju koje ste mi posvetile tijekom izrade i pisanja ove disertacije.

Hvala profesorici Horvatić na ukazanom povjerenju tijekom mog zaposlenja, zatim na svim idejama i danim savjetima, na nesebično prenesenom znanju i iskustvu te pomoći posebno u pismenom znanstvenom izražavanju.

Posebno hvala Ivni, koja je uložila mnogo vremena i truda u ovaj rad kao i u mene tijekom zajedničkog rada. Najiskrenije ti se zahvaljujem na podršci, razumijevanju i poticajima u trenutcima kada sam sama mislila da više ne mogu. Najviše i od srca ti hvala na pruženom prijateljstvu!

Zahvaljujem se i članovima povjerenstva za ocjenu i obranu ove doktorske disertacije.

Hvala prof. dr. sc. Zdenku Lončariću na zanimanju i čitanju rada. Veliko hvala upućujem i članovima njegovog tima u Zavodu za agroekologiju Poljoprivrednog fakulteta na pomoći i savjetima tijekom vremena koje sam provela s njima.

Zahvalnost upućujem i prof. dr. sc. Željki Vidaković-Cifrek na čitanju disertacije, pomoći i vrijednim savjetima.

Zahvaljujem se i prof. dr. sc. Veri Cesar na susretljivosti i pomoći, čitanju rada i korisnim savjetima.

Hvala kolegicama iz Labosa koje su, svaka na svoj način doprinjele mom radu. Najveću zahvalnost upućujem našoj Veri Tikas koje mi je bezuvijetno bila spremna pomoći u svakom trenutku tijekom eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se svim dragim kolegama s Odjela za biologiju na prijateljstvu i podršci.

Veliko hvala svim članovima moje obitelji i dragim prijateljima na podršci, ohrabrirvanju i razumijavanju. Svi ste kroz svoje nesebično prijateljstvo ugradili dio sebe u ovaj rad.

Najveću zahvalnost upućujem mom Ivanu, mojoj stijeni i mirnoj luci. Hvala ti što si uvijek bio uz mene, imao beskrajno puno strpljanja, hrabrio me i poticao.

Martina

POPIS KRATICA

AA	engl. <i>ascorbic acid</i> – askorbinska kiselina
AgNP	engl. <i>silver nanoparticles</i> – nanočestice srebra
ANOVA	engl. analysis of variance – analiza varijance
APX	engl. <i>ascorbate peroxidase</i> – askorbat-peroksidaza
ATP	adenozin-5'-trifosfat
BSA	engl. <i>bovine serum albumine</i> – albumin govedeg seruma
Car	engl. <i>carotenoids</i> – karotenoidi
CAT	engl. <i>catalase</i> - katalaza
Chla	engl. <i>chlorophyll a</i> – klorofila <i>a</i>
Chlb	engl. <i>chlorophyll b</i> – klorofila <i>b</i>
Chla/Chlb	omjer klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i>
DHA	dehidroaskorbat
DHAR	engl. <i>dehydroascorbate reductase</i> – dehidroaskorbat-reduktaza
DNA	deoskiribonukleinska kiselina
FA	engl. <i>frond abscission</i> – apscizija frondova
GPOX	engl. <i>guaiacol peroxidase</i> – gvajakol peroksidaza
GR	engl. <i>glutathione reductase</i> – glutation reduktaza
GSH	reducirani oblik glutationa
GSSG	oksidirani oblik glutationa
GST	engl. <i>glutathione S-transferase</i> – glutation-S-transferaza
GTP	gvanozintrifosfat
LHC	engl. <i>light harvesting complex</i> – kompleksi za prikupljanje svjetlosti
LSD	engl. <i>least significant difference</i> – test najmanje značajne razlike
MDHA	monodehidroaskorbat
MDHAR	engl. <i>monodehydroascorbate reductase</i> – monodehidroaskorbat-reduktaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PHE	engl. <i>phenolics</i> – ukupni fenoli
PUFA	engl. <i>polyunsaturated fatty acids</i> – višestruko nezasićene masne kiseline
RNA	ribonukleinska kiselina
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove tvari
SOD	engl. <i>superoxide dismutase</i> – superoksid-dismutaza
TBARS	engl. <i>thiobarbituric acid reactive substances</i> – supstance koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom
Tukey HSD	engl. Tukey's honestly significant difference – Tukeyev test značajnosti
UTP	uridintrifosfat

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Pregled literature	3
1.1.1. Biljke i stres	3
1.1.2. Oksidacijski stres u biljnim stanicama	4
1.1.3. Komponente antioksidacijskog odgovora	10
1.1.3.1. Enzimski antioksidansi	11
1.1.3.2. Neenzimski antioksidansi	14
1.1.4. Nutrijenti u biljci	18
1.1.4.1. Dušik	22
1.1.4.2. Fosfor	26
1.1.5. Srebro u vodenim ekosustavima i njegov značaj za biljke	28
1.1.6. Značajke vrste <i>Lemna gibba</i> L.	30
1.2. Ciljevi istraživanja i hipoteze	33
2. MATERIJAL I METODE	34
2.1. Kultura vodene leće <i>Lemna gibba</i>	34
2.2. Određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodenu leću u potpunoj hranjivoj otopini.....	35
2.3. Određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodenu leću u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P	35
2.4. Prirast broja biljaka	36
2.5. Prirast svježe mase biljaka.....	37
2.6. Apscizija frondova	37
2.7. Određivanje koncentracije proteina	38
2.8. Određivanje koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	39
2.9. Komponente antioksidacijskog odgovora	40
2.9.1. Enzimski antioksidansi	40
2.9.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze	40
2.9.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze	41
2.9.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze	41
2.9.1.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze	41
2.9.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze	42
2.9.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze	42
2.9.2. Neenzimski antioksidansi.....	43
2.9.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih karotenoida.....	43
2.9.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola	43
2.9.2.3. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline	44
2.9.3. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti	44
2.10. Određivanje koncentracije vodikovog peroksida	45
2.11. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije.....	46

2.12. Određivanje mineralnog sastava tkiva vodene leće	46
2.13. Statistička obrada	47
3. REZULTATI	49
3.1. Prirast broja biljaka	49
3.2. Prirast svježe mase biljaka	52
3.3. Apscizija frondova	54
3.4. Koncentracija proteina	56
3.5. Koncentracije klorofila <i>a</i> i klorofila <i>b</i>	60
3.6. Omjer klorofil <i>a</i>/klorofil <i>b</i>	68
3.7. Komponente antioksidacijskog odgovora	71
3.7.1. Enzimski antioksidansi	71
3.7.1.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze	71
3.7.1.2. Aktivnost gvajakol-peroksidaze	75
3.7.1.3. Aktivnost katalaze	79
3.7.1.4. Aktivnost glutation-reduktaze	83
3.7.1.5. Aktivnost glutation-S-transferaze	87
3.7.1.6. Aktivnost superoksid-dismutaze	91
3.7.2. Neenzimski antioksidansi	95
3.7.2.1. Koncentracija ukupnih karotenoida	95
3.7.2.2. Koncentracija ukupnih topljivih fenola	99
3.7.2.3. Koncentracija askorbinske kiseline	103
3.7.3. Ukupna antioksidacijska aktivnost	107
3.8. Koncentracija vodikovog peroksida	111
3.9. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije	115
3.10. Mineralni sastav tkiva vodene leće	119
3.10.1. Koncentracija srebra u tkivu <i>L. gibba</i>	119
3.10.2. Koncentracija željeza, magnezija i kalija u tkivu <i>L. gibba</i>	119
4. RASPRAVA	121
5. ZAKLJUČCI	132
6. LITERATURA	134
7. SAŽETAK	148
8. SUMMARY	150
9. ŽIVOTOPIS	152

1. Uvod

1. Uvod

Biljke su zbog svog načina života često i kroz različite periode trajanja izložene širokom rasponu stresnih čimbenika. Glavni okolišni čimbenici koji djeluju na biljke su abiotički u koje se ubraja suša, salinitet, visoke i niske temperature, promjene u koncentraciji i dostupnosti nutrijenata, visok intenzitet svjetlosti, zasjeana, ozon; i biotički čimbenici u koje se ubrajaju infekcije bakterijama, gljivama, virusima i nematodama te biljojedi (Suzuki i sur., 2014). Uz abiotičke i biotičke čimbenike, na biljke često djeluju kemijski onečišćivači zraka, pesticidi i toksini koji u okoliš dospjevaju kao posljedica antropogenih aktivnosti (Gaspar i sur., 2002).

Srebro je neesencijalni element za žive organizme i jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima (Fisher i sur., 1984). Unutar stanice stvara komplekse s aminokiselinama i nukleotidima, oštećuje fotosintetski aparat te inhibira staničnu diobu (Fortin i Campbell, 2001; Xu i sur., 2010). Kao posljedica štetnog djelovanja srebra na transportni lanac elektrona i enzime koji su važni u procesu staničnog disanja, dolazi do prekomjerne akumulacije reaktivnih kisikovih čestica (engl. reactive oxygen species, ROS) te pojave oksidacijskog stresa (Chudobova i sur., 2013). Mala količina ROS-a nastaje kao posljedica aerobnog metabolizma dok u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa nastaju veće koncentracije koje mogu djelovati fitotoksično ali i aktivirati obrambeni odgovor biljaka i prilagodbu na oksidacijski stres (Dat i sur., 2000). Prekomjerna akumulacija ROS-a u stanicama dovodi do oštećenja DNA, proteina i lipida (Gill i Tuteja, 2010). Kako bi se zaštitile biljke su razvile vrlo djelotvorne mehanizme uklanjanja ROS-a na mjestu njihova nastanka te sprječavanja štetnih oksidacijskih reakcija (Mittler, 2002). Stanični antioksidacijskih sustav sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti koji ili direktno uklanjaju i/ili obnavljaju oksidirane molekule (Karuppanapandian i sur., 2011).

Nasuprot kontroliranim laboratorijskim uvjetima koji osiguravaju maksimalan rast biljaka, u prirodi su biljke izložene suboptimalnim uvjetima i često kombinaciji dvaju ili više stresnih čimbenika koji djeluju u istom trenutku (Rizhsky i sur., 2002). Iako postoji određeni stupanj preklapanja, svaki stresni čimbenik pojedinačno izaziva jedinstveni mehanizam odgovora, dok svaka kombinacija dvaju ili više čimbenika zahtjeva jedinstveni specifični odgovor biljke (Alameda i sur., 2012). Na biljke u vodenim ekosustavima osim kombinacije različitih prirodnih stresnih čimbenika djeluje i kemijski stres uzrokovan različitim tvarima koji u okoliš dospjevaju kao rezultat antropogenih aktivnosti (Holmstrup i sur., 2010). Promjene okolišnih uvjeta mogu mijenjati utjecaj kemijskih čimbenika na organizme. Uz toksične koncentracije

metala u vodenim ekosustavima biljke su često izložene uvjetima promjenjive dostupnosti nutrijenata što utječe na njihov normalni rast i razvoj (Polesskaya i sur., 2004). Makronutrijenti, kao dušik i fosfor, imaju i strukturalne i funkcionalne uloge te sudjeluju u složenom sustavu regulacije zdravog fiziološkog stanja organizma (Tewari i sur., 2004).

Mali broj istraživanja posvećen je fiziološkim promjenama i pojavi oksidacijskog stresa u vodenim biljkama koje su izložene kombiniranom djelovanju promjenjivih koncentracija nutrijenata i srebra. Povećane koncentracije nutrijenata u vodi mogu uzrokovati povećanje biomase biljaka, što za posljedicu može imati razrjeđenje toksikanta te smanjenje toksičnog učinka. S druge strane, niske razine nutrijenata mogu povećati toksičnost zbog dodatnog stresa uslijed manjka nutrijenata (Koelmans i sur., 2001). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je utvrditi uzrokuje li srebro, kao jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima, fiziološke promjene i oksidacijski stres u stanicama vodene leće, *Lemna gibba* L., posljedično povećano stvaranje ROS-a, oštećenje proteina, fotosintetskih pigmenata i staničnih membrana te odgovarajući antioksidacijski odgovor. Cilj je također bio i utvrditi utjecaj smanjenih koncentracija dušika i fosfora u hranjivoj otopini na fiziološki odgovor u stanicama *L. gibba* na štetno djelovanje ionskog koloidnog srebra.

Zbog svoje važnosti u vodenim ekosustavima i lakog uzgajanja u laboratoriju, vodene leće često se koriste kao predstavnici primarnih producenata za testiranje štetnog djelovanja različitih toksičnih tvari te njihovih smjesa. S obzirom da su vrste roda *Lemna* važna komponenta u hranidbenoj mreži vodenih ekosustava te da imaju veliki potencijal asimilacije različitih tvari predstavljaju važno mjesto ulaska toksikanata u biosferu (Mkandawire i Dudel, 2007). Vodene leće imaju niz osobina koje ih čine prikladnim za laboratorijska istraživanja štetnog djelovanja srebra uz smanjenje koncentracija dostupnih makronutrijenata dušika i fosfora.

1.1. Pregled literature

1.1.1. Biljke i stres

Biljke su zbog svog načina života kontinuirano izložene širokom rasponu stresnih čimbenika. U biljnoj fiziologiji i ekologiji stres je pojam koji je teško definirati s obzirom da određeni biološki uvjeti za neku biljku mogu biti stresni, dok su za drugu optimalni za rast. Pojam stres najčešće se definira kao bilo koji faktor koji pozitivno ili negativno mijenja funkcioniranje, rast i razmnožavanje biljke. Glavni abiotički faktori koji djeluju na biljke uključuju sušu, salinitet, visoke i niske temperature, promjene u koncentraciji i dostupnosti nutrijenata, visok intenzitet svjetlosti, zasljenost i ozon (Suzuki i sur., 2014). U kemijske čimbenike stresa ubrajaju se onečišćivači zraka, pesticidi i toksini koji u okoliš dospijevaju kao posljedica antropogenih aktivnosti (Gaspar i sur., 2002). Uz abiotičke čimbenike, biljke su izložene i biotičkim čimbenicima kao što su infekcije patogena (bakterije, gljive, virusi i nematode) i biljojedi (Atkinson i Urwin, 2012).

Odgovor biljke na stres složen je proces koji uključuje brojne gene i različite biokemijske i molekularne mehanizme. Prisutnost stresnih čimbenika prvo primjećuju receptori plazmatskih membrana (Gaspar i sur., 2002). Prijenos signala nizvodno dovodi do stvaranja sekundarnih prijenosnika kao što su inozitol fosfat, kalcijevi ioni (Ca^{2+}) i reaktivne kisikove tvari (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Promjenu razine Ca^{2+} u stanici uočavaju kalcij vezujući proteini odnosno kalcijevi senzori. Oni uočavaju nedostatak enzimske aktivnosti i mijenjaju konformaciju enzima u kalcij ovisnom putu. Proteinski senzori, potičući fosforilacijske kaskade povećavaju početni signal i ciljaju važne gene u odgovoru na stres ili transkripcijske faktore koji su uključeni u kontrolu tih gena. Geni koji sudjeluju u mehanizmima otpornosti na stres uključeni su u signalne kaskade i kontrolu transkripcije, zatim zaštitu biomembrana i proteina te primanje vode i iona. Svi ovi geni sudjeluju u mehanizmima koji osiguravaju održavanje homeostaze, zaštite i popravka oštećenih makromolekula i biomembrana. Produkti gena konačno vode prema prilagodbi biljaka na nepovoljne stresne uvjete. Neodgovarajuća reakcija u signalizaciji i aktivaciji gena može nepovratno oštetiti proteine i membrane te dovesti do stanične smrti (Gaspar i sur., 2002; Wang i sur., 2003).

Za razliku od kontroliranih laboratorijskih uvjeta koji osiguravaju maksimalan rast biljaka, u prirodnom okolišu biljke su izložene suboptimalnim uvjetima i često kombinaciji dvaju ili više stresnih čimbenika koji djeluju u istom trenutku (Rizhsky i sur., 2002). Provedena su brojna istraživanja odgovora biljaka na kombinaciju dvaju i više stresnih čimbenika (Alameda i sur.,

2012; Atkinson i Urwin, 2012; Kasurinen i sur., 2012; Mittler, 2006; Mittler i Blumwald, 2010; Srivastava i sur., 2012; Rivero i sur., 2013). Rezultati tih istraživanja pokazali su da iako postoji određeni stupanj preklapanja, svaki stresni čimbenik pojedinačno izaziva jedinstveni mehanizam odgovora, dok svaka kombinacija dvaju ili više čimbenika zahtijeva jedinstveni specifični odgovor biljke. Istovremeno djelovanje abiotičkih i biotičkih čimbenika izaziva visoki stupanj kompleksnosti odgovora, s obzirom da su odgovori na ove čimbenike kontrolirani različitim signalnim putevima koji se mogu međusobno pojačati ili inhibirati (Mittler, 2006; Atkinson i Urwin, 2012). Metabolički i signalni putevi odgovora biljaka na kombinaciju stresnih uvjeta koji uključuju transkripcijske faktore, fotosintezu, antioksidacijske mehanizme, hormonsku signalizaciju i sintezu osmolita do danas nisu potpuno istraženi (Atkinson i sur., 2013; Rasmussen i sur., 2013).

Neke kombinacije stresnih čimbenika mogu djelovati povoljno na biljku u usporedbi s djelovanjem svakog čimbenika posebno (Suzuki i sur., 2014). Na primjer, suša dovodi do smanjenja provodljivosti puči što povećava otpornost biljke na štetno djelovanje ozona (Löw i sur., 2006). Djelovanje ozona na biljke dovodi do pojave kloroze i malih nekrotičnih lezija na listovima, dok suša uzrokuje uvenuće cijelih listova i pojavu kloroze (Iyer i sur., 2013). Međutim, kombiniranim djelovanjem suše i ozona primijećeno je značajno smanjenje simptoma uzrokovanih djelovanjem suše i ozona zasebno (Suzuki i sur., 2014).

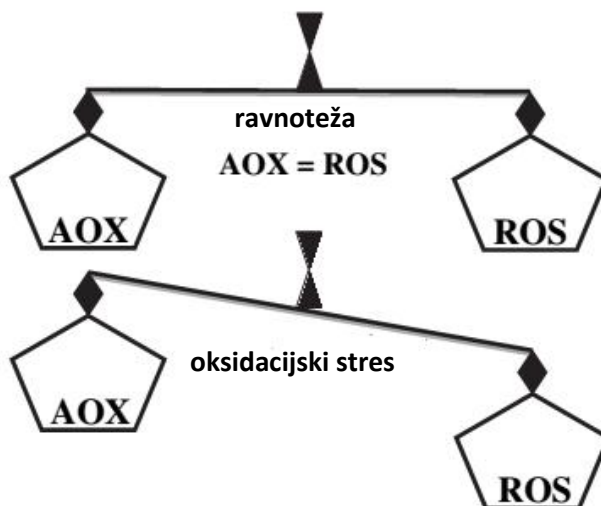
Kombinirano djelovanje solnog stresa i visoke temperature omogućava bolju zaštitu biljke od solnog stresa primijenjenog zasebno (Rivero i sur., 2013). Nakupljanje glicinbetaina moglo bi imati važnu ulogu u specifičnom odgovoru biljaka na kombinirani utjecaj solnog stresa i visoke temperature (Suzuki i sur., 2014). Također, u biljaka tretiranih sušom u kombinaciji s visokom temperaturom zabilježena je manja akumulacija vodikovog peroksida (H_2O_2) i manja stopa oksidacije proteina što sugerira da se bolja zaštita biljke u kombinaciji ova dva stresa barem djelomično može pripisati inhibiciji oksidacijskog stresa (Suzuki i sur., 2014).

1.1.2. Oksidacijski stres u biljnim stanicama

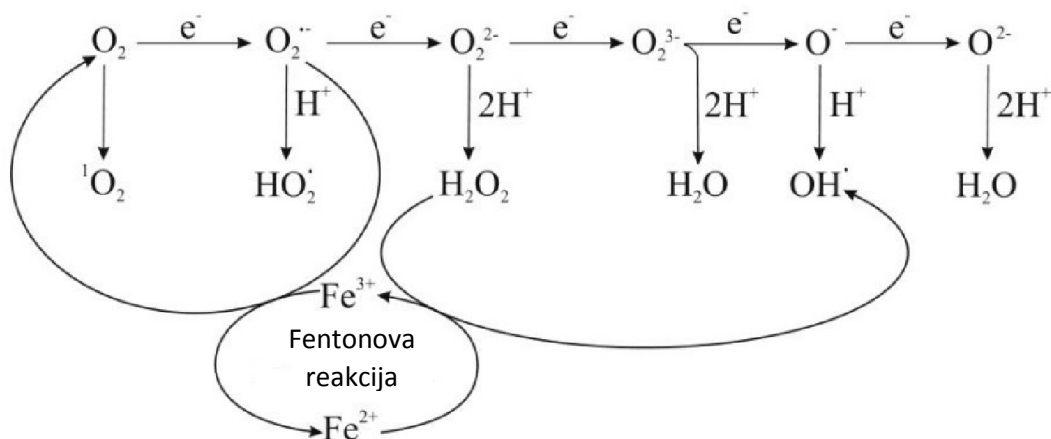
Većina je biljaka tijekom životnog ciklusa izložena nekom obliku stresa koji utječe na funkcioniranje i preživljavanje individualne biljke. S obzirom da biljke imaju ograničene mogućnosti izbjegavanja stresa razvile su sustav prilagodbe na promjenjive okolišne uvjete (Arora i sur., 2002). Zajednička osobina različitih stresnih čimbenika je njihov potencijal da

uzrokuju porast produkcije ROS-a u stanicama. Pojam ROS obuhvaća spojeve koji sadrže jedan ili više aktiviranih atoma kisika (O) ali ne moraju nužno biti radikali. Slobodni radikali su spojevi koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i ne moraju sadržavati kisik (Demidchik, 2015). ROS su produkti normalnog metabolizma stanica, međutim u uvjetima stresa narušena je ravnoteža između nastajanja i uklanjanja ROS-a (Apel i Hirt, 2004; Karuppanapandian i sur., 2011). Nemogućnost organizma da održava ravnotežu između nastanka i uklanjanja ROS-a rezultira nastankom oksidacijskog stresa (*Slika 1*). Izraz oksidacijski stres ima nekoliko značenja: (1) fiziološko stanje u kojem proces gubitka elektrona (oksidacija) prevlada proces primanja elektrona (redukcija) što dovodi do kemijskog oštećenja spojeva u stanici; (2) strasni čimbenik, kao i salinitet, suša i drugi, koji oštećuje stanice i pokreće signalne i obrambene reakcije (Demidchik, 2015).

Akumulacija molekularnog kisika (O_2) u Zemljinoj atmosferi omogućila je aerobnim organizmima upotrebu O_2 kao konačnog akceptora elektrona tijekom staničnog disanja, što producira više energije u odnosu na fermentaciju (Dismukes i sur., 2001). U svom osnovnom stanju, O_2 je relativno inertna molekula. Tijekom normalne metaboličke aktivnosti i kao posljedica poremećaja u okolišnim uvjetima O_2 iz inertne molekule može prijeći u različita reaktivna stanja (Mittler i sur., 2004) (*Slika 2*). Kao glavni izvori ROS-a u biljnim stanicama navode se kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi, odnosno organeli u kojima se odvijaju različiti metabolički procesi oksidacije ili je prisutan veliki protok elektrona (Gill i Tuteja, 2010). Pri sunčevoj svjetlosti ili umjetnom osvjetljenju glavni izvor ROS-a su kloroplasti i peroksisomi, dok se mitohondriji smatraju glavnim izvorima ROS-a u tami (Foyer i Noctor, 2003). Glavna mjesta nastanka ROS-a su kompleks I i kompleks III transportnog lanca elektrona u mitohondrijima. Smatra se da se gotovo 2% ukupnog O_2 u mitohondrijima troši na stvaranje H_2O_2 . U normalnom staničnom metabolizmu, O_2 se reducira do H_2O pri čemu kao nusprodukti mogu nastati $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i OH^{\cdot} (Borisova i sur., 2012).



Slika 1. Oksidacijski stres definiran kao pomak u ravnoteži prooksidacijskih i antioksidacijskih reakcija u korist prooksidacijskih reakcija (modificirano prema Gill i Tuteja, 2010).



Slika 2. Metabolički putevi jednovalentne redukcije O_2 do H_2O pri čemu nastaju ROS (modificirano prema Mittler i sur., 2004).

Singletni kisik (1O_2) je prvo pobuđeno stanje kisika i neuobičajen ROS s obzirom da ne nastaje prijenosom elektrona na O_2 . Ekscitacija klorofila fotonima i prijenos energije na tripletno stanje kisika dovodi do nastanka 1O_2 . Smatralo se da je vrijeme života 1O_2 u stanici $\approx 3 \mu s$ te da dio 1O_2 može difundirati u tkivu maksimalno do 190 nm (Asada, 2006; Gill i Tuteja, 2010). Međutim, dodatna istraživanja pokazala su da je 1O_2 u biljnoj stanici stabilniji nego se to prije

smatralo te da može difundirati iz kloroplasta te čak doći do stanične membrane (Ogilby, 2010). Stvaranje $^1\text{O}_2$ tijekom fotosinteze izrazito štetno djeluje na PSI i PSII, ali i na cijeli fotosintetski aparat (Arora i sur., 2002).

Superoksidni radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nastaju prijenosom elektrona na kisik. Primarni akceptori elektrona PSI vezani na tilakoidnim membranama glavno su mjesto stvaranja ovih radikala. Većina $\text{O}_2^{\cdot-}$ *in vivo* nastaje preko reduciranog feredoksina (Fd_{red}) koji reducira O_2 do $\text{O}_2^{\cdot-}$ što je prikazano jednadžbom (1). Smatra se da je $\text{O}_2^{\cdot-}$ prvi oblik ROS-a koji nastaje u biljnim tkivima (Gill i Tuteja, 2010). Umjereno su reaktivni, ali njihovo nastajanje može pokrenuti stvaranje reaktivnijih ROS-a kao što su hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$) i singletni kisik ($^1\text{O}_2$). Protoniranjem $\text{O}_2^{\cdot-}$ na negativno nabijenim staničnim površinama nastaje $\text{HO}_2\cdot$ (Bielski i sur., 1983). Spontanom reakcijom dismutacije $\text{O}_2^{\cdot-}$ nastaje H_2O_2 (2). Reakcija dismutacije značajno je ubrzana u prisustvu enzima superoksid dismutaze (SOD). Nadalje, $\text{O}_2^{\cdot-}$ može donirati elektron ionu željeza (Fe^{3+}) pri čemu nastaje Fe^{2+} . Nastali Fe^{2+} može reducirati H_2O_2 , nastao dismutacijom $\text{O}_2^{\cdot-}$, pri čemu nastaje $\text{OH}\cdot$. Reakcija u kojoj $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 i željezo brzo generiraju $\text{OH}\cdot$, naziva se Haber-Weiss-ova reakcija (3 i 4) a posljednji korak koji uključuje oksidaciju Fe^{2+} uz H_2O_2 naziva se Fentonova reakcija (4).



Vodikov peroksid (H_2O_2) je najstabilniji ROS s fiziološkom funkcijom u stanicama (Apel i Hirt, 2004; Foyer i Noctor, 2009). Tijekom normalnog metabolizma H_2O_2 nastaje Mehler-ovom reakcijom u kloroplastima, prijenosom elektrona u mitohondrijima i fotorespiracijom u peroksisomima, a stresni čimbenici potiču stvaranje veće količine H_2O_2 . Vodikov peroksid može nastati i enzimskim reakcijama, npr. aktivnošću NADPH-oksidge lokalizirane u plazmatskoj membrani, peroksidaznom aktivnošću u staničnoj stijenci ili aktivnošću drugih oksidaza (ksantin-oksidge i amin-oksidge) (Apel i Hirt, 2004). H_2O_2 slobodno difundira u stanicama, a prijenos iz apoplasta može biti olakšan prolaskom kroz membranske kanale peroksi-porine (Neill i sur., 2002). Također, i akvaporini mogu služiti za prijenos H_2O_2 (Henzler i Steudle, 2000; Borisova i sur., 2012). U stanici, H_2O_2 ima dvojaku ulogu: pri niskim

koncentracijama djeluje kao signalna molekula u procesu pokretanja mehanizama prilagodbe i otpornosti na brojne biotičke i abiotičke stresne čimbenike, dok pri višim koncentracijama dovodi do programirane smrti stanica (Quan i sur., 2008). Također, H_2O_2 je glavni regulator u brojnim fiziološkim procesima kao što su senescencija (Peng i sur., 2005), fotorespiracija i fotosinteza (Noctor i Foyer, 1998), stomatalno kretanje (Bright i sur., 2006), stanični ciklus (Mittler i sur., 2004) te rast i razvoj (Foreman i sur., 2003).

Hidroksilni radikali ($\text{OH}\cdot$) ubrajaju se u najreaktivnije kemijske vrste tj. najsnažnije oksidanse. U prisutnosti odgovarajućeg prijelaznog metala, posebno Fe^{2+} i Fe^{3+} , $\text{OH}\cdot$ mogu nastati reakcijom $\text{O}_2\cdot^-$ i H_2O_2 (4). Ione Fe u određenim uvjetima mogu zamijeniti ioni bakra, Cu^+ i Cu^{2+} . Hidroksilni radikali potencijalno mogu reagirati sa svim biološkim molekulama, kao što su DNA, proteini, lipidi i gotovo svim građevnim jedinicama stanične stijenke (Gill i Tuteja, 2010; Demidchik, 2015). Do sada još nije otkriven specifični antioksidans koji bi uklanjao ove radikale. S obzirom na nepostojanje antioksidacijskog mehanizma uklanjanja, povećano nakupljanje $\text{OH}\cdot$ u konačnici dovodi do stanične smrti (Vranova i sur., 2002).

Najštetnija posljedica prekomjernog nakupljanja ROS-a u stanicama svih živih organizama je proces peroksidacije membranskih lipida. Peroksidacija lipida staničnih membrana i membrana organela, događa se kada razina ROS-a u stanici prijeđe fiziološku granicu pri čemu, ne samo da utječe na normalno funkcioniranje stanica, nego i produbljuje oksidacijski stres stvaranjem lipidnih radikala (Farmer i Mueller, 2013; Gill i Tuteja, 2010). Prekursori za stvaranje produkata lipidne peroksidacije su polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (Demidchik, 2015). Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija (Farmer i Mueller, 2013). Inicijaciju mogu potaknuti H_2O_2 i $\text{O}_2\cdot^-$ te $\text{OH}\cdot$ uz sudjelovanje kompleksa prijelaznih metala posebno Fe i Cu. S obzirom da je $\text{OH}\cdot$ dovoljno aktivan, inicijacija peroksidacije lipida uglavnom započinje u prisustvu ovog radikala, odvajanjem atoma vodika od molekule prekursora (PUFA) pri čemu nastaje organski radikal ($\text{R}\cdot$) i voda (5). U aerobnim uvjetima, kisik reagira s lipidnim radikalima pri čemu nastaju peroksilni radikali ($\text{ROO}\cdot$) (6). $\text{ROO}\cdot$ potiču lančanu reakciju peroksidacije odvajanjem vodika iz susjednih molekula lipida (PUFA) pri čemu nastaju drugi organski radikali (propagacija) (7). Nastali lipidni hidroperoksidi mogu se lako prevesti u različite tipove ROS-a: lipidne alkoksilne radikale, epoksidge, aldehide kao što je primjerice MDA i alkohole (8). Dakle jedno polazno mjesto reakcije (jedna inicijacija) ima potencijal stvaranja višestrukih radikala u procesu lančane reakcije propagacije (Gill i Tuteja, 2010). Međusobnom reakcijom radikala nastaju

stabilni produkti koji ne mogu nastaviti proces propagacije lančanih reakcija peroksidacije (terminacija) (9, 10, 11).

INICIJACIJA

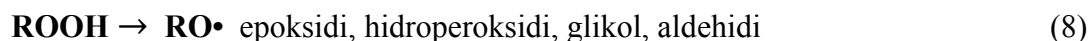


lipid lipidni alkilni radikal

PROPAGACIJA



lipidni peoksilni radikal



TERMINACIJA



dimer masnih kiselina



most dimera peroksida



most dimera peroksida

Posljedice peroksidacije lipida su smanjenje fluidnosti membrana, povećana propusnost membrana za molekule čiji prijenos u normalnim uvjetima nije moguć bez prisutnosti specifičnih kanala, oštećenje membranskih proteina, inaktivacija enzima, receptora i ionskih kanala (Gill i Tuteja, 2010; Demidchik, 2015).

1.1.3. Komponente antioksidacijskog odgovora

Tijekom normalnog metabolizma stanica nastaju manje količine ROS-a. Kao posljedica djelovanja različitih nepovoljnih okolišnih uvjeta (suša, temperaturni ekstremi, teški metali, nedostatak nutrijenata, onečišćivači zraka, solni stres i dr.) u stanicama nastaju veće koncentracije ROS-a (Demidchik, 2015). ROS djeluju na brojne stanične funkcije oštećujući nukleinske kiseline, oksidiranjem proteina i inicijacijom reakcije lipidne peroksidacije (Cuypers i sur., 2011). Biljke su razvile vrlo djelotvorne mehanizme uklanjanja ROS-a i sprječavanja štetnih oksidacijskih reakcija. Antioksidacijski mehanizmi nisu ograničeni samo na stanične organele kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi, nego su u manjoj mjeri prisutni i u citosolu i apoplastu (Mittler, 2002). Stanični antioksidacijski sustav sastoji se od enzimskih i neenzimskih komponenti (*Tablica 1*). Enzimski antioksidansi uključuju katalazu, askorbat-peroksidazu, gvajakol-peroksidazu, glutation-reduktazu, superoksid-dismutazu, monodehidroaskorbat-reduktazu, dehidroaskorbat-reduktazu, dok su neenzimski antioksidansi glutation i askorbinska kiselina topljivi u vodi te karotenoidi i tokoferoli topljivi u lipidima (Arora i sur., 2002, Karuppanapandian i sur., 2011).

Tablica 1. Prisutnost antioksidacijskih komponenti u različitim odjeljcima u biljnoj stanici (modificirano prema Mittler, 2002).

Uklanjanje	Lokalizacija	ROS
Superoksid-dismutaza	Kloroplast, citoplazma, mitohondrij, peroksisom, apoplast	$O_2^{\bullet-}$
Askorbat-peroksidaza	Kloroplast, citoplazma, mitohondrij, peroksisom, apoplast	H_2O_2
Katalaza	Peroksisom	H_2O_2
Glutation-peroksidaza	Citoplazma	H_2O_2 , ROOH
Peroksidaze	Stanična stijenka, citoplazma, vakuola	H_2O_2
Tioredoxin peroksidaze	Kloroplast, citoplazma, mitohondrij	H_2O_2
Askorbinska kiselina	Kloroplast, citoplazma, mitohondrij, peroksisom, apoplast	H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$
Glutation	Kloroplast, citoplazma, mitohondrij, peroksisom, apoplast	H_2O_2
α -tokoferol	Membrane	ROOH, 1O_2
Karotenoidi	Kloroplast	1O_2

1.1.3.1. Enzimski antioksidansi

Katalaza (engl. *catalase* - CAT, EC 1.11.1.6) ili H₂O₂-oksidoreduktaza je enzim koji je građen od četiri podjedinice, a svaka podjedinica sadrži atom Fe u aktivnom mjestu. Funkcija CAT je uklanjanje H₂O₂ koji nastaje u peroksisomima tijekom β-oksidacije masnih kiselina, fotorespiracije, metabolizma purina ili prilikom pojave oksidacijskog stresa (Mittler, 2002; Vellosillo i sur., 2010). U uvjetima oksidacijskog stresa ovaj enzim predstavlja neizostavnu komponentu obrambenog sustava s obzirom da jedna molekula katalaze može reducirati ≈ 6 milijuna molekula H₂O₂ do vode i kisika u jednoj minuti (Gill i Tuteja, 2010) (12).

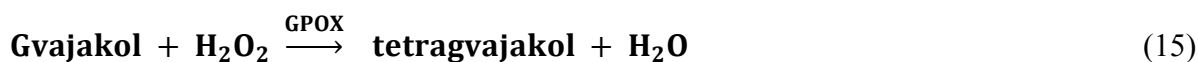


Askorbat-peroksidaza (engl. *ascorbate peroxidase* - APX, EC 1.11.1.11) jedan je od ključnih antioksidacijskih enzima u biljnim stanicama. Sudjeluje u reakcijama uklanjanja H₂O₂ koji nastaje u kloroplastima i citosolu (Karuppanapandian i sur., 2011). U askorbat-glutationskom ciklusu, APX uklanja H₂O₂ koristeći askorbat kao donor elektrona pri čemu nastaje voda i dehidroaskorbat (DHA) (13) (Asada, 2000). APX ima veći afinitet prema H₂O₂ u usporedbi sa CAT (μM raspon koncentracije) ili gvajakol-peroksidaze (mM raspon koncentracije) te stoga ima važniju ulogu u održavanju razine ROS u stanicama tijekom oksidacijskog stresa (Gill i Tuteja, 2010). Povećana ekspresija APX u biljkama zabilježena je u različitim stresnim uvjetima kao što su solni stres (Srivastava i sur., 2005), suša (Sharma i Dubey, 2005), visoke temperature (Koussevitzky i sur., 2008) te štetno djelovanje metala (Caverzan i sur., 2012). U biljnim stanicama prisutno je najmanje pet izoenzima APX: tilakoidne izoforme, izoforme biomembrana glioksisoma, izoforme topljive u stromi kloroplasta i citosolne izoforme (Gill i Tuteja, 2010).



Gvajakol-peroksidaza (engl. *guaiacol peroxidase* - GPOX, EC 1.11.1.7) pripada biljnim peroksidazama skupine III (Mathé i sur., 2010). Osim uloge u antioksidacijskom sustavu, ove peroksidaze uključene su u regulaciju brojnih fizioloških procesa kao što su lignifikacija, suberinizacija, metabolizam stanične stijenke, metabolizam auksina i senescencija (Mathé i sur., 2010). Peroksidaze kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije između H₂O₂ i različitih

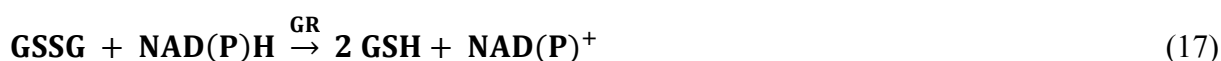
reduktanata (14). Gvajakol-peroksidaza preferira aromatske donore elektrona kao što su gvajakol i pirogallol (Asada, 2000). Oksidacijom gvajakola u prisutnosti H₂O₂ i GPOX nastaje tetragvajakol, spoj žuto-smeđe boje (15).



Superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase* - SOD, EC 1.15.1.1) je metaloprotein prisutan u svim aerobnim organizmima i svim staničnim dijelovima koji su podložni oksidacijskom stresu. Smatra se najučinkovitijim unutarstaničnim enzimskim antioksidansom. SOD uklanja O₂^{•-}, katalizirajući reakciju dismutacije, tako da jednom anionu uzima elektron i predaje ga drugom anionu pri čemu nastaje O₂ i H₂O₂ (16) (Bafana i sur., 2011). Ovom reakcijom nastaje manje reaktivan H₂O₂ koji dalje uklanjaju CAT i POX. Uklanjanjem superoksidnog radikala smanjuje se rizik nastanka izuzetno reaktivnih OH• u metalima kataliziranoj Haber-Weiss-ovoj reakciji (Gill i Tuteja, 2010). Biljne SOD dijele se u tri skupine ovisno o metalnom kofaktoru u aktivnom centru: Fe-SOD lokalizirane u kloroplastima, Mn-SOD u mitohondrijima i Cu/Zn-SOD u kloroplastima, peroksisomima i citosolu (del Rio i sur., 1996). Iako se ove izoforme SOD-a razlikuju u osjetljivosti prema H₂O₂ i KCN, sve tri skupine kodirane su genima u jezgri (Mittler, 2002).



Glutation reduktaza (engl. *glutathione reductase* - GR, EC 1.6.4.2) je flavo-protein oksidoreduktaza. Ovaj enzim pretežno je prisutan u kloroplastima dok se u manjoj mjeri može naći u mitohondrijima i citosolu (Creissen i sur., 1994). Enzim GR važna je komponenta askorbat-glutationskog ciklusa u kojem održava reducirano stanje glutationa (GSH). Glutation je molekula koja sudjeluje u brojnim metaboličkim, regulatornim i antioksidacijskim procesima u biljnoj stanici (Anjum i sur., 2012). Oksidirani glutation (GSSG) sastoji se od dvije molekule GSH koje su povezane disulfidnim mostom. U prisutnosti NAD(P)H enzim GR katalizira reakciju redukcije GSSG u GSH (Gill i Tuteja, 2010; Anjum i sur., 2012) (17).

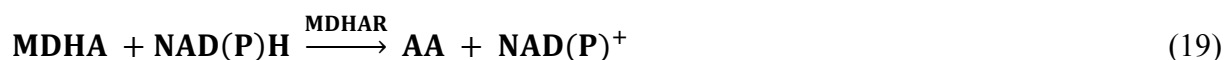


Glutation-S-transferaza (engl. *glutathione S-transferase* - GST, EC 2.5.1.18) enzim je koji pripada u veliku i raznoliku skupinu GSH-ovisnih enzima koji uklanjaju ROS (Anjum i sur., 2012). Uglavnom su smješteni u citosolu (Sheehan i sur., 2001), ali zabilježene su i izoforme lokalizirane u plastidima, jezgri i apoplastu (Gill i Tuteja, 2010). Kataliziraju konjugaciju glutationa s brojnim hidrofobnim i elektrofilnim organskim molekulama u svrhu nastanka manje toksičnih ili netoksičnih peptidnih derivata topljivih u vodi (Frova, 2003) (18). Poznato je da biljne GST sudjeluju u detoksifikaciji herbicida, hormonskoj homeostazi, metabolizmu tirozina, detoksifikaciji H₂O₂, regulaciji apoptoze i odgovoru biljaka na abiotički i biotički stres (Dixon i sur., 2010).



pri čemu H može biti alifatska, aromatska ili heterociklička skupina dok X može biti sulfatna ili nitritna skupina.

Monodehidroaskorbat-reduktaza (engl. *monodehydroascorbate reductase* - MDHAR, EC 1.6.5.4) je enzim prisutan u kloroplastima i citoplazmi. U prisutnosti NAD(P)H kao donora elektrona katalizira redukciju monodehidroaskorbata (MDHA) u askorbat (19). MDHAR, uz APX, sudjeluju i u uklanjanju H₂O₂ u peroksisomima i mitohondrijima (del Rio i sur., 2002).



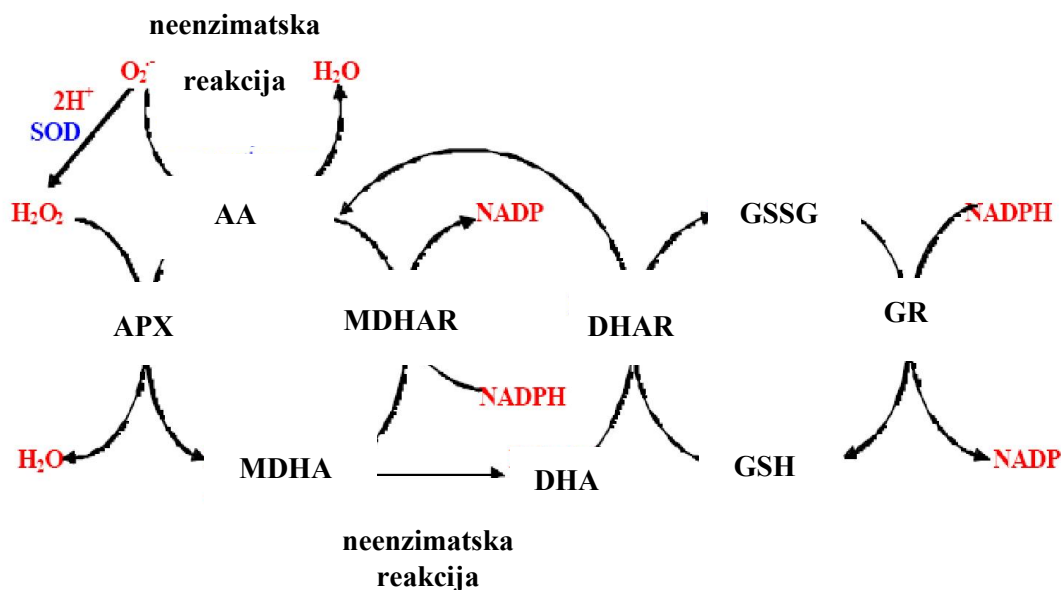
Dehidroaskorbat-reduktaza (engl. *dehydroascorbate reductase* - DHAR, EC 1.8.5.1) ili askorbat-glutation-dehidrogenaza enzim je koji sudjeluje u regeneraciji askorbinske kiseline tako da katalizira redukciju oksidiranog oblika askorbinske kiseline (DHA, dehidroaskorbata) uz glutation kao donor elektrona (20) (Karuppanapandian i sur., 2011).



1.1.3.2. Neenzimski antioksidansi

Askorbinska kiselina (engl. *ascorbic acid* - AA, vitamin C) izuzetno je snažan antioksidans u kloroplastima, mitohondrijima, citoplazmi i vakuoli gdje može direktno reagirati s $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} te sudjelovati u uklanjanju H_2O_2 putem askorbat-glutationskog ciklusa (Smirnoff, 2000). Direktnim uklanjanjem $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} te regeneriranjem α -tokoferola iz tokoferoksil radikala, AA može zaštititi biomembrane od oksidacijskih oštećenja. Velika koncentracija ovog antioksidansa, od 20 do 300 mM, utvrđena je u kloroplastima (Smirnoff, 2000). U biljnim stanicama, mitohondriji imaju važnu ulogu u metabolizmu AA. Osim što sintetiziraju AA pomoću L-galaktono- γ -lakton dehidrogenaze, sudjeluju i u regeneraciji AA iz oksidiranog oblika (Arora i sur., 2002). Askorbinska kiselina ima dva oksidirana oblika DHA i MDHA. MDHA nastaje kao produkt uklanjanja H_2O_2 APX kataliziranom reakcijom u kloroplastima, samom oksidacijom AA u reakcijama s ROS-om ili regeneriranjem α -tokoferola (Smirnoff, 2000). DHA je vrlo nestabilna molekula koja bi se potpuno razgradila ukoliko ne bi bilo povratne reakcije do AA (Gill i Tuteja, 2010). Za održavanje AA u reduciranom obliku potrebna su dva enzima, MDHAR i DHAR. MDHAR kao reducens koristi NAD(P)H dok DHAR kao reducens koristi glutation. U toj reakciji nastaje oksidirani oblik glutationa (GSSG) kojeg u prvobitni oblik vraća enzim GR. Reakcije oksidacije i redukcije askorbata, glutationa i NADPH uz ove enzime čine askorbat-glutationski ili Halliwell-Asada ciklus (*Slika 3*) (Arora i sur., 2002).

Glutation (engl. *glutathione* - GSH; tripeptid γ -glu-cys-gly) je jedan od najvažniji metabolita u biljnoj stanici i jedan od glavnih čimbenika obrambenih mehanizama od oksidacijskih oštećenja uslijed povećane koncentracije ROS-a. Reducirani oblik (GSH) široko je rasprostranjen u biljnim tkivima i lokaliziran u gotovo svim staničnim odjeljcima, citosolu, endoplazmatskom retikulumu, vakuoli, mitohondriju, kloroplastu, peroksisomima (Noctor i Foyer, 1998). GSH ima važnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima kao npr. regulacija transporta sulfata, prijenos signala, konjugacija metabolita, detoksifikacija ksenobiotika (Gill i Tuteja, 2010; Anjum i sur., 2012). Također sudjeluje u brojnim procesima vezanim uz rast i razvoj biljaka, diferencijaciju stanica, regulaciju enzimskih reakcija, kontrolu stanične smrti i senescencije te rezistencije na napad patogena (Rausch i Wachter, 2005; Noctor i sur., 2011). Glutation predstavlja i glavni oblik skladištenja i transporta reduciranog sumpora (Noctor i Foyer, 1998; Anjum i sur., 2012).



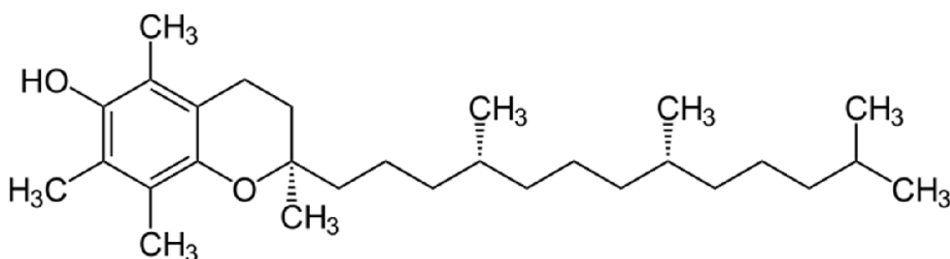
Slika 3. Askorbat-glutationski ciklus (prema Arora i sur., 2002)

(AA- askorbinska kiselina, APX- askorbat-peroksidaza, GSH- reducirani glutation, GSSG- oksidirani glutation, GR- glutation-reduktaza, DHA- dehidroaskorbat, DHAR- dehidroaskorbat-reduktaza, MDHA- monodehidroaskorbat, MDHAR- monodehidroaskorbat-reduktaza).

Sinteza glutationa odvija se u dva koraka ovisna o ATP-u. U prvom koraku, enzim glutamat-cistein-ligaza katalizira formiranje γ -glutamilcisteina, dok u drugom koraku glutation-sintetaza dodaje glicin (Yadav, 2010). Nakon sinteze, GSH je supstrat u brojnim staničnim procesima u kojima nastaje GSSG (Noctor i sur., 2002). Biljne stanice nastoje održati visok omjer GSH/GSSG s obzirom da je GSH važna komponenta u održavanju redoks ravnoteže u stanici (Millar i sur., 2003). Osim toga, GSH je komponenta antioksidacijskog sustava važna za uklanjanje 1O_2 , H_2O_2 i $OH\cdot$ i regeneraciju askorbata u askorbat-glutationskom ciklusu reakcijom koju katalizira DHAR što je prikazano jednadžbom (20) (Anjum i sur., 2012). Askorbat-glutationski ciklus prikazan je na slici 3. GSH je prekursor za fitokelatine koji imaju važnu ulogu u kontroliranju koncentracije teških metala u stanicama (Freeman i sur., 2004).

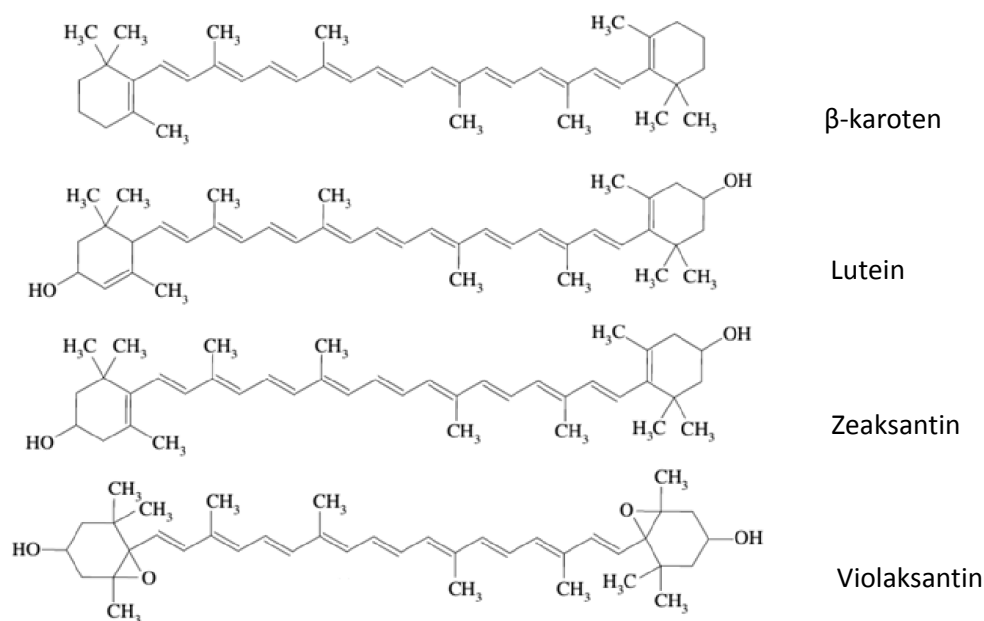
Tokoferoli (engl. *tocopherols*) su značajni antioksidansi topljivi u lipidima. Ubrajaju se u glavne antioksidanse u biomembranama gdje osim antioksidacijske funkcije imaju i važnu

ulogu u održavanju stabilnosti membrane (Hollander-Czytko i sur., 2005). Tokoferoli sudjeluju u uklanjanju $^1\text{O}_2$ i lipidnih radikala sprječavajući propagacijski korak peroksidacije lipida u kloroplastima (Gill i Tuteja, 2010). U biljkama su zastupljena četiri izomera tokoferola, α -, β -, γ -, δ -, od kojih α -tokoferol ima najveću antioksidacijsku aktivnost zbog tri metilne skupine u aromatskom prstenu (Slika 4). Jedna molekula α -tokoferola može ukloniti i do 120 molekula $^1\text{O}_2$ (Munné-Bosch, 2005).



Slika 4. Struktura molekule α -tokoferola (preuzeto od Colombo, 2010)

Karotenoidi (engl. *carotenoids*, Car) su pigmenti topljivi u lipidima, prisutni u stanicama fotosintetski aktivnih ali i neaktivnih biljnih tkiva (Karuppanapandian i sur., 2011). Imaju mnogobrojne uloge u biljkama uključujući i antioksidacijsku (Gill i Tuteja, 2010). Tri glavne funkcije Car u biljnim stanicama su apsorpcija svjetlosti valne duljine između 400 i 500 nm i prijenos do klorofila, gašenje tripletnog stanja klorofila te uklanjanje $^1\text{O}_2$ i drugih slobodnih radikala koji nastaju tijekom fotosinteze, održavanje stabilnosti LHC proteina (eng. *Light Harvesting Complex*) te stabilizacija tilakoidnih membrana (Gill i Tuteja, 2010). U okviru njihovog antioksidacijskog djelovanja, Car mogu zaštititi fotosustav na četiri načina: reagirajući s produktima peroksidacije lipida dovode do terminacije lančane reakcije, uklanjanjem $^1\text{O}_2$ i oslobađanjem energije u obliku topline, reagiranjem s tripletnim stanjem klorofila čime se sprječava nastanak $^1\text{O}_2$ i disipacijom suviška ekscitacijske energije u obliku topline u ksantofilskom ciklusu (Karuppanapandian i sur., 2011). U zaštiti biomembrana utvrđene su sinergističke interakcije Car, tokoferola i AA (Yeum i sur., 2000). Karotenoidi i tokoferoli mogu reagirati s peroksilnim radikalima koji nastaju kao produkt reakcije lipidne peroksidacije (Smirnoff, 2005). Radikal tokoferola regenerira se u tokoferol uz pomoć askorbata uz nastajanje MDHA te se MDHA dalje regenerira do askorbata u reakciji koju katalizira enzim MDHA-reduktaza. Radikal Car može se regenerirati uz pomoć tokoferola i askorbata (Smirnoff, 2005). Ključni karoteni funkcionalnih kloroplasta u viših biljaka su β -karoteni i ksantofili: lutein, violaksantin i neoksantin (Lichtenthaler, 1987) (Slika 5).



Slika 5. Struktura karotenoida

Fenolni spojevi (engl. *phenolic compounds*), uključujući flavonoide, tanine i lignin, pripadaju u raznoliku skupinu sekundarnih metabolita koji su široko rasprostranjeni u biljnim tkivima. Polifenoli imaju idealnu kemijsku strukturu za uklanjanje slobodnih radikala, i pokazali su se kao uspješniji antioksidansi u usporedbi s askorbinskom kiselinom i α -tokoferolom (Karuppanapandian i sur., 2011). Njihova antioksidacijska aktivnost proizlazi iz svojstva elektron donora, sposobnosti stabilizacije nesparenih elektrona te sposobnosti keliranja iona prijelaznih metala što rezultira prekidanjem Fentonove reakcije. Flavonoidi su najaktivnija skupina biljnih sekundarnih metabolita koja neutralizira ROS prije nego oštete stanične strukture (Løvdaal i sur., 2010). Flavonoidi mogu mijenjati kinetiku reakcije peroksidacije modificirajući redoslijed slaganja lipida u membrani. Promjenom redoslijeda lipida smanjuje se fluidnost membrane i onemogućava difuzija ROS-a te daljnje širenje lančane reakcije peroksidacije (Arora i sur., 2000).

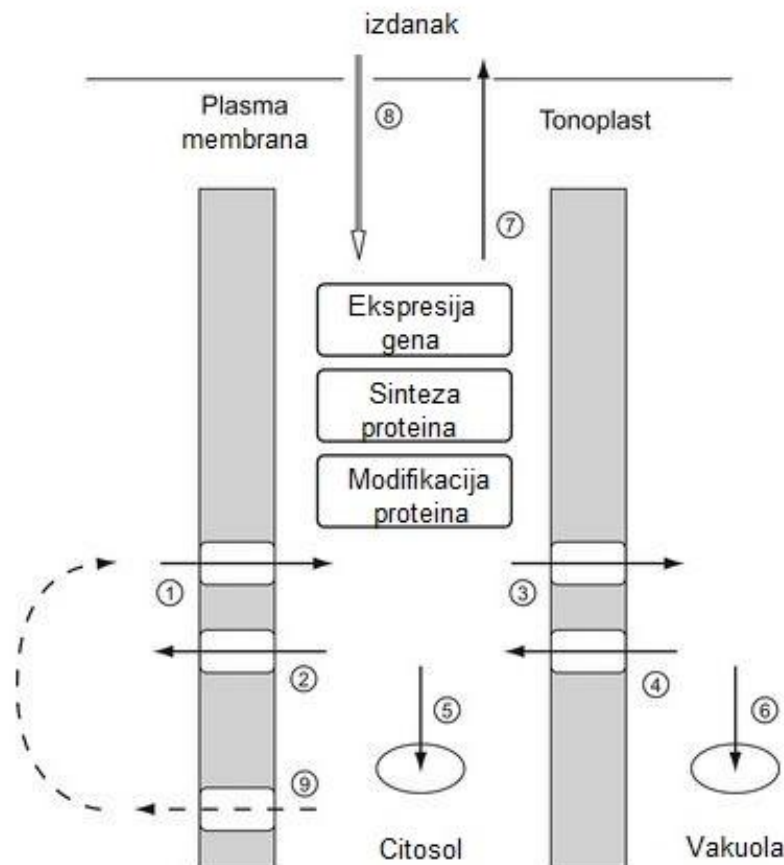
1.1.4. Nutrijenti u biljci

Biljke za potrebe rasta, razvoja i razmnožavanje trebaju određene količine nutrijenata koje primaju iz svoje okoline. Potrebe biljaka za nutrijentima mogu se okvirno procijeniti analizom anorganskog sastava biljnog tkiva (Marschner, 2012). Mineralni sastav biljaka pokazuje velike varijacije i pod utjecajem je nekoliko različitih faktora kao što su genska osnova biljke, kemijski sastav okoline, klimatski uvjeti i starost biljke (Marschner, 2012). Kemijska analiza otkrila je oko 60-ak različitih elemenata koji se pojavljuju u različitim biljnim tkivima. Od tih 60-tak elementa, 17 elemenata je esencijalno za rast i metabolizam biljnih stanica. Esencijalni elementi za biljne stanice su ugljik (C), vodik (H), kisik (O), kalcij (Ca), magnezij (Mg), dušik (N), sumpor (S), fosfor (P), klor (Cl), bor (B), bakar (Cu), željezo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikal (Ni) i cink (Zn) (Marschner, 2012). Mengel i Kirkby (2001) su esencijalne elemente podijelili prema njihovoj biokemijskoj prirodi i fiziološkoj funkciji u četiri skupine (*Tablica 2*). U prvu skupinu ubrajaju se C, H, N, O i S koji su u reduciranom obliku kovalentno vezani u biljnu organsku tvar. Druga skupina obuhvaća P, B i Si koji se pojavljuju u obliku fosfata, borata i silikata. Treću skupinu čine K, Na, Ca, Mg, Mn i Cl, elementi povezani s osmotskom i ionskom ravnotežom u stanicama. Konačno, u posljednju, četvrtu, skupinu ubrajaju se Fe, Zn, Cu i Mo, elementi koji su zastupljeni u metaloproteinima i kelatima.

Proces unosa nutrijenata u biljku brzo se modificira ovisno o promjenama koncentracije nutrijenata u rizosferi (Marscher, 2012). Do brzog smanjenja unosa nutrijenata preko korijena dolazi uslijed naglog povećanja koncentracije nutrijenata u okolini (Britto i Kronzucker, 2006). Također, do smanjenja stope primanja određenog nutrijenta dolazi ukoliko dođe do povećanja njegove koncentracije u citosolu i obrnuto (White i Broadley, 2009). Promjenama ekspresije gena, sinteze i modifikacije proteina kao odgovora na koncentraciju određenog nutrijenta ili metabolita tog nutrijenta u citosolu regulira se unos i izbacivanje nutrijenta preko plazma membrane i tonoplasta, vezanje nutrijenta u kemijske komplekse, provođenje, skladištenje i metabolizam nutrijenta u organelima, transport nutrijenta iz korijena u izdanak i obrnuto (*Slika 6*) (Marscher, 2012).

Tablica 2. Esencijalni elementi za rast i razvoj biljaka prema Mengel i Kirkby (2001).

Skupina	Nutrijent	Unos	Biokemijske funkcije
1	C, H, O, N, S,	CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , H ₂ O, O ₂ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , N ₂ , SO ₄ ⁻ , SO ₂	<ul style="list-style-type: none"> - glavni građevni elementi organskog materijala - esencijalni elementi aktivnih grupa uključenih u enzimске procese - asimilacija oksidacijsko-redukcijskim procesima
2	P, B, Si	anorganski anioni, kiseline	<ul style="list-style-type: none"> - esterifikacija s alkoholnim grupama - fosfatni esteri uključeni su u reakcije prijenosa energije
3	K, Na, Ca, Mg, Mn, Cl	ioni	<ul style="list-style-type: none"> - nespecifične funkcije u održavanju osmotskog potencijala - specifične funkcije u postizanju optimalne konformacije enzima (aktivacija enzima) - kontrola permeabilnosti membrana i elektrokemijskog potencijala.
4	Fe, Cu, Zn, Mo	ioni	<ul style="list-style-type: none"> - sastavni dio prostetičkih grupa enzima - olakšavaju prijenos elektrona mijenjanjem valencije.



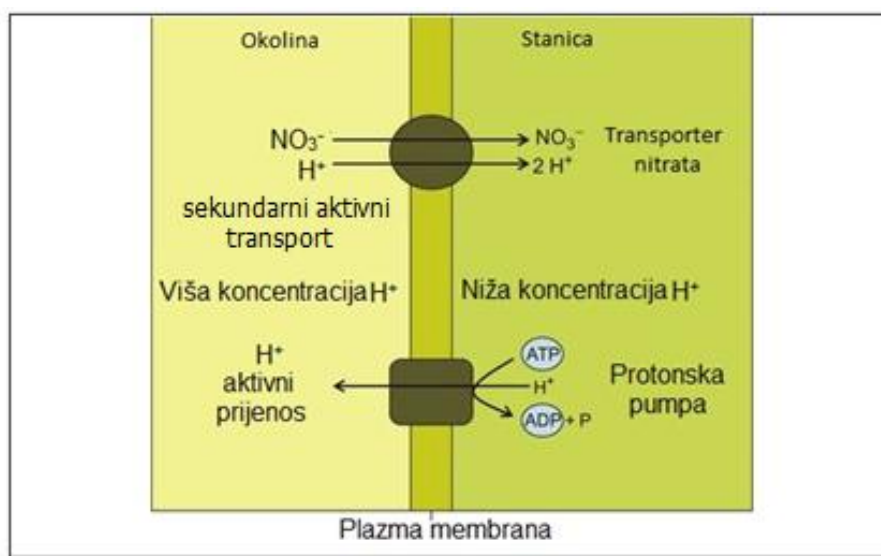
Slika 6. Promjene ekspresije gena, sinteze i modifikacije proteina kao posljedica promijenjene koncentracije određenog nutrijenta ili metabolita tog nutrijenta u citosolu mogu regulirati: (1) unos samog nutrijenata promjenom broja i aktivnosti transportnih proteina u staničnoj membrani; (2) izbacivanje nutrijenta preko plazma membrane prilagodbom broja i aktivnosti transportnih proteina; (3) unos nutrijenata u vakuolu promjenom koncentracije nutrijenta u citosolu te prilagodbom broja i aktivnosti transportnih proteina u tonoplastu; (4) izbacivanje nutrijenta iz vakuole promjenom koncentracije nutrijenta u vakuoli, promjenom broja i aktivnosti transportnih proteina u tonoplastu; (5) vezanje nutrijenta u kemijske komplekse u citosolu, provođenje, skladištenje i metabolizam u organelima što posljedično utječe na koncentraciju nutrijenta i njegovih metabolita u citosolu; (6) vezanje nutrijenta u kemijske komplekse u vakuoli što utječe na mogućnost izlaska nutrijenta iz vakuole; (7) transport nutrijenta iz korijena u izdanak kroz ksilem što utječe na koncentraciju nutrijenta u citosolu; (8) transport nutrijenta iz izdanka u korijen kroz floem što utječe na koncentraciju nutrijenta u citosolu; (9) modifikaciju rizosfere izlučivanjem proteina, enzima i organskih spojeva kako bi se povećala dostupnost nutrijenta za unos (Marscher, 2012).

Stres uzrokovan nutrijentima kompleksan je fenomen do kojeg dolazi u uvjetima niske dostupnosti elementa i u uvjetima prekomjerne koncentracije elemenata (Marscher, 2012). Putevi primanja nutrijenata međusobno su povezani pa promjena u dostupnosti jednog nutrijenta utječe na proces primanja i korištenja drugih elemenata. Na primjer, prisutnost P u prekomjernim koncentracijama uzrokuje smanjenje prirasta biomase zbog nedostatka Fe i Zn (Usha Kumari i Reddy, 2000). Transkripcijske analize odgovora biljaka na dostupnost N pokazale su povezanost procesa primanja N s primanjem S i Fe (Prosser i sur., 2001). Povezanost N i S poznata je već neko vrijeme pri čemu nedostatak jednog elementa ometa metabolizam drugog (Reuveny i sur., 1980; Prosser i sur., 2001). Dodatak N biljkama koje su rasle na niskim koncentracijama dostupnog N dovodi po povećane aktivnost gena za proteine i enzime uključene u proces primanja Fe u stanice. Željezo je potrebno za aktivnost mnogih proteina potrebnih za asimilaciju nitrata, uključujući i nitrat-reduktazu, nitrit-reduktazu i feredoksin (Ohkama-Ohtsu i Wasaki, 2010). Wasaki i sur. (2003) zabilježili su i povezanost primanja P i Fe, te Zn i Al.

Na biljke u vodenim ekosustavima osim kombinacije različitih prirodnih stresnih čimbenika djeluje i kemijski stres uzrokovan različitim organskim spojevima, teškim metalima, pesticidima, herbicidima i drugim tvarima koji u okoliš dospjevaju kao rezultat antropogenih aktivnosti (Holmstrup i sur., 2010). Promjene okolišnih uvjeta mogu mijenjati utjecaj kemijskih čimbenika na organizme. Interakcije okolišnih čimbenika s kemijskim čimbenicima mogu biti sinergističke ili antagonističke. U sinergističkim interakcijama kombinacija dva okolišna čimbenika uzrokuje veći utjecaj nego što je to očekivano u odnosu na utjecaj svakog stresnog čimbenika pojedinačno, dok je u antagonističkim interakcijama kombinirani utjecaj slabiji od očekivanog (Holmstrup i sur., 2010). Fizikalno-kemijska svojstva vode utječu na biodostupnost toksikanata. Na primjer, iste ukupne okolišne koncentracije nekog teškog metala imaju drugačiji utjecaj u različitim uvjetima temperature ili pH vrijednosti okoline (Newman i Unger, 2003). Unos metala u stanice može se smanjiti, povećati ili ostati nepromijenjen ovisno o različitoj dostupnosti nutrijenata (Göthberg i sur., 2004). Visoke koncentracije dostupnih nutrijenata mogu povećati stopu rasta biljaka što može dovesti do razrjeđenja toksikanta u velikoj biomasi (Caldelas i sur., 2009). Göthberg i sur. (2004) istraživali su utjecaj razrjeđenja koncentracije nutrijenata u okolnom mediju na akumulaciju metala u stanicama biljke *Ipomoea aquatica*. Iako akumulacija metala u korijenu nije bila pod utjecajem razrjeđenja nutrijenata, u izdanku je zabilježeno povećanje akumulacije metala sa smanjenom koncentracije dostupnih nutrijenata.

1.1.4.1. Dušik

Dušik (N) je, uz C, biljkama potreban u najvećim količinama. Oko 1-5% ukupne suhe mase biljnog tkiva odnosi se na N kao sastavi dio proteina, nukleinskih kiselina, klorofila, koenzima, fitohormina i sekundarnih metabolita (Marschner, 2012). Biljkama je dostupan u tri različita oblika: elementarni dušik (N_2), nitratni ion (NO_3^-) i amonijev ion (NH_4^+). Atmosferski N_2 dostupan je samo biljkama koje mogu ulaziti u simbiozu s N_2 -fiksirajućim bakterijama. Većina biljaka dakle ovisi o primanju N u drugim oblicima. Glavni izvori anorganskog N su NO_3^- i NH_4^+ koji biljke primaju preko korijena. U okolišu je NO_3^- prisutan u višim koncentracijama (1-5 mM) u odnosu na NH_4^+ (20-200 μM) (Owen i Jones, 2001). Dostupnost izvora N znatno varira u vremenu i prostoru ovisno o pH vrijednosti okoline i aktivnosti mikroorganizama (Robinson, 1994). Biljke su stoga razvile mehanizme prilagođavanja unosa N ovisno o obliku i dostupnosti ovog nutrijenta te o promjenjivim potrebama tijekom životnog ciklusa (Forde, 2002a). U takve mehanizme ubrajamo nekoliko različitih transportnih sustava koji omogućavaju unos N pri različitim okolišnim koncentracijama ali i mogućnost modifikacije arhitekture korijenskog sustava da bi se što bolje iskoristili dostupni izvori (Marschner, 2012).

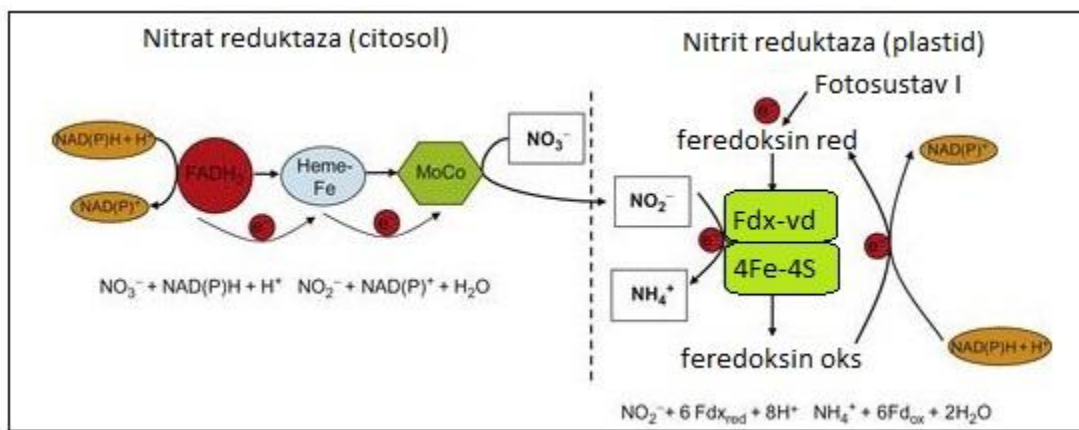


Slika 7. Prijenos NO_3^- preko plazma membrane biljnih stanica (prilagođeno prema Marschner, 2012).

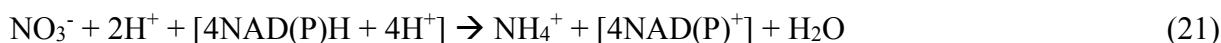
Unos NO_3^- i NH_4^+ posredovan je transportnim sustavima različitih afiniteta koji su lokalizirani u membranama stanica korijena. Transportni sustavi visokog afiniteta djeluju pri niskim vanjskim koncentracijama NO_3^- i NH_4^+ (<0,5 mM). Pri koncentracijama višim od 0,5 mM djeluju sustavi niskog afiniteta koji omogućavaju visoku stopu unosa kada je dostupnost

velika (Marschner, 2012). Neovisno o tipu transportnog sustava, kada je unos NO_3^- u pitanju, važno je naglasiti da je za transport potrebna metabolička energija s obzirom da se unos negativno nabijenog iona odvija preko membrane s negativnim potencijalom i suprotno koncentracijskom gradijentu. Transportni proteini prenose NO_3^- preko membrane stanica korijena u simportu s protonima (Forde, 2002b). Da bi se održao gradijent protona preko plazmatske membrane, H^+ -ATPaza troši ATP (adenozin-5'-trifosfat) (Slika 7) (Marschner, 2012).

Da bi se N iz NO_3^- mogao ugraditi u organske strukture, mora se reducirati do NH_4^+ . Veći dio NH_4^+ , bez obzira potječe li od redukcije NO_3^- ili iz direktnog unosa NH_4^+ , ugrađuje se u organske strukture već u korijenu (Schjoerring i sur., 2002) dok se manji dio prenosi u ostala tkiva (Slika 9). Redukciju NO_3^- do NH_4^+ provode dva enzima: nitrat-reduktaza koja katalizira redukciju NO_3^- do NO_2^- , i nitrit-reduktaza koja transformira NO_2^- do NH_4^+ (Slika 8). Potpuna reakcija redukcije NO_3^- do NH_4^+ je prikazana jednadžbom br. 21. Nitrat-reduktaza je enzim lokaliziran u citosolu i građen od dvije identične podjedinice. Svaka podjedinica ima tri kofaktora kovalentno vezana za specifične domene. Tri kofaktora koji sudjeluju u prijenosu elektrona od NADH/NADPH do NO_3^- su flavin adenin dinukleotid (FAD), hem i molibdopterin - kofaktor koji sadrži molibden. Nitrit koji nastaje redukcijom NO_3^- prenosi se u kloroplast gdje se reducira do NH_4^+ djelovanjem nitrit-reduktaze. Nitrit-reduktaza kodirana je jednim genom kod viših biljaka (Kant i sur., 2011). U zelenim tkivima lokalizirana je u kloroplastima, dok se u ostalim tkivima nalazi u proplastidima. U kloroplastima se kao donor elektrona koristi reducirani feredoksin koji nastaje transportom elektrona u fotosustavu I. Elektroni se od reduciranog feredoksina do NO_2^- prenose preko feredoksin-vezujuće domene, kompleksa Fe-S i hema (Marschner, 2012). Kako bi se spriječilo nakupljanje NO_2^- , koji je toksičan za biljne stanice, aktivnost nitrat-reduktaze regulira nekoliko mehanizama koji uključuju sintezu enzima, degradaciju i reverzibilnu inaktivaciju uz regulaciju koncentracije supstrata i efektoru (Lillo, 2008).



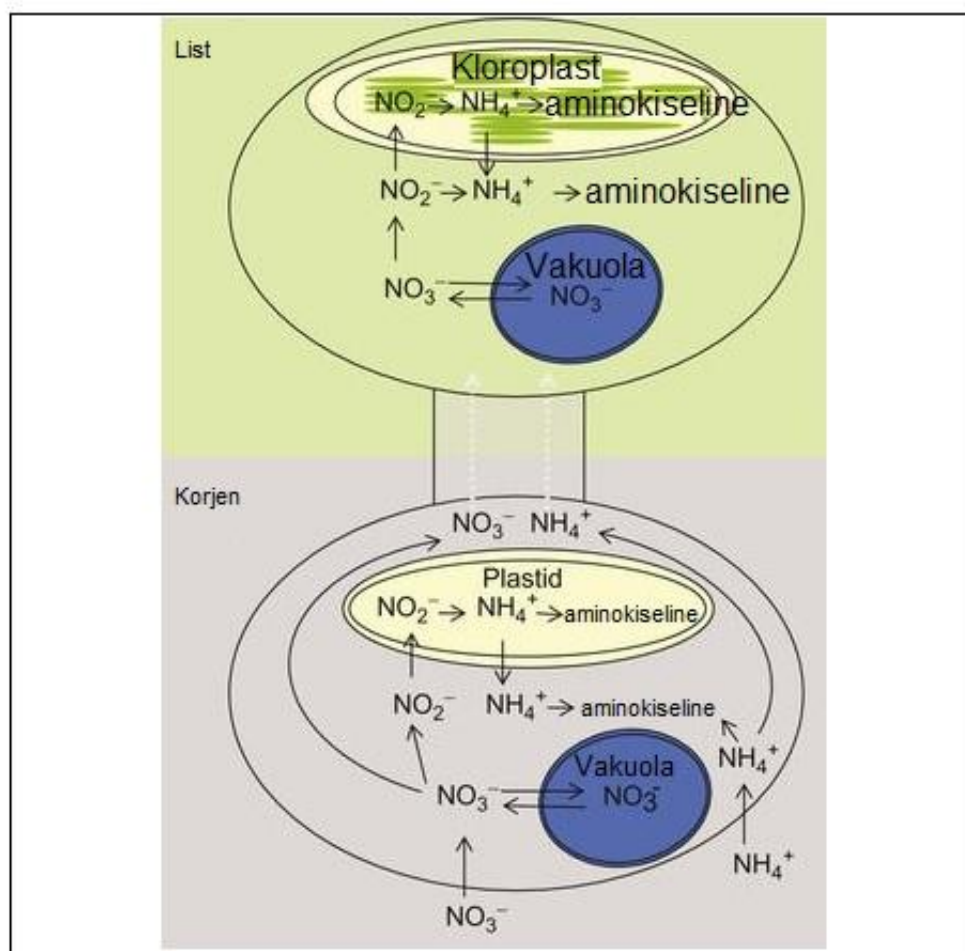
Slika 8. Redukcija NO_3^- do NH_4^+ (prilagođeno prema Marschner, 2012)



Uz direktan unos preko korijena, NH_4^+ konstantno nastaje u biljnim tkivima u procesu redukcije NO_3^- , fotorespiracije, biosinteze lignina i dr. (Joy, 1988). Neovisno o izvoru NH_4^+ i organu u kojem se događa asimilacija, glavni enzimi koji sudjeluju u asimilaciji su glutamin-sintetaza i glutamat-sintaza (glutanim-oksoglutarat aminotransferaze) (Marschner, 2012). Anorganski N asimiliran u glutamat i glutamin dalje se koristi za sintezu drugih aminokiselina, amina, peptida, proteina, nukleinskih kiselina i drugih spojeva. Organski spojevi niske molekulske mase u višim biljkama djeluju kao posrednici između asimilacije anorganskog N i sinteze većih spojeva te imaju veliku važnost u transportu N u tkiva gdje je potreban kao i stvaranju rezervi N tijekom perioda velike dostupnosti (Marschner, 2012).

Da bi biljke mogle normalno rasti, razvijati se i razmnožavati se potrebne su im adekvatne ali ne prekomjerne količine N. Dakle, smanjena dostupnost N u okolini ili smanjenje kapaciteta primanja putem korijena utjecati će na produktivnost biljke i ekološku kompetitivnost (Marscher, 2012). U uvjetima kratkotrajnog nedostatka N biljke reagiraju u dvije faze. U prvoj fazi, smanjuje se proces rasta listova bez uočljivih promjena u procesu fotosinteze (Anandacoomaraswamy i sur., 2002). Rast korijena se održava na istoj razini ili se čak stimulira transportom C u korijen što rezultira manjim omjerom biomase izdanaka i korijena (Richard-Molard i sur., 2008). Mobiliziraju se spojevi koji sadrže N, posebno NO_3^- i povećava se kapacitet njihovog primanja iz okoline. U drugoj fazi, pokreće se raspad proteina i nukleinskih kiselina u listovima (Hortensteiner i Feller, 2002). Razgradnja enzima kao npr. enzima Rubisco

dovodi do smanjenja fotosintetskog kapaciteta što u konačnici inhibira rast cijele biljke (Hortensteiner i Feller, 2002). Biljke su razvile mnogobrojne strategije odgovora na promjene u dostupnosti N iz okoliša kao što su metaboličke, fiziološke i razvojne prilagodbe koje ovise o promjeni ekspresije gena (Wang i sur., 2000). Na primjer pri smanjenju koncentracije N u stanicama dolazi do koordiniranog smanjenja ekspresije gena uključenih u fotosintezu, sintezu klorofila, sintezu plastidnih proteina, dok su geni uključeni u sekundarni metabolizam i proces degradacije proteina inducirani (Scheible i sur., 2004).



Slika 9. Unos i asimilacija N u biljkama (prilagođeno prema Marschner, 2012).

1.1.4.2. Fosfor

Koncentracija P potrebna za normalan rast i razvoj biljaka je u rasponu od 3 do 5 mg/g suhe tvari biljke tijekom vegetativnog rasta (Lambers i sur., 2010). Do pojave simptoma toksičnosti može doći ukoliko koncentracije P prijeđe 1% u suhoj tvari biljnog tkiva (Marschner, 2012). Međutim, pojava toksičnosti P ipak je vrlo rijetka s obzirom da biljke smanjuju unos P putem korijena kada su opskrbljene s više ovog nutrijenta nego im je potrebno za rast (Dong i sur., 1999). U okolišu je P prisutan u anorganskom i organskom obliku. Glavni izvor organskog P su ostaci biljnih i životinjskih tkiva koji se raspadaju pod utjecajem mikroorganizama (Raghothama, 1999). Anorganski fosfor je u obliku dihidrogenfosfatnog iona (H_2PO_4^-) i hidrogenfosfatnog iona (HPO_4^{2-}). Pri fiziološkim vrijednostima pH, biljke primaju P u obliku H_2PO_4^- koji u stanicama može ostati u anorganskom obliku (P_i) ili se može prevesti u jednostavne fosfatne estere ali i vezati s drugim fosfatima (Marschner, 2012). Prijelaz između P_i , estera i fosfatne veze vrlo je brz. Tako na primjer, P_i primljen preko korijena se ugrađuje u organski P već nakon nekoliko minuta po unosu u biljku, ali se u ksilemu oslobađa u P_i obliku (Marschner, 2012).

Jedna od glavnih uloga P je strukturna komponenta nukleinskih kiselina, DNA i RNA (ribonukleinske kiseline) u kojima P predstavlja most koji povezuje nukleotidne podjedinice (Marschner, 2012). Omjer P kao sastavnog dijela nukleinskih kiselina prema P u ostalim organskim spojevima varira među različitim tkivima (Suzuki i sur., 2001). Visok omjer zabilježen je u mladim listovima gdje su potrebne veće koncentracije RNA zbog brze sinteze proteina. S druge strane, u zrelih listovima omjer P iz nukleinskih kiselina u odnosu na druge spojeve koji sadrže P je manji a vrlo mali u listovima koji su u senescenciji (Suzuki i sur., 2001). Oblik P diestera široko je rasprostranjen i u biomembranama gdje stvara most između diglicerida i drugih molekula kao što su aminokiseline, amini ili alkoholi (Marschner, 2012). Fosfatni esteri i energijom bogati fosfati, iako su u stanicama prisutni u relativno niskim koncentracijama, predstavljaju metaboličku energiju stanice (Marschner, 2012). Pronađeno je oko 50-tak fosfatnih estera u biljnim stanicama, od kojih su glukoza-6-fosfat i fosfoglicerinaldehid najrasprostranjeniji (Marschner, 2012).

Energija oslobođena tijekom glikolize, aerobne respiracije ili fotosinteze se koristi za sintezu energijom bogatih pirofosfatnih veza. Hidrolizom pirofosfatne veze u ATP-u oslobađa se oko 30 kJ po molu ATP-a (Marschner, 2012). Energijom bogata pirofosfatna veza može biti i u drugim nukleotid-trifosfatima koji se od ATP-a razlikuju samo u dušičnoj bazi, na primjer

uridintrifosfat (UTP) i gvanozintrifosfat (GTP) koji su potrebni za sintezu saharoze i celuloze (Marschner, 2012).

U stanicama viših biljaka vakuola djeluje kao skladište ili nemetabolička zaliha P te se u vakuoli, pri adekvatnoj dostupnosti P, nalazi približno 85-95% ukupnog P u stanici i to u obliku P_i (Lauer i sur., 1989a). Nasuprot tome, u biljkama koje rastu u uvjetima smanjenje dostupnosti P, većina P_i lokalizirana je u citosolu i predstavlja metabolički aktivan P (Lauer i sur., 1989b). Koncentracija P_i u stromi kloroplasta i omjer P_i između kloroplasta i citosola ima važan utjecaj na proces fotosinteze i raspodjelu C među staničnim odjeljcima. Koncentracija P_i u kloroplastima potrebna za postizanje maksimalne fotosinteze iznosi 2,0-2,5 mM dok je pri koncentracijama manjim od 1,0 mM fotosinteza gotovo potpuno inhibirana (Robinson i Giersch, 1987; Heber i sur., 1989). Uloga P_i u raspodjeli C među staničnim odjeljcima dokazana je na izoliranim kloroplastima (Heldt i sur., 1977). Porast vanjske koncentracije P_i do oko 1 mM povećava razinu fotosinteze ali inhibira ugrađivanje C u škrob. Sinteza škroba je značajno inhibirana kada koncentracija P_i u stromi kloroplasta iznosi 5 mM. Inhibicija sinteze škroba visokim koncentracijama P_i postiže se kroz dva odvojena mehanizma u kloroplastima (Marschner, 2012). Prvi mehanizam odnosi se na inhibiciju glavnog enzima u sintezi škroba, ADP-glukozapirofosforilaza koja je alosterički inhibirana s P_i te aktivirana s triozafosfatima (Portis, 1982). Drugim riječima, omjer P_i i triozafosfata određuje razinu sinteze škroba – pri visokom omjeru enzim je inhibiran i sinteza škroba se ne događa (Portis, 1982). Drugi mehanizam inhibicije sinteze škroba je transport triozafosfata, kao glavnih produkata fiksacije C, iz kloroplasta. Transport je posredovan transportnim proteinom koji je lokaliziran u unutarnjoj membrani kloroplasta (Heldt i sur., 1991).

Odgovor biljaka na nedostatak P posredovan je šećerima (Karthikeyan i sur., 2007) i RNA molekulama (Doerner, 2008). U nedostatku P u biljkama dolazi do smanjenja razine diobe stanica (Assuero i sur., 2004), smanjenja broja listova (Lynch i sur., 1991) kao i veličine listova (Fredeen i sur., 1989). Elongacija individualnih stanica korijena ali i cijelog korijena može biti povećana pri smanjenoj dostupnosti P (Anuradha i Narayana, 1991). Rast korijena pri smanjenoj dostupnosti P omogućen je smanjenjem transporta P u izdanak ali i zbog povratnog transporta P iz izdanka u korijen (Smith i sur., 1990). Kada se koncentracija P promijeni od nedostatka do suviška dolazi do povećanja glavnih P metabolita u vegetativnim biljnim tkivima (Chapin i Bieleski, 1982). S daljnjim povećanjem koncentracije P povećava se samo koncentracije P_i kao glavnog skladišnog oblika u biljnoj stanici (Shane i sur., 2004).

1.1.5. Srebro u vodenim ekosustavima i njegov značaj za biljke

Srebro (Ag) je rijedak metal u prirodi koji nalazimo u rudama kombiniran s drugim elementima. Emisija tijekom topljenja rude, proizvodnje i odlaganja fotografske opreme te izgaranje ugljena samo su neke od antropogenih aktivnosti kojima Ag dolazi u biosferu (Xu i sur., 2010). Glavni izvori Ag u vodenim ekosustavima su kompleksi s tiosulfatima iz otopina za razvijanje fotografija koje su ispuštane direktno u kanalizacije (Purcell i Peters, 1998). Danas se koncentracija Ag u vodenim staništima povećava kao posljedica sve veće upotrebe proizvoda koji sadrže nanočestice srebra (engl. *silver nanoparticles*, AgNP) (Liu i Hurt, 2010). Nanosrebro se nalazi u antibakterijskim premazima medicinske opreme, šamponima, sapunima, pastama za zube, preparatima za pročišćavanje vode te u bojama i tkaninama (Boxall i sur., 2007). Prema popisu proizvoda koji sadrže nanočestice (Inventory of Nanotechnology Products, 2009) AgNP nalaze se u više proizvoda široke potrošnje u odnosu na sve ostale nanomaterijale zajedno (Kennedy i sur., 2010). Koloidi nanosrebra sadrže Ag u tri oblika: kruti Ag^0 , slobodni Ag^+ oblik i njegove komplekse te Ag^+ adsorbiran na površinu koloida (Liu i Hurt, 2010; Lowry i sur., 2012). Iako ne postoje točne informacije koliko ionskog Ag se otpušta iz koloida AgNP u vodenom okruženju, brojne studije povezale su toksično djelovanje AgNP upravo s otpuštanjem ionske faze iz koloida (Kennedy i sur., 2010; Zhao i Wang, 2011; Miao i sur., 2009). U površinskim slatkim vodama, Ag se nalazi u obliku jednovalentnog iona u kombinaciji sa sulfidima i bikarbonatima ili u obliku ionskih kompleksa s kloridima i sulfatima (Adams i Kramer, 1998). U vodama koje su onečišćene organskim tvarima, Ag se uglavnom nalazi u kompleksu s tiolima (Adams i Kramer, 1998). Ioni srebra brzo se mogu izmjenjivati između različitih tiola pri čemu dolazi do brzog transporta iona iz sedimenta u vodenu fazu te transporta iz vodenog okoliša u žive stanice.

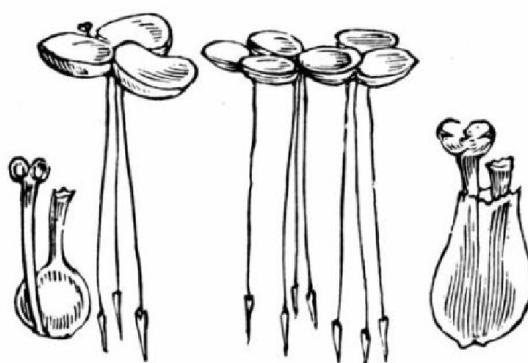
Srebro je neesencijalni element za žive organizme i jedan od najtoksičnijih metala u vodenim ekosustavima, bilo u otopljenom ili ionskom obliku. U biljne stanice može ući na nekoliko načina: putem sulfat/tiosulfat transportnog mehanizma, preko transportera kationa ili pasivnim transportom preko plazma membrane u obliku kompleksa s Cl (Campbell i sur., 2002; Fortin i Campbell, 2001). Unutar stanice stvara komplekse s aminokiselinama i nukleotidima, kao i s makromolekulama koje su izgrađene od ovih komponenti (Fortin i Campbell, 2001). Ioni Ag dovode do poremećaja staničnog metabolizma narušavajući ravnotežu makronutrijenata kao što su N i P, ali i mikronutrijenata kao što su K, Zn, Cu i Fe (Jiang i sur., 2012). Također, utječu na proces sinteze fotosintetskih pigmenata što uz direktno oštećenje fotosintetskog aparata dovodi

do smanjenja fotosintetske aktivnosti i fiksacije CO₂ (Xu i sur., 2010). Pohranjuju se u vakuolama i staničnim stijenkama, inhibiraju staničnu diobu, reagiraju s nukleinskim kiselinama i tiolnim skupinama enzima i proteina neophodnih za normalno funkcioniranje stanica (Fortin i Campbell, 2001). Interferirajući s transportnim lancem elektrona i inaktiviranjem enzima uključenih u proces staničnog disanja, ioni Ag dovode do prekomjernog stvaranja ROS-a, posebno superoksidnog radikala (Chudobova i sur., 2013). Antibakterijska upotreba ionskog Ag ali i AgNP-a temelji se na sposobnosti povećanja koncentracije ROS-a u stanicama (Chudobova i sur., 2013).

1.1.6. Značajke vrste *Lemna gibba* L.

Lemna gibba L. (grbasta vodena leća) je globalno rasprostranjena vrsta koja nastanjuje umjerena područja Europe, Afrike, Južne i Sjeverne Amerike te Azije. Pripada porodici *Lemnaceae* u koju se ubrajaju 38 vrsta u 4 roda: *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* i *Wolffiella*.

Tijelo biljke je jednostavne građe, duljine oko 1 cm i promjera do 5 mm (*Slika 10*, *Slika 12*). Korijenje je u obliku tankih niti duljine do 1 cm. Dominantni oblik razmnožavanja vodenih leća je vegetativno. Frondovi sa svake strane imaju dva reproduktivna džepa u proksimalnom (užem) dijelu biljke (Witzum, 1979; Lemon i Posluszny, 2000) unutar kojeg započinje proces vegetativnog razmnožavanja. Novonastale biljke-kćeri s majčinskom biljkom spojene su vriježama tvoreći kolonije različitih veličina (Landolt, 1986). Vrijeme u kojem dolazi do odvajanja biljke-kćeri od majčinske biljke je kratko nakon što biljka-kćer postigne zrelost. Zrelost je definirana kao korak u kojem se treća generacija biljaka razvija u reproduktivnom džepu biljke-kćeri (Lemon i sur., 2001). Stabilnost vriježa, koja određuje veličinu kolonija razlikuje se među vrstama porodice *Lemnaceae* ali i među klonovima iste vrste (Topp i sur., 2011). Ograničena stabilnost vriježa kod vrsta roda *Lemna* i *Spirodela* može biti važna za pozicioniranje plutajućih frondova na površini vode prema kretanju vode i zraka te za mobilnost biljaka čime se olakšava širenje na površini vode (Topp i sur., 2011). Pri optimalnim uvjetima, za udvostručenje broja biljaka potrebno je između 16 sati i 2 dana. Optimalna temperatura za rast vodene leće je 26 °C ali podnose temperaturu od 6-33 °C. Mogu rasti u širokom rasponu pH vrijednosti do 3,5 do 10,5 ali optimalne pH vrijednosti su od 4,5 do 8,3.



Slika 10. Ilustracija grbaste vodene leće, *Lemna gibba* (<http://irapl.altervista.org/flora-e/index.php?recn=11165>)



Slika 11. Kultura *L. gibba* u Erlenmayerovoj tikvici



Slika 12. Kolonije *L. gibba* građene od 3 do 5 biljaka

Vodena leća ima niz osobina koje ju čine prikladnom za laboratorijska istraživanja: vrlo je osjetljiva na prisutnost različitih tvari u hranjivoj podlozi, malih je dimenzija no ipak je dovoljno velika da se golim okom mogu promatrati neke promjene uzrokovane dodavanjem istraživanih tvari u hranjivu otopinu, jednostavne je građe, brzo se razmnožava i razmnožavanje

je vegetativno što osigurava genetičku homogenost, nema potrebe za velikim prostorom tijekom uzgoja i izvođenja pokusa, hranjiva podloga je jednostavna i jeftina. Zbog ovih osobina vodene leće često se koriste kao modelne biljke u laboratorijskim istraživanjima (Naumann i sur., 2007; Zhang i sur., 2010). Tijekom izvođenja laboratorijskih istraživanja biljke se uzgajaju na tekućim hranjivim podlogama u kontroliranim uvjetima temperature i osvjetljenja, a trajanje pokusa je od nekoliko sati do nekoliko dana. Za uzgajanje *L. gibba* u laboratoriju koristi se nekoliko različitih hranidbenih podloga: Jacobsova, Pirson i Seidlova, Hutnerova, Hillmanova, Wangova i brojne druge. Razvijeno je nekoliko standardiziranih protokola za testiranje štetnog djelovanje metala, herbicida, pesticida i organskih onečišćivača u kojima se koriste vrste iz porodice *Lemnaceae*. OECD *Lemna*-test (2004) protokol razvijen je za testiranje određenih tvari i proizvoda dok je ISO protokol razvijen za testiranje okolišnih uzoraka u kojima se testira štetno djelovanje kombinacije onečišćivača. Oba protokola temelje se na inhibiciji rasta odnosno razmnožavanja biljaka u periodu od sedam dana. *Lemna*-test može se izvoditi kao statički test (bez izmjene hranjive otopine), test s periodičnim obnavljanjem hranjive otopine i protočni test (uz kontinuiranu izmjenu hranjive otopine rijekom pokusa). Zbog jednostavnosti i ekonomičnosti najčešće se koriste statični testovi (Wang, 1990). Pri korištenju vodene leće kao testnog organizma može se pratiti cijeli niz pokazatelja učinka istraživanih tvari kao na primjer preživljenje biljaka, prirast broja biljaka, duljina korjenčića, prirast suhe i svježe mase biljaka, ukupna površina biljaka, odnos mase i površine biljaka, sadržaj fotosintetskih pigmenata, količina proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima, pojava stresnih proteina i ultrastrukturalne promjene (Hillman, 1961; Smith i Kwan, 1989; Wang, 1990).

Zbog svoje važnosti u vodenim ekosustavima i lakog uzgajanja u laboratoriju, vodene leće najčešće se koriste kao predstavnici primarnih producenata za testiranje štetnog djelovanje različitih organskih i anorganskih tvari te njihovih smjesa. S obzirom da su vrste roda *Lemna* važna komponenta u hranidbenoj mreži vodenih ekosustava te da imaju veliki potencijal asimilacije različitih tvari predstavljaju važno mjesto ulaska toksikanata u biosferu. Sposobnost bioakumulacije daje potencijal ovim vrstama za široku upotrebu u sustavima bioremedijacije onečišćenih područja i postrojenjima za tretiranje otpadnih voda (Mkandawire i Dudel, 2007).

1.2. Ciljevi istraživanja i hipoteze

Ciljevi ovog istraživanja su utvrditi utjecaj različitih koncentracija ionskog koloidnog srebra u potpunoj hranjivoj otopini na koncentraciju nutrijenata i fotosintetskih pigmenata u stanicama *L. gibba* kao i na pojavu oksidacijskog stresa te promjene u antioksidacijskom odgovoru. Cilj je također odrediti i utjecaj smanjenih koncentracija dušika i fosfora u hranjivoj otopini na fiziološki odgovor u stanicama *L. gibba* pri različitim koncentracijama ionskog koloidnog srebra.

Osnovna hipoteza ovog rada je da različite koncentracije srebra u potpunoj hranjivoj otopini uzrokuju promjene u koncentraciji nutrijenata i fotosintetskih pigmenata te pojavu oksidacijskog stresa, što dovodi do promjena u aktivnosti antioksidacijskih enzima i koncentracija antioksidanasa u stanicama. Očekuje se da će smanjene koncentracije dušika i fosfora u hranjivoj otopini mijenjati fiziološki odgovor *L. gibba* na djelovanje srebra.

2. Materijal i metode

2. Materijal i metode

2.1. Kultura vodene leće *Lemna gibba*

Vodena leća, *L. gibba* korištena u eksperimentu uzorkovana je u drenažnim kanalima Istočne Hrvatske 2006. godine i od tada je kultivirana u Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Kulture *L. gibba* uzgajane su u modificiranoj tekućoj hranjivoj otopini po Pirsonu i Seidlu (1950) (Tablica 3). Nakon pripreme, hranjivoj otopini je pomoću 0,1 M KOH podešena pH vrijedost te su otopine sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,1 MPa. Biljke su uzgajane u uzgojnoj komori pri fotoperiodu od 16 sati svjetla i 8 sati tame, količini svjetlosti od 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ i temperaturi od 25±1 °C. Kulture su održavane redovnim presađivanjem u razmaku od četrnaest dana uz praćenje broja biljaka, da bi se osiguralo vrijeme udvostručenja broja biljaka manje od 60 h (OECD, 2002). Prilikom presađivanja prebačena je jedna zdrava kolonija u Erlenmeyerovu tikvicu sa svježom sterilnom hranjivom otopinom.

Tablica 3. Sastav modificirane tekuće hranjive otopine po Pirsonu i Seidlu

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

2.2. Određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodenu leću u potpunoj hranjivoj otopini

Za tretiranje vodene leće korištena je komercijalno dostupna otopina ionskog koloidnog Ag proizvođača iSrebro Hrvatska. Za određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodenu leću u potpunoj hranjivoj otopini korištene su kulture uzgajane pri uvjetima opisanim u poglavlju 2.1. na hranjivoj otopini čiji je sastav prikazan u *tablici 3*. Molarni omjer koncentracija N i P u potpunoj hranjivoj otopini iznosi 3. Biljke su tretirane ionskim koloidnom Ag koncentracija 100, 200, 500 i 1000 µg/L tako da je u svaku Erlenmeyerovu tikvicu dodano 0,6 g svježe tvari biljaka. Rezultati preliminarnog istraživanja pokazali su da je 0,6 g svježe tvari po tikvici dovoljna masa za mjerenje aktivnosti enzima. Također preliminarna istraživanja su pokazala da dodatkom 0,6 g svježe tvari biljaka po tikvici omogućuje da tijekom 48 h trajanja eksperimenta uz povećanje broja biljaka ne dođe do prekrivanja cijele površine hranjive otopine i preklapanja biljaka čime bi dio biljaka bio limitiran svjetlosti (OECD, 2002). Uzorci biljaka za analize prikupljeni su 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h nakon početka tretmana. Kontrolne biljke uzgajane su u istim uvjetima, ali bez tretmana ionskim koloidnim Ag. Kulture su nasumično raspoređene u uzgojnoj komori da bi se umanjile prostorne razlike u osvjetljenju i temperaturi.

2.3. Određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodenu leću u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P

Za određivanje utjecaja ionskog koloidnog Ag na vodene leće u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P pripremljene su modificirane hranjive otopine po Pirsonu i Seidlu (1950) tako da su koncentracije N i P u otopini bile 50, 25, 10 i 1% u odnosu na potpunu PS hranjivu otopinu (100%). U modificiranim hranjivim otopinama zadržan je molarni omjer N i P koji iznosi 3 te je dodana određena koncentracija K⁺ iona da bi se osigurala ista koncentracija K kao u potpunoj otopini (*Tablica 4*). Ostale komponente hranjive otopine ostale su u istim koncentracijama kao i u potpunoj hranjivoj otopini (*Tablica 3*). Nakon pripreme, otopinama je pomoću 0,1 M KOH podešena pH vrijednost te su sterilizirane u autoklavu 15 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 0,1 MPa.

Biljke su iz matičnih kultura (uzgajanih na potpunoj hranjivoj otopini) premještene na sterilne hranjive otopine sa smanjenim koncentracijama N i P u Erlenmeyerovim tikvicama. Prilikom

presađivanja na svježu sterilnu hranjivu otopinu sa smanjenom koncentracijom N i P prebačeno je 5 zdravih kolonija koje su se sastojale od 4 biljke. Tijekom perioda od sedam dana biljke su se vegetativno razmnožavale u smanjenim koncentracijama N i P pri uvjetima temperature i osvjetljenja opisanim u poglavlju 2.1. nakon čega je uslijedio tretman ionskim koloidnim Ag u koncentracijama 100, 200, 500 i 1000 µg/L. Kao i u prvom dijelu istraživanja, za tretman je u svaku Erlenmeyerovu tikvicu dodano 0,6 g svježe tvari biljaka. Uzorci biljaka za analize prikupljeni su 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h nakon početka tretmana. Kontrolne biljke za svako razrjeđenje N i P uzgajane su u istim uvjetima, ali bez tretmana ionskim koloidnim Ag. Kulture su nasumično raspoređene u uzgojnoj komori da bi se umanjile prostorne razlike u osvjetljenju i temperaturi.

Tablica 4. Razrjeđenja molarnih koncentracija N i P u otopinama sa smanjenim koncentracijama ovih nutrijenata te koncentracija dodanog kalija u odnosu na potpunu hranjivu otopinu (100%).

	N mmol/l	P mmol/l	K mmol/l
100%	4,410	1,470	0
50%	2,205	0,735	2,939
25%	1,102	0,367	4,409
10%	0,441	0,147	5,291
1%	0,044	0,014	5,810

2.4. Prirast broja biljaka

Prirast (μ) broja biljaka određivao se svakodnevnim prebrojavanjem svih biljaka koje su vidljive golim okom. Dobiveni podatci uvršteni su u jednadžbu br. 22 (OECD, 2002):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (22)$$

pri čemu je:

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

N_i - broj biljaka u trenutku i

N_j - broj biljaka u trenutku j

t_i : početni trenutak eksperimenta (0)

t_j : konačni dan mjerenja (1,2, ..., 7)

Vrijednost vremena udvostručenja broja biljaka izračunata je prema jednadžbi br. 23 te se koristila kao provjera uvjeta u kojima se provode ponavljani eksperimenti (OECD, 2002):

$$T_d = \ln 2 / \mu \quad (23)$$

pri čemu je:

T_d - vrijeme udvostručenja broja biljaka u kontroli (dan)

μ - specifični prirast broja biljaka u kontroli (dan^{-1})

Prema OECD (eng. *Organization of Economic Cooperation and Development*) protokolu za provođenje standardnog *Lemna* testa vrijeme udvostručenja broja biljaka u kulturi treba iznositi manje od 2,5 dana odnosno 60 sati. Takva vrijednost vremena udvostručenja odgovara prirastu od oko $0,275 \text{ dan}^{-1}$ koji dokazuje da su biljkama osigurani svi potrebni uvjeti za normalan rast.

2.5. Prirast svježe mase biljaka

Prirast svježe mase određen je vaganjem ukupnog uzorka biljaka iz jedne Erlenmayerove tikvice nakon 48 h od početka tretmana s ionskim koloidnim Ag te uvrštavanjem podataka u jednadžbu br. 22.

2.6. Apscizija frondova

Odgovor biljaka na smanjenje koncentracije N i P u hranjivoj otopini i djelovanje ionskog koloidnog srebra na *L. gibba* praćen je određivanjem postotka razdvajanja kolonija (FA, engl. *frond abscission*) odnosno pokazatelja procesa otpuštanja biljaka iz kolonije. Postotak apscizije frondova određen je praćenjem broj biljaka i kolonija u tretmanima te izračunat pomoću jednadžbe 24 (Henke i sur., 2011):

$$FA(\%) = [(CN_t - CN_0) / FN_t - CN_0] \times 100 \quad (24)$$

pri čemu je:

CN₀ – broj kolonija na početnu tretmana (0h)

CN_t – broj kolonija u određenom vremenu uzorkovanja (t=2, 4, 8, 12, 24 i 48 h)

FN_t – broj biljaka u određenom vremenu uzorkovanja (t=2, 4, 8, 12, 24 i 48 h).

Navedena formula koristi se uz pretpostavku da je FA=0% kad dijelovi kolonije nisu odvojeni. Kada su prekinute sve niti koje spajaju biljke u kolonijama i postoje samo kolonije od jedne biljke (kada je broj biljaka jednak broju kolonija) smatra se da je FA=100%. Vrijednost razdvajanja kolonije definirana je kao postotak stvarnog broja razdvajanja kolonija u odnosu na maksimalan mogući broj razdvajanja. Ovakav izračun, normaliziran s maksimalnim mogućim brojem razdvajanja, omogućava početak eksperimenta s kolonijama različitog broja biljaka ali i s različitim početnim brojem kolonija i biljaka u eksperimentalnim grupama ovisno o dostupnosti kolonija u početnoj kulturi biljaka. Također se u obzir uzima i mogućnost formiranja novih biljaka unutar vremena trajanja tretmana.

2.7. Određivanje koncentracije proteina

Biljni materijal, nakon ispiranja destiliranom vodom i sušenja pomoću papirnatih ubrusa, prebačen je u porculanski tarionik te usitnjen u tekućem dušiku uz dodatak polivinil pirolidona (PVP). PVP u ekstrakciji veže polifenole koji bi mogli smetati prilikom mjerenja aktivnosti enzima. Usitnjeno tkivo prebačeno je u prethodno izvaganu kivetu. Masa svježje tvari potrebna za ekstrakciju topljivih proteina iznosila je oko 0,2 g. Tkivo je ekstrahirano dodatkom 1 ml hladnog ekstrakcijskog pufera (0,1 M K₂HPO₄, 0,1 M KH₂PO₄, 5 mM natrijev askorbat i 1 mM EDTA; pH 7,0) tijekom 15 minuta na ledu. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 20000 g pri temperaturi 4 °C. Supernatant je odvojen u čistu kivetu, a preostali talog reekstrahiran dodatkom 1 ml istog pufera. Spojeni supernatanti korišteni su kao sirovi ekstrakt za određivanje koncentracije proteina te aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze i katalaze. Ekstrakcijski pufer za pripremu sirovih ekstrakata za određivanje aktivnosti glutation-reduktaze, glutation-S-transferaze i superoksid-dismutaze sadržavao je 0,1 M K₂HPO₄, 0,1 M KH₂PO₄ i 1 mM EDTA (pH 7,0). Za svaki tip uzoraka proteinski ekstrakt je pripremljen u 3 ponavljanja.

Koncentracija proteina u uzorcima pripremljenim u prethodno opisanom postupku mjerena je spektrofotometrijskom metodom prema Bradford-u (1976). Metoda se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije od 465 do 595 nm zbog vezivanja boje Coomassie briljant plavo G-250 (engl. *Coomassie Brilliant Blue*, CBB) na proteine. Koncentracija proteina svakog pojedinog uzorka izračunata je uz pomoć baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije niza razrjeđenja albumina iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) poznatih koncentracija. Konačna koncentracija proteina izražena je u jedinici $\mu\text{g/g}$ sv. tv.. Bradford radna otopina sastoji se od 95%-tnog etilnog alkohola, 88%-tne ortofosforne kiseline, Bradford matične otopine i destilirane vode. Za Bradford matičnu otopinu 87,5 mg CBB G-250 otopi se u 25 ml 95%-tnog etilnog alkohola i doda 50 ml 88%-tne ortofosforne kiseline.

2.8. Određivanje koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata biljno tkivo je usitnjeno u tekućem dušiku uz dodatak magnezijevog hidrogenkarbonata (MgHCO_3) do finog praha. Oko 0,1 g usitnjenog tkiva odvagano je u prethodno označene i izvagane plastične kivete od 2 ml te je određena točna masa. Pigmenti su ekstrahirani u 1 ml hladnog acetona, 15 minuta na ledu nakon čega su centrifugirani 10 minuta pri 18 000 g i temperaturi 4 °C. Supernatant je dekantiran u plastičnu epruvetu s čepom na navoj, a na talog je ponovno dodan 1 ml acetona. Postupak reekstrakcije ponovljen je četiri do pet puta, do potpunog obezbojenja tkiva u talogu. Volumen spojenih supernatanata izmjeren je menzурom, ekstrakt je potom pretočen u staklenu kivetu te je spektrofotometrijski određena apsorbancija pri valnim duljinama od 644,8 i 661,6 nm. Koncentracija klorofila *a* (Chl*a*) i klorofila *b* (Chl*b*) izračunata je prema formulama (25 i 26) uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaler (1987) te izražena u mg/g svježe tvari.:

$$\text{Chl}a = (11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) \times V / m \times 10^3 \quad (25)$$

$$\text{Chl}b = (20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6}) \times V / m \times 10^3 \quad (26)$$

pri čemu je:

V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u ml

m = masa uzorka u gramima

Suha tvar uzorka određena je vaganjem mase svježe tvari koja je zatim sušena 24 sata u sušioniku na 105 °C te ponovno izvagana. Konačna koncentracija fotosintetskih pigmenata izražena je po masi suhe tvari (sh.tv.).

2.9. Komponente antioksidacijskog odgovora

2.9.1. Enzimski antioksidansi

2.9.1.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost enzima askorbat-peroksidaza (APX; EC 1.11.1.11) određena je prema Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 , 0,1 mM EDTA, 5 mM askorbinske kiseline i 12 mM H_2O_2 (pH 7,0). U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 1790 μl 50 mM kalij fosfatnog pufeta (pH 7,0) koji je sadržavao 0,1 mM EDTA, 20 μl askorbinske kiseline, 180 μl proteinskog ekstrakta i 10 μl H_2O_2 . Smanjenje apsorbancije praćeno je pri 290 nm svake sekunde tijekom jedne minute. Svaki uzorak izmjeren je u triplikatu te je za konačan izračun aktivnosti prema priloženoj formuli (27) korištena srednja vrijednosti promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost enzima (APXu) prikazana je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari.

$$\Delta A_{290} = X \cdot Y \cdot V_u / m \times V_a \text{ [min}^{-1}\text{g}^{-1} \text{ sv.tv.]} \quad (27)$$

pri čemu je:

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

Y = faktor potreban za izražavanje promjene apsorbancije u minuti

V_u = ukupni volumen proteinskog ekstrakta

m = masa svježe tvari (izražena u gramima)

V_a = volumen mjerenog alikvota proteinskog ekstrakta

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

2.9.1.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze

Aktivnost enzima gvajakol-peroksidaze (GPOX; EC 1.11.1.7) određena je prema Siegel i Galston (1967). Reakcijska smjesa sadržavala je 5 mM gvajakola, 0,2 M KH_2PO_4 , 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i 5 mM H_2O_2 koji je dodan neposredno prije mjerenja. Na 980 μl reakcijske smjese dodano je 20 μl ekstrakta proteina te je povećanje apsorbancije mjereno pri valnoj duljini od 470 nm svake sekunde tijekom dvije minute. Svaki uzorak mjeran je u triplicatu i za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije (27). Ukupna aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOXu) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GPOXs) određena je kao kvocijent GPOXu i koncentracije proteina i izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.9.1.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost enzima katalaze (CAT; EC 1.11.1.6) određena je praćenjem promjene apsorbancije zbog smanjenja količine H_2O_2 metodom prema Aebi (1984). Reakcijska smjesa sastojala se od 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 i 0,01 M H_2O_2 . Reakcija je započeta dodatkom 50 μl sirovog ekstrakta proteina u 1950 μl reakcijske smjese te je promjena apsorbancije mjerena pri 240 nm svakih 10 sekundi tijekom jedne minute. Svaki uzorak mjeran je u triplicatu a za izračun aktivnosti korištena je srednja vrijednost promjena apsorbancije. Ukupna aktivnost katalaze (CATu) izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari (27). Specifična aktivnost (CATs) određena je kao kvocijent CATu i koncentracije proteina te izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.9.1.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze

Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR; EC 1.6.4.2) određena je prema Dolphin i suradnicima (1989). Reakcijska smjesa 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 kvarcnu kivetu dodano je 500 μL 2 mM GSSG, 400 μl 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH=7,5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, 50 μl sirovog ekstrakta proteina te 50 μl 2 mM NADPH. Smanjenje apsorbancije praćeno je svake sekunde tijekom jedne minute pri valnoj duljini od 340 nm. Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze (GRu)

izražena je kao promjena apsorbancije u minuti po gramu svježe tvari. Specifična aktivnost (GRs) određena je kao kvocijent GRu i koncentracije proteina te izražena u $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.9.1.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze

Ukupna aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST; EC 2.5.1.18) određena je metodom prema Habig i sur. (1974). Metoda se temelji na upotrebi 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB, engl. *1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) kao supstrata na koji se veže tiolna grupa glutationa te uslijed formiranja konjugata glutation-2,4-dinitrobenzena dolazi do smanjenja apsorbancije pri valnoj duljini 340 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od 0,1 M KH_2PO_4 , 0,1 M K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 75 mM reduciranog glutationa i 30 mM otopine CDNB. U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 1300 μl 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH=6,5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, 50 μl otopine reduciranog glutationa i 50 μl otopine CDNB. Nakon ekvilibriranja pri 25 °C dodano je 100 μl ekstrakta proteina te je smjesa dobro promiješana. Pad apsorbancije prati se pri 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Od izmjerenih promjena apsorbancije uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe koja se sastoji od 1400 μl 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH=6,5) s 1 mM EDTA, 50 μl otopine reduciranog glutationa i 50 μl otopine CDNB. Jedna jedinica enzima GST definirana je kao količina enzima potrebna da konjugira 1 μmol CDNB s reduciranim glutationom po minuti pri pH 6,5 i 25°C. Ukupan broj jedinica GST izražen je kao količina jedinica po gramu svježe tvari dok je specifična količina jedinica izražena kao kvocijent ukupnih jedinica i koncentracije proteina te izražena kao U $\text{mg}^{-1} \text{prot}$.

2.9.1.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD; EC 1.15.1.1) određena je spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Giannopolitis i Ries (1977). Metoda se temelji na uporabi nitro plavog tetrazolijskog klorida (NBT) kao supstrata koji se u prisutnosti superoksidnih radikala reducira do plavo obojenog formazina. Redukcija je inhibirana u prisutnosti SOD. Reakcijska smjesa (pH=7,5) sastojala se od 0,05 M KH_2PO_4 , 0,05 M K_2HPO_4 , 13 mM metionina, 75 μM NBT, 0,1 mM EDTA i 2 μM riboflavina koji je dodan neposredno prije mjerenja. Za izradu krivulje aktivnosti pripremljena su razrjeđenja proteinskog ekstrakta miješanjem ekstrakta (10-70 μl) i pufera za ekstrakciju proteina do ukupnog volumena od 80 μl . Za svaki je proteinski ekstrakt

napravljena zasebna krivulja aktivnosti. U plastičnu kivetu dodano je 910 μl reakcijskog pufera, 80 μl razrijeđenog proteinskog ekstrakta i 10 μM riboflavina te je reakcija započeta stavljanjem reakcijske smjese pod izvor svjetlosti (neonska lampa, 36W). Nakon 10 minuta na svjetlu, reakcija je prekinuta i smjesa je korištena za mjerenje maksimalne apsorbancije nastalog formazina pri valnoj duljini od 560 nm. Jedna jedinica enzima SOD definirana je kao količina enzima potrebna da izazove 50%-tnu inhibiciju redukcije NBT. Ukupan broj jedinica SOD je izražen kao količina jedinica po gramu svježe tvari dok je specifična količina jedinica izražena kao kvocijent ukupnih jedinica i koncentracije proteina te izražena kao U mg^{-1} prot.

2.9.2. Neenzimski antioksidansi

2.9.2.1. Određivanje koncentracije ukupnih karotenoida

Koncentracija ukupnih karotenoida (Car) određena je iz ekstrakta za mjerenje koncentracije fotosintetskih pigmenata postupkom opisanim u poglavlju 2.8. Koncentracija Car određena je mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama 470, 644,8 i 661,6 nm i izračunata prema jednadžbi br. 28 uz korištenje ekstinkcijskih koeficijenata prema Lichtenthaler (1987) te izražena u mg g^{-1} sh. tv:

$$\text{Car} = [10^3 \times A_{470} - 1,9(11,24 \times A_{661,6} - 2,04 \times A_{644,8}) - 63,14(20,13 \times A_{644,8} - 4,19 \times A_{661,6})] \times V / 214 \times m \times 10^3 \quad (28)$$

pri čemu je:

V = ukupni volumen ekstrakta fotosintetskih pigmenata u ml

m = masa uzorka u gramima

2.9.2.2. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih fenola

Uzorkovano biljno tkivo isprano je destiliranom vodom, posušeno papirnatim ubrusima i usitnjeno u tekućem dušiku do finog praha. Oko 0,1 g usitnjenog tkiva odvagano je u prethodno izvagano i označenu plastičnu kivetu te ekstrahirano dodatkom 1 ml 80%-tnog etanola. Nakon ekstrakcije u trajanju 24 h pri -20°C uzorci su centrifugirani 10 min pri 15 000 g i 4°C , a dobiveni supernatant odvojen je za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola.

Sadržaj ukupnih fenola (PHE) određen je spektrofotometrijski praćenjem metode po Folin-Ciocalteuu (Singleton i Rossi, 1965). Metoda se temelji na reakciji Folin-Ciocalteau (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) i reducirajućeg reagensa (fenolni spoj) pri čemu dolazi do pojave plavog obojenja. U kivetu je dodano 100 μL alkoholnog ekstrakta tkiva, 700 μL vode i 100 μL FC reagensa te pomiješano na vrtložnoj miješalici. Nakon inkubacije (5 min) u reakcijsku smjesu dodano je 150 μL zasićene otopine Na_2CO_3 . Uzorci su zatim inkubirani 60 min pri 37 °C u vodenoj kupelji. Po završetku inkubacije mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm u odnosu na slijepu probu. Koncentracija ukupnih PHE određena je iz baždarne krivulje za koju je kao standard korištena galna kiselina (GA). Koncentracija ukupnih topljivih fenolnih spojeva u biljnom tkivu izražena je u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu svježe tvari ($\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}^{-1} \text{sv.t.}$).

2.9.2.3. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline

Koncentracija askorbinske kiseline (AA) je određena metodom po Murkherjee i Choudhourii (1983). Oko 40 mg fino usitnjenog biljnog tkiva preneseno u prethodno izvaganu i označenu kivetu od 2 mL. Na biljno tkivo zatim je dodano 1 mL 6%-tne TCA, 500 μL 2% dinitrofenilhidrazina (DNPH) otopljenog u 50% H_2SO_4 te 1 kap 10% tiouree otopljene u 70% etanolu. Slijepa proba pripremljena je od 1 mL 6%-tne TCA, 500 μL 2% dinitrofenilhidrazina (DNPH) otopljenog u 50% H_2SO_4 te 1 kap 10% tiouree otopljene u 70% etanolu. Uzorci i slijepa proba su zatim 15 minuta inkubirani u vodenoj kupelji pri 95 °C. Nakon hlađenja do sobne temperature uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 6 000 g i 4 °C. Dobiveni supernatant prebačen je u staklene kivete, a talog je otopljen dodavanjem dva puta po 750 μL 80% H_2SO_4 . Nakon otapanja taloga dobiveni supernatanti su spojeni i dobro promiješani. Apsorbancija uzoraka određena je pri 520 nm te je koncentracija askorbinske kiseline dobivena ekstrapolacijom iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama AA i izražena u $\mu\text{mol g}^{-1} \text{sv.tv.}$ uz ekstincijski koeficijent $\epsilon_{350}=226,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.9.3. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti

Kontrolne i tretirane biljke po isteku vremena tretmana isprane su destiliranom vodom, posušene pomoću papirnatoг ubrusa te usitnjene do finog praha pomoću tekućeg dušika. Oko

0,1 g biljnog praha odvagano je u prethodno izvaganu i označenu kivetu. U kivetu je dodan 1 ml 80%-tnog etanola i ekstrakcija se provodila 24 h pri -20°C . Nakon centrifugiranja (10 min pri 15 000 g i 4°C) dobiveni supernatant odvojen je u čistu kivetu.

Ukupna antioksidacijska aktivnost (UAA) u *L. gibba* određena je metodom po Brand-Williams i sur. (1995). Ova metoda temelji se na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. Uklanjanje radikala prati se smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 515 nm do kojeg dolazi zbog smanjenja količine antioksidanasa (AH) ili reakcije s radikalima (R^{\bullet}) (jednadžbe 29 i 30).



Reakcija započinje miješanjem 20 μl ekstrakta vodene leće i 980 μl otopine DPPH radikala u čvrsto zatvorenim kivetama uz lagano miješanje pri 20°C u trajanju od 15 minuta. Po završetku reakcije izmjerena je apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 515 nm. Ukupna antioksidacijska aktivnost uzorka određena je iz standardne krivulje apsorbancije otopina poznate koncentracije Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) i izražena u ekvivalentima Troloxa.

2.10. Određivanje koncentracije vodikovog peroksida

Koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) određena je metodom koju su opisali Murkherejee i Choudhuri (1983). Nakon tretmana biljke su isprane destiliranom vodom i osušene papirnatim ubrusom te usitnjene u tekućem dušiku uz pomoć porculanskog tarionika i tučka. Vodikov peroksid ekstrahiran je iz 0,2 g usitnjenog tkiva 15 minuta u 1 ml ledeno-hladnog acetona. Uz uzorke tretiranog tkiva i kontrole pripremljena je i slijepa proba koja se sastojala od 1 ml acetona bez biljnog tkiva. Uzorci i slijepa proba centrifugirani su 5 minuta pri 6 000 g i 4°C nakon čega je odvojenom supernatantu dodano 400 μl titanovog reagensa i 500 μl NH_4OH (konc.). U egzotermnoj reakciji titanovog reagensa, NH_4OH i H_2O_2 u supernatantu nastaje kompleks titan-peroksida. Istaloženi titan-peroksid odvojen je centrifugiranjem pri 15 000 g i 4°C u trajanju od 10 minuta te otopljen u 1 ml 2M H_2SO_4 . Nakon ponovnog centrifugiranja, bistri dio supernatanta odvojen je u kivetu te mu je mjerena apsorbancija pri

valnoj duljini od 415 nm. Količina H₂O₂ izračunata je iz standardne krivulje apsorbancije otopina poznate koncentracije H₂O₂. Konačni rezultati izraženi su u μmol po gramu svježe tvari (μmol g⁻¹ sv.tv.).

2.11. Određivanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije određena je kao koncentracija supstanci koje reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid reactive substances* –TBARS) metodom po Verma i Dubey (2003). Tkivo vodene leće nakon ispiranja destiliranom vodom i sušenja papirnatim ubrusom, usitnjeno je do finog praha u tekućem dušiku. Oko 0,2 g usitnjenog tkiva ekstrahirano je s 1 ml 0,1%-tne trikloroetene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja pri 6 000 g i 4 °C u trajanju od 5 min odvojeno je 0,5 ml supernatanta te pomiješano s 1 ml 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20%-tnoj TCA. Tako dobivena smjesa zagrijana je 30 min u vodenoj kupelji na 95 °C pri čemu dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti koji reagiraju s TBA. Nakon hlađenja na ledu uzorci su centrifugirani pri 18 000 g i 4 °C tijekom 15 min. Supernatant je korišten za spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije pri valnim duljinama od 532 i 600 nm. Kao slijepa proba korištena je otopina 0,5% TBA u 20% TCA. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izračunata je korištenjem molarnog ekstinkcijskog faktora 155 mM⁻¹ cm⁻¹ prema jednadžbi 31 i izražena u nM g⁻¹ sv.tv.

$$\text{TBARS} = [(A_{532} - A_{600} / 155) / m] \times 10^3 \quad (31)$$

2.12. Određivanje mineralnog sastava tkiva vodene leće

Mineralni sastav vodene leće analiziran je nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag. Nakon tretmana biljke su isprane otopinom EDTA da bi se uklonilo elemente s površine biljke. Za analizu mineralnog sastava tkiva vodene leće primijenjene su uobičajene metode razaranja organske tvari mokrim postupkom (smjesa nitratne kiseline i vodikovog peroksida).

2.12.1. Priprema osnovne otopine

Na 0,2 do 0,5 g suhe samljevene biljne tvari u kiveti za razaranje dodano je 9 ml HNO₃ i 2 ml H₂O₂. Preliveni uzorak ostavljen je preko noći na sobnoj temperaturi te zatim mikrovalno razaran pri temperaturi 200 °C u trajanju 2 h. Ohlađeni uzorak je kvantitativno prenesen u označene kivete te su kivete bile nadopunjene vodom do 35 ml.

2.12.2. Određivanje koncentracije srebra

Koncentracija srebra (Ag) u osnovnoj otopini određena je apsorpcijskom i/ili emisijskom tehnikom pomoću atomskog apsorpcijskog spektrofotometra (AAS). U svrhu kalibracije AAS, pripravljeno je niz standardnih otopina poznatih koncentracija analiziranog elementa. Rezultati analiza izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ ili mg L^{-1} (prijašnje oznake ppm) i označavaju koncentraciju ispitivanog elementa u osnovnoj otopini. Očitane vrijednosti koncentracije analiziranih elemenata su preračunate u sadržaj elemenata u mg/kg (Lisjak i sur., 2009.).

2.12.3. Određivanje koncentracije željeza, magnezija i kalija

Koncentracija Fe, Mg i K u osnovnoj otopini određena je apsorpcijskom i/ili emisijskom tehnikom pomoću atomskog apsorpcijskog spektrofotometra (AAS). U svrhu kalibracije AAS, pripravljeno je niz standardnih otopina poznatih koncentracija analiziranog elementa. Rezultati analiza izraženi su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ ili mg L^{-1} u osnovnoj otopini. Očitane vrijednosti koncentracije analiziranih elemenata su preračunate u sadržaj elemenata u mg/kg (Lisjak i sur., 2009.).

2.13. Statistička obrada

Svi pokusi izvedeni su u tri ponavljanja i svi uzorci uzimani u triplikatu (iz tri Erlenmayerove tikvice). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Prilikom statističke obrade rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *analysis of variance* – ANOVA). Zbog nehomogenosti varijanci podataka, izvorni podatci aktivnosti enzima su logaritamski transformirani kako bi se zadovoljili uvjeti za analizu varijance. Značajnost razlike primijenjenih tretmana u odnosu na kontrolu ispitana je Tukey HSD *post hock* testom (engl. *Tukey's HSD test; honestly significant difference test*). Kao kontrola za svaki mjereni parametar uzeti su podatci izmjereni za biljke koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj

otopini bez dodatka ionskog koloidnog Ag (100% koncentracije N i P u hranjivoj otopini + 0 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag). Značajnost razlike između eksperimentalnih grupa nakon 48 h tretmana ispitana je LSD testom (engl. *least significant difference*). Rezultati mjerenja koncentracije Ag i nutrijenata u tkivu *L. gibba* uspoređeni su s kontrolom Studentovim t-testom. Stupanj povezanosti istraživanih parametara utvrđen je primjenom Pearsonovog koeficijenta korelacije. Za sve testove uzeta je razina značajnosti $P < 0,05$. Za statističku obradu podataka korišten je računalni program STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc, SAD).

3. Rezultati

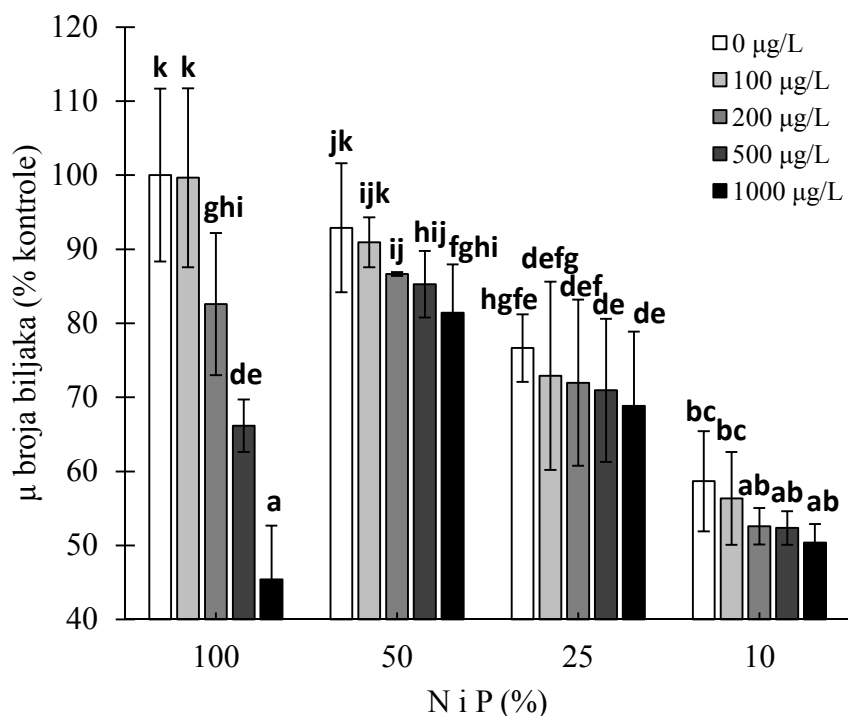
3. Rezultati

3.1. Prirast broja biljaka

Rast biljaka bio je značajno inhibiran već tijekom perioda prilagodbe na smanjenje koncentracije N i P u hranjivim otopinama. Najveći specifični prirast broja biljaka (μ) zabilježen je za biljke kultivirane u potpunoj hranjivoj otopini. Smanjenjem koncentracije N i P za 50% u odnosu na potpunu hranjivu otopinu (100%) nije zabilježen značajan utjecaj na prirast broja biljaka. Daljnjim smanjenjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini dolazi do značajnog smanjenja prirasta. Najmanja vrijednost prirasta ($0,136 \pm 0,002 \text{ dan}^{-1}$) zabilježena je za biljke koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 1% koncentracije N i P u odnosu na 100% hranjivu otopinu kao kontrolu. Prirast broja biljaka pri smanjenju koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 1% u usporedbi s prirastom broja biljaka u potpunoj hranjivoj otopini ($0,313 \pm 0,036 \text{ dan}^{-1}$) bilo je 62% manji. Ovakva inhibicija rasta broja biljaka onemogućila je razvoj dovoljnog broja biljaka potrebnog za ispitivanje djelovanja ionskog koloidnog Ag u kombinaciji s ovim razrjeđenjem nutrijenata u hranjivoj otopini.

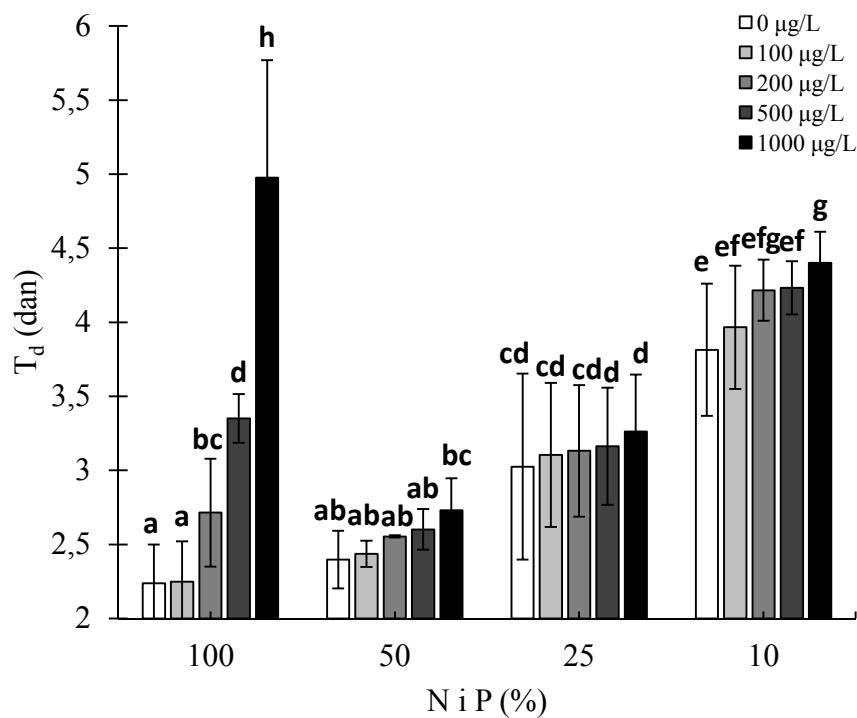
Prirast broja biljaka *L. gibba* koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini bio je statistički značajno inhibiran 48 h od početka tretmana s 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag ($F=21,725$; $P<0,01$) dok najmanja koncentracija ionskog koloidnog Ag nije imala značajan utjecaj (*Slika 13*). Koncentracija ionskog koloidnog Ag od 200 $\mu\text{g/L}$ smanjila je specifični prirast za 17% u usporedbi s kontrolom. Daljnjim povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini zabilježeno je daljnje smanjenje prirasta, za 34% pri 500 $\mu\text{g/L}$ i 55% pri 1000 $\mu\text{g/L}$. Slično tome, prirast broja biljaka koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% N i P također je bio značajno inhibiran u tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag u usporedbi s kontrolom. Pri tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ prirast broja biljaka bio je manji 13%, pri 500 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag manji za 15% dok je najveća koncentracija ionskog koloidnog Ag smanjila prirast za 18% u odnosu na kontrolu. Smanjene koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 25% i 10% u odnosu na potpunu hranjivu otopinu uzrokovale su smanjenje prirasta broja biljaka 23% ($0,240 \pm 0,014 \text{ dan}^{-1}$) i 41% ($0,184 \pm 0,021 \text{ dan}^{-1}$) u usporedbi s kontrolom ($0,313 \pm 0,037 \text{ dan}^{-1}$). Dodatkom ionskog koloidnog Ag biljkama koje su uzgajane u hranjivim otopinama s 25% i 10% N i P također dolazi do značajnog smanjenja prirasta broja biljaka u usporedbi s kontrolom (*Slika 13*). Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag prirast broja biljaka smanjen je za 31% pri 25% N i P u hranjivoj otopini te za 41% u hranjivoj otopini s 10% N i P u usporedbi s kontrolom.

Ionsko koloidno Ag koncentracije 100 $\mu\text{g/L}$ uzrokovalo je veću inhibiciju prirasta broja biljaka kada je tretman bio u hranjivoj otopinom s 25 i 10% koncentracije N i P. Tretman biljaka s 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag uzrokovao je manju inhibiciju prirasta biljaka u hranjivoj otopini s 50 i 25% koncentracije N i P u usporedbi s biljkama u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 13).



Slika 13. Specifični prirast broja biljaka (μ) *L. gibba* pri različitim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini (100, 50, 25 i 10%) i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

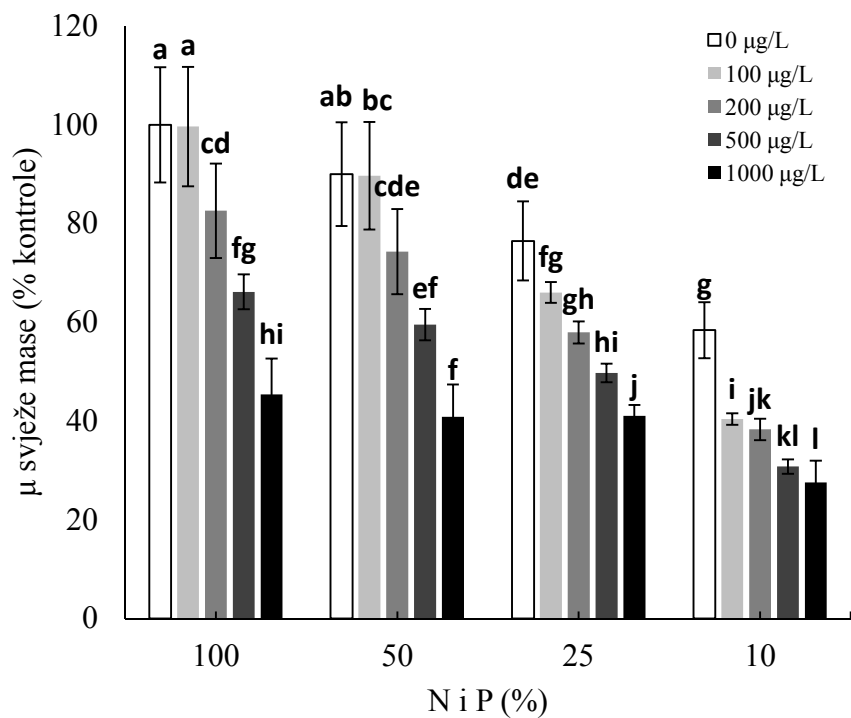
Vrijeme potrebno za udvostručenje broja biljaka (T_d) u kontroli bilo je $2,239 \pm 0,261$ dana (Slika 14). Smanjenjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini i dodatkom ionskog koloidnog Ag zabilježeno je značajno povećanje T_d za *L. gibba* ($F=28,427$; $P < 0,01$). Za biljke koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini T_d u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag bilo je dvostruko veće ($4,977 \pm 0,261$ dana) u usporedbi s kontrolom. Smanjenjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 25% i 10% u odnosu na potpunu hranjivu otopinu T_d se značajno povećalo na $3,026 \pm 0,628$ dan i $3,814 \pm 0,446$ dan u usporedbi s kontrolom.



Slika 14. Vrijeme udvostručenja broja biljaka (T_d) *L. gibba* pri različitim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini (100, 50, 25 i 10%) i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

3.2. Prirast svježe mase biljaka

Prema rezultatima analize varijance ($F=57,247$; $P<0,01$) prirast svježe mase biljaka *L. gibba* nakon 48 h tretmana s ionskim koloidnom Ag u hranjivoj otopini s različitim razrjeđenjima koncentracije N i P bio je značajno inhibiran u usporedbi s kontrolom (*Slika 15*). Prirast svježe mase kontrolnih biljaka iznosio je $0,282 \pm 0,033 \text{ dan}^{-1}$. Slično kao i prirast broja biljaka koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini, prirast svježe mase *L. gibba* bio je statistički značajno inhibiran 48 h od početka tretmana s 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag dok najmanja koncentracija Ag nije imala značajan utjecaj na prirast svježe mase (*Slika 15*). Koncentracija ionskog koloidnog Ag od 1000 $\mu\text{g/L}$ smanjila je prirast za 55% u usporedbi s kontrolom, dok je smanjenje prirasta pri tretmanima s 200 $\mu\text{g/L}$ i 500 $\mu\text{g/L}$ iznosilo 17% i 34% u usporedbi s kontrolnim biljkama. Prirast svježe mase biljaka koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% N i P bio je značajno inhibiran pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag (*Slika 15*). Pri tretmanu s najmanjom koncentracijom ionskog koloidnog Ag prirast svježe mase biljaka iznosio je $0,253 \pm 0,031 \text{ dan}^{-1}$ i bio je 15% manji u usporedbi s kontrolom. Prirast svježe mase biljaka 48 h od početka tretmana s 200 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag ($0,210 \pm 0,031 \text{ dan}^{-1}$) bio je za 25% manji u odnosu na kontrolu, dok je pri tretmanu s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag prirast svježe mase bio manji za 27% i 38% u usporedbi s kontrolom (*Slika 15*). Slično kao i prirast broja biljaka, smanjene koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 25% i 10% u odnosu na potpunu hranjivu otopinu uzrokovale su smanjenje prirasta svježe mase biljaka za 23% ($0,216 \pm 0,023 \text{ dan}^{-1}$) i 42% ($0,165 \pm 0,016 \text{ dan}^{-1}$) u usporedbi s kontrolom ($0,282 \pm 0,033 \text{ dan}^{-1}$). Dodatkom ionskog koloidnog Ag biljkama koje su uzgajane u hranjivim otopinama s 25% i 10% N i P zabilježena je progresivna inhibicija prirasta svježe mase biljaka u usporedbi s kontrolom (*Slika 15*). Za biljke koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P utvrđena je 50%-tna inhibicija prirasta svježe mase biljaka pri tretmanu s 500 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag. S druge strane prirast svježe mase biljaka uzgajanih u hranjivoj otopini s 10% N i P već pri najmanjoj koncentraciji ionskog koloidnog Ag (100 $\mu\text{g/L}$) bio je inhibiran 60% u odnosu na kontrolu. Prirast svježe mase biljaka manji je za 62% pri tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ te 69% pri tretmanu s 500 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag. Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag prirast svježe mase biljaka smanjen je za 59% pri 25% N i P u hranjivoj otopini te za 72% u hranjivoj otopini s 10% N i P u usporedbi s kontrolom.



Slika 15. Prirast svježe mase biljaka (μ) *L. gibba* pri različitim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini (100, 50, 25 i 10%) i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

3.3. Apscizija frondova

Tretman ionskim koloidnim Ag uzrokovao je preuranjeno otpuštanje mladih biljaka od majčinske biljke pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini, što je rezultiralo manjim kolonijama (*Tablica 5*). Vrijednosti %FA povećavale su se s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini. Proces apscizije frondova pri tretmanu ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini (100%) bio je na vrhuncu nakon 8 h tretmana kada su vrijednosti %FA iznosile $22,22 \pm 4,32\%$ (100 $\mu\text{g/L}$), $25,00 \pm 4,41\%$ (200 $\mu\text{g/L}$), $27,78 \pm 4,05\%$ (500 $\mu\text{g/L}$) i $44,44 \pm 3,73\%$ (1000 $\mu\text{g/L}$). Nakon 24 h %FA bio je veći od kontrole pri tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag dok je nakon 48 h samo najveća koncentracija ionskog koloidnog Ag imala značajan utjecaj na raspad kolonija ($P < 0,05$). Kada su biljke tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji sa smanjenjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 50%, apscizija frondova bila je na vrhuncu već nakon 4 h tretmana. U tretmanu sa 100 $\mu\text{g/L}$ nakon 4 h raspalo se $25 \pm 4\%$ kolonija u pokusu. S povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag povećao se i postotak raspadnutih kolonija pa je tako pri 200 $\mu\text{g/L}$ raspadnuto $32 \pm 4\%$ kolonija, pri 500 $\mu\text{g/L}$ $38,89 \pm 3\%$ kolonija dok je koncentracija 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag uzrokovala raspad $48,61 \pm 4\%$ kolonija u pokusu. Kada je tretman ionskim koloidnim Ag bio u kombinaciji s 25% N i P u hranjivoj otopini, najviše vrijednosti %FA zabilježene su nakon 4 h za niže koncentracije Ag dok je pri najvećoj koncentraciji Ag vrhunac raspada kolonija bio nakon 12 h tretmana kada je $46,47 \pm 4\%$ kolonija bilo raspadnuto. Na proces preuranjenog otpuštanja biljaka iz kolonije u hranjivoj otopini s 10% N i P značajan utjecaj imala je samo najveća koncentracija ionskog koloidnog Ag (1000 $\mu\text{g/L}$) nakon 12 h kada je 18,06% kolonija bilo raspadnuto. Nakon 24 h i 48 h od početka tretmana s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag bilo je raspadnuto 17,22% i 20,99% kolonija.

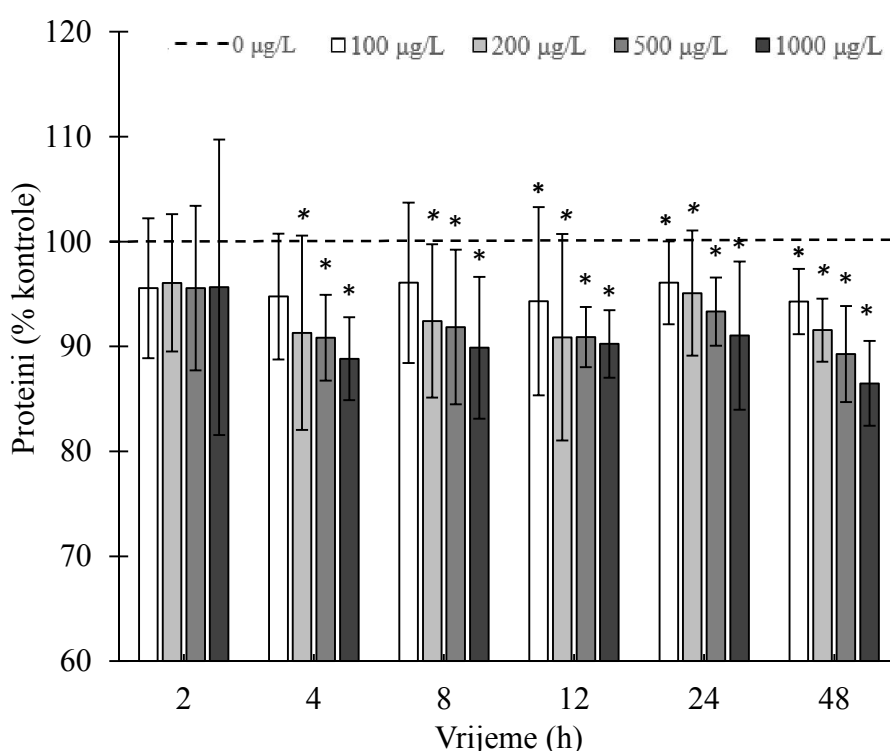
Tablica 5. Postotak apscizije frondova (%FA) *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

		%FA					
Tretman/Vrijeme		2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
N i P (%)	Ag (µg/L)						
100	0	0	0	0	0	3,33 ± 0,2	15,48 ± 3
	100	0	5,56 ± 1	22,22 ± 4*	19,44 ± 2*	17,06 ± 3	16,03 ± 9
	200	0	13,89 ± 1	25,00 ± 4*	24,83 ± 2*	23,33 ± 3*	20,56 ± 3
	500	0	16,67 ± 1	27,78 ± 4*	27,22 ± 2*	27,78 ± 3*	19,44 ± 3
	1000	0	22,22 ± 1*	44,44 ± 4*	43,06 ± 2*	37,50 ± 3*	34,17 ± 3*
50	0	0	0	0	3,33 ± 0,25	3,33 ± 0,25	14,68 ± 1
	100	0	25,00 ± 4*	26,39 ± 5*	22,78 ± 2*	16,17 ± 3	15,75 ± 2
	200	0	31,94 ± 4*	29,17 ± 4*	23,89 ± 2*	19,05 ± 2*	15,11 ± 2
	500	11,11 ± 1*	38,89 ± 3*	33,33 ± 3*	29,72 ± 2*	23,33 ± 2*	16,87 ± 1
	1000	15,28 ± 1*	48,61 ± 4*	48,61 ± 4*	41,67 ± 4*	34,17 ± 3*	23,21 ± 2*
25	0	0	0	0	6,67 ± 1	7,94 ± 1,5	12,00 ± 2
	100	0	25,00 ± 3*	20,83 ± 2*	26,67 ± 4*	26,11 ± 4*	22,22 ± 2*
	200	11,11 ± 2*	26,94 ± 3*	24,17 ± 3*	28,97 ± 4*	27,78 ± 3*	26,67 ± 3*
	500	16,67 ± 3*	40,83 ± 4*	40,83 ± 4*	37,50 ± 3*	34,44 ± 3*	28,97 ± 2*
	1000	22,22 ± 2*	40,28 ± 4*	40,28 ± 4*	46,67 ± 4*	37,78 ± 3*	32,54 ± 3*
10	0	0	0	7,50 ± 1	10,00 ± 2	17,78 ± 2	16,34 ± 2
	100	0	8,33 ± 1	13,89 ± 2	15,56 ± 2	16,94 ± 2	16,47 ± 2
	200	0	8,33 ± 1	8,33 ± 1	10,83 ± 2	16,67 ± 3	16,65 ± 3
	500	4,17 ± 1	4,17 ± 1	4,17 ± 1	6,67 ± 1	11,67 ± 2	16,13 ± 3
	1000	5,56 ± 2	9,72 ± 3	9,72 ± 3	18,06 ± 4*	17,22 ± 4*	20,99 ± 3*
	F	3,216	6,591	5,744	5,572	5,043	4,545
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.4. Koncentracija proteina

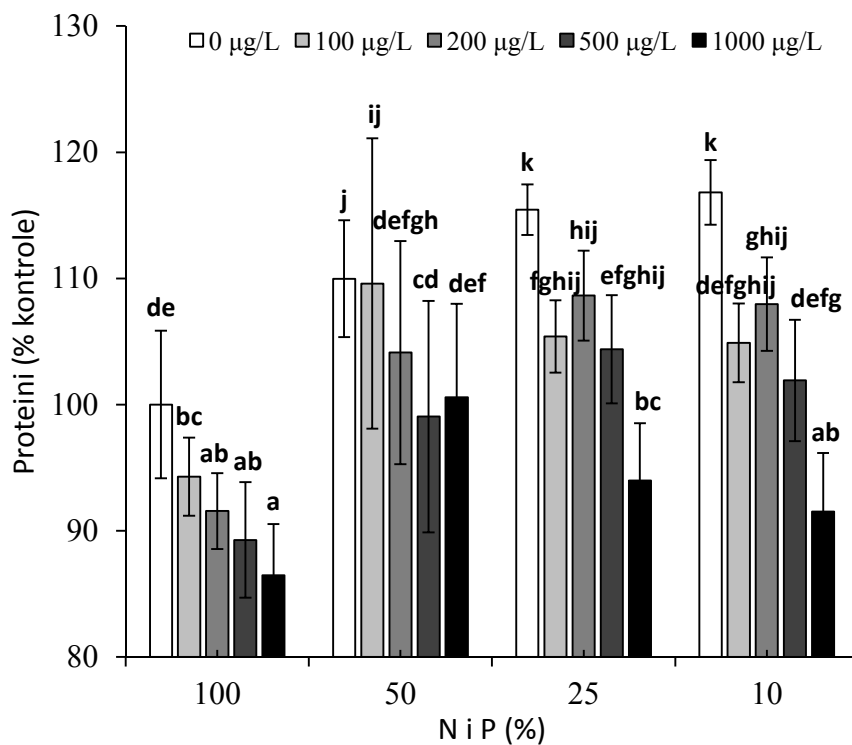
Koncentracija proteina u kontrolnim biljkama *L. gibba* tijekom pokusa u prosjeku je iznosila $15,813 \pm 0,164$ mg/g sv. tv. (Tablica 6). S povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini zabilježeno je smanjenje koncentracije proteina u biljkama (Slika 16). Statistički značajno smanjenje koncentracije proteina u biljkama uzgajanim u potpunoj hranjivoj otopini utvrđeno je nakon 4 h tretmana s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag ($P < 0,05$). Koncentracija proteina bila je u prosjeku manja za 7% pri 200 $\mu\text{g/L}$ Ag, 8% pri 500 $\mu\text{g/L}$ Ag i 13% pri 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag tijekom cijelog pokusa u usporedbi s kontrolnim biljkama. Pri tretmanu s najmanjom koncentracijom ionskog koloidnog Ag, značajno smanjenje koncentracije proteina u odnosu na kontrolne biljke zabilježeno je u pokusima koji su trajali 12 h i duže pri čemu je koncentracija proteina bila u prosjeku 5% manja u usporedbi s kontrolom (Slika 16).



Slika 16. Koncentracije proteina u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

U biljkama koje su tretirane s Ag u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P utvrđena je statistički značajno veća koncentracija proteina u usporedbi s kontrolom nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag (*Tablica 6*). Koncentracija proteina bila je veća za 10% pri 0 µg/L Ag, 9% pri 100 µg/L Ag te 8% veća pri tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag. Tijekom trajanja pokusa s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag utvrđen je pad koncentracije proteina u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% N i P iako to smanjenje nije bilo statistički značajno u usporedbi s kontrolom (*Tablica 6*). Slične promjene koncentracije proteina zabilježene su i u biljkama koje su uzgajane i tretirane u hranjivoj otopini s 25% i 10% koncentracije N i P (*Tablica 6*). Pri tretmanu s 0 µg/L, 100 µg/L i 200 µg/L ionskog koloidnog Ag koncentracija proteina bila je značajno veća u usporedbi s kontrolom. Međutim, tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 1000 µg/L uzrokovao je značajno smanjenje koncentracije proteina u biljkama 12, 24 i 48 h od početka tretmana. Nakon 24 h tretmana s 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag koncentracija proteina bila je 6% manja u biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 25% i 10% N i P.

Usporedba koncentracije proteina nakon 48 h tretmana ionskim koloidnom Ag u hranjivim otopinama s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 17*. Smanjenje koncentracije N i P u hranjivoj otopini bez dodatka ionskog koloidnog Ag (0 µg/L) uzrokovalo je povećanje koncentracije proteina u odnosu na kontrolu. Koncentracija proteina bila je 9% veća pri 50% N i P ($17,330 \pm 0,730$ mg/g sv. tv.), 15% veća pri 25% N i P ($18,192 \pm 0,318$ mg/g sv. tv.) te 17% veća pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini ($18,409 \pm 0,402$ mg/g sv. tv.). Iako je pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini pod utjecajem ionskog koloidnog Ag zabilježeno smanjenje koncentracije proteina u odnosu na odgovarajuću kontrolu to smanjenje nije bilo značajno u odnosu na kontrolu cijelog pokusa. Pri tretmanu najvećom koncentracijom Ag pri razrjeđenju N i P u hranjivoj otopini na 25% i 10% koncentracije proteina bila je manja za 6% i 9% u usporedbi s kontrolom cijelog pokusa dok je to smanjenje iznosilo 19% i 22% u usporedbi s odgovarajućom kontrolom za svako razrjeđenje N i P u hranjivoj otopini posebno (*Slika 17*).



Slika 17. Koncentracije proteina u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

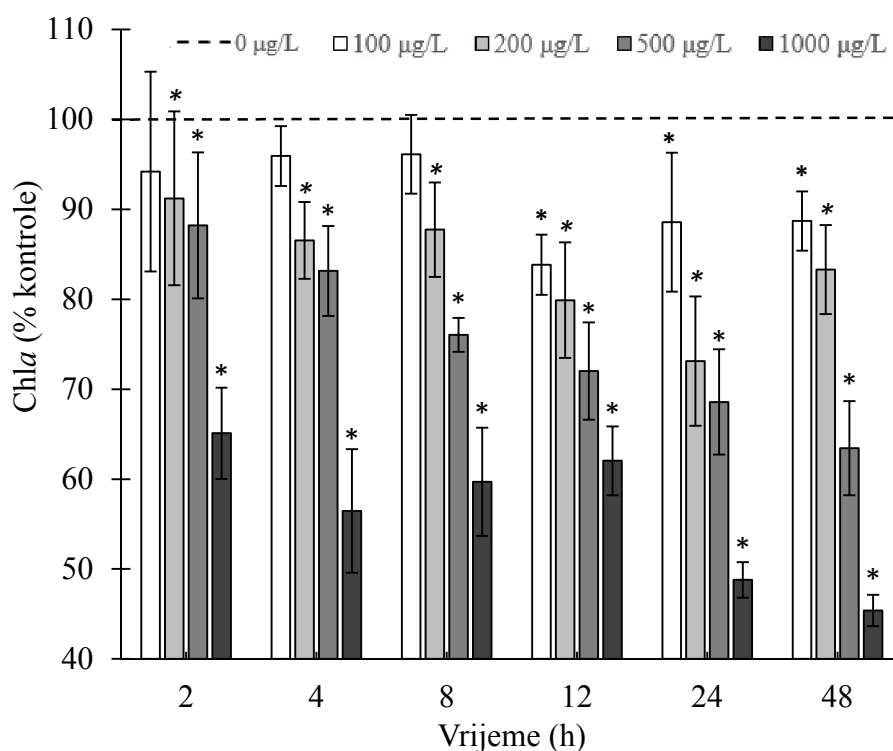
Tablica 6. Koncentracije proteina u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman / Vrijeme		Proteini (mg/g sv. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	15,925 ± 1,294	15,997 ± 1,997	15,813 ± 1,340	15,860 ± 0,554	15,524 ± 0,988	15,758 ± 0,921
	100	15,216 ± 1,061	15,158 ± 0,960	15,191 ± 1,209	14,958 ± 1,425*	14,913 ± 0,612*	14,857 ± 0,489*
	200	15,298 ± 1,043	14,605 ± 1,481*	14,617 ± 1,156*	14,413 ± 1,561*	14,761 ± 0,925*	14,428 ± 0,474*
	500	15,220 ± 1,249	14,529 ± 0,653*	14,525 ± 1,167*	14,417 ± 0,456*	14,488 ± 0,506*	14,067 ± 0,722*
	1000	15,231 ± 2,242	14,209 ± 0,633*	14,212 ± 1,068*	14,313 ± 0,510*	14,132 ± 1,095*	13,627 ± 0,638*
50	0	17,492 ± 0,979*	17,596 ± 2,197*	17,466 ± 2,083*	17,340 ± 0,577*	17,285 ± 0,644*	17,330 ± 0,730*
	100	17,405 ± 0,809*	16,673 ± 1,056*	16,563 ± 1,097*	16,837 ± 0,985*	17,283 ± 1,342*	17,271 ± 1,815*
	200	17,232 ± 1,814*	16,066 ± 1,629	15,957 ± 1,614	16,003 ± 1,611	16,736 ± 1,421	16,408 ± 1,393
	500	17,149 ± 1,552*	15,982 ± 0,719	15,875 ± 0,767	16,046 ± 0,957	15,920 ± 1,476	15,608 ± 1,447
	1000	17,167 ± 1,016*	15,629 ± 0,696	15,526 ± 0,750	15,579 ± 0,954	16,166 ± 1,193	15,849 ± 1,169
25	0	18,246 ± 0,607*	18,279 ± 0,661*	18,411 ± 0,569*	18,409 ± 0,282*	18,347 ± 0,310*	18,192 ± 0,318*
	100	17,409 ± 0,667*	17,344 ± 0,771*	16,906 ± 0,475	16,550 ± 0,442	16,454 ± 0,408*	16,610 ± 0,453*
	200	17,551 ± 0,611*	17,329 ± 0,593*	16,989 ± 0,578	17,045 ± 0,490	16,938 ± 0,487*	17,119 ± 0,563*
	500	16,704 ± 0,503	16,775 ± 0,610	16,714 ± 0,751	16,381 ± 0,800	16,312 ± 0,704	16,449 ± 0,677
	1000	15,482 ± 0,502	15,347 ± 0,684	15,035 ± 0,654	14,682 ± 0,738*	14,589 ± 0,710*	14,811 ± 0,714*
10	0	18,602 ± 0,414*	18,237 ± 0,405*	18,236 ± 0,283*	18,318 ± 0,262*	18,227 ± 0,398*	18,409 ± 0,402*
	100	16,702 ± 0,500*	16,374 ± 0,490	16,373 ± 0,416	16,447 ± 0,405*	16,365 ± 0,486*	16,529 ± 0,491*
	200	17,191 ± 0,595*	16,854 ± 0,583	16,853 ± 0,518	16,929 ± 0,510*	16,844 ± 0,579*	17,013 ± 0,585*
	500	16,557 ± 0,784	16,232 ± 0,769	16,231 ± 0,724	16,305 ± 0,720	16,223 ± 0,765	16,061 ± 0,758
	1000	16,428 ± 0,809	16,106 ± 0,793	16,106 ± 0,774	14,642 ± 0,703*	14,568 ± 0,740*	14,423 ± 0,733*
	F	7,356	9,833	8,533	13,803	16,04	18,945
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.5. Koncentracije klorofila *a* i klorofila *b*

U biljkama koje su uzgajane i tretirane u potpunoj hranjivoj otopini koncentracija 100 $\mu\text{g/L}$ Ag nije imala statistički značajan učinak na koncentraciju klorofila *a* (Chla) u biljkama nakon 2, 4 i 8 h tretmana, dok je nakon 12 h tretmana koncentracija Chla bila manja za 17% u usporedbi s kontrolom (Slika 18). Nakon 24 h ($7,414 \pm 0,646$ mg/g sh. tv.) i 48 h ($7,852 \pm 0,291$ mg/g sh. tv.) izmjerena koncentracija Chla bila je manja za 12% u odnosu na kontrolu. Tretman biljaka *L. gibba* s 200 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini značajno je smanjio koncentraciju Chla nakon 2 h tretmana za 9% u odnosu na kontrolu. S povećanjem trajanja pokusa koncentracija Chla u tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ Ag dodatno se smanjila, a najmanja vrijednost izmjerena je nakon 24 h ($6,121 \pm 0,601$ mg/g sh. tv.). Kada su biljke tretirane s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag koncentracija Chla značajno je smanjena već nakon 2 h tretmana. S povećanjem trajanja pokusa zabilježeno je daljnje smanjenje koncentracije Chla. Najmanje vrijednosti izmjerene su nakon 48 h tretmana i iznosile su $5,616 \pm 0,464$ mg/g sh. tv. pri tretmanu s 500 $\mu\text{g/L}$ i $4,017 \pm 0,155$ mg/g sh. tv. pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ (Slika 18).



Slika 18. Koncentracije klorofila *a* (Chla) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

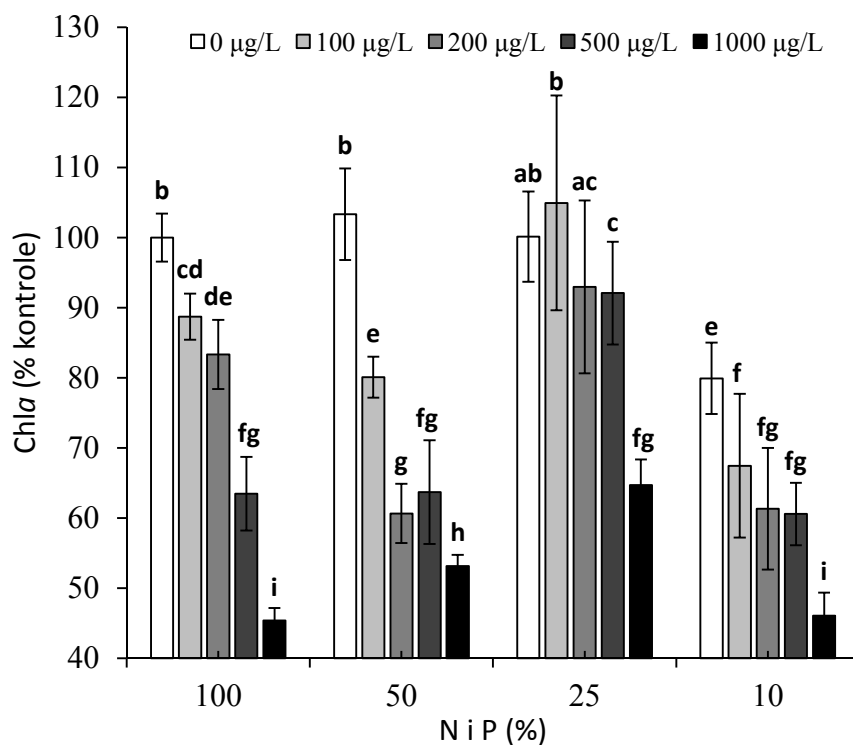
Koncentracija Chla u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 50% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag nakon 12 i 24 h bila je veća za 7 i 8% od kontrole dok je dodatak ionskog koloidnog Ag značajno smanjio koncentraciju Chla (*Tablica 7*). Značajno smanjenje koncentracije Chla zabilježeno je nakon 2 h tretmana s 200 (10%), 500 (15%) i 1000 µg/L (19%). Produženjem trajanja pokusa na 12 h i duže zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije Chla pri svim koncentracijama Ag. Najveće smanjenje koncentracije Chla zabilježeno je nakon 48 h kada je utvrđeno smanjenje iznosilo 20% pri tretmanu sa 100 µg/L, 40% pri tretmanu s 200 µg/L, 37% pri tretmanu s 500 µg/L te 47% pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag.

U biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 25% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag također je utvrđena značajno veća koncentracija Chla nakon 8, 12 i 24 h u usporedbi s kontrolom (*Tablica 7*). Povećanje koncentracije u prosjeku je iznosilo 5,33%. Povećanje koncentracije Chla u usporedbi s kontrolom utvrđeno je i pri tretmanu sa 100 µg/L ionskog koloidnog Ag nakon 8, 12 i 24% u usporedbi s kontrolom. Značajno smanjenje koncentracije Chla tijekom cijelog pokusa zabilježeno je samo u tretmanu s 1000 µg/L i u prosjeku je iznosilo 34% u odnosu na kontrolu. Nakon 48 h značajno manje Chla zabilježeno je u tretmanima s ionskim koloidnom Ag koncentracije 200 µg/L ($8,228 \pm 1,092$ mg/g sh. tv.), 500 ($8,149 \pm 0,648$ mg/g sh. tv.) i 1000 µg/L ($5,757 \pm 0,323$ mg/g sh. tv.) (*Tablica 7*).

Koncentracija Chla u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa bila je značajno manja u usporedbi s kontrolom (*Tablica 7*). Dodatak ionskog koloidnog Ag dodatno je smanjio koncentraciju Chla ovisno o koncentraciji Ag i trajanju tretmana. Značajno smanjenje koncentracije Chla zabilježeno je već nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag, kada je koncentracija bila manja od kontrole za 18% (100 µg/L), 25% (200 µg/L i 500 µg/L) te 42% (1000 µg/L). Najmanja koncentracija Chla ($4,075 \pm 0,291$ mg/g sh. tv.) izmjerena je nakon 48 h tretmana s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag i predstavlja 54% manji sadržaj Chla u usporedbi s kontrolnim biljkama ($8,676 \pm 0,228$ mg/g sh. tv.).

Usporedbom vrijednosti koncentracije Chla nakon 48 h od početka pokusa vidi se značajan utjecaj nutrijenata na odgovor biljaka (*Slika 19*). Smanjenje koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 50 i 25% nije imalo značajan utjecaj na Chla. S druge strane, koncentracija N i P 10% u hranjivoj otopini uzrokovalo je značajno smanjenje koncentracije Chla za 20% u odnosu na kontrolu. Osim toga, smanjenje koncentracije Chla u tretmanu s ionskim koloidnim Ag bilo je manje izraženo kada su biljke uzgajane na hranjivim podlogama s 50 i 25% koncentracije N

i P u odnosu na kontrolu. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 1000 $\mu\text{g/L}$, nakon 48 h, smanjio je koncentraciju Chla u potpunoj hranjivoj otopini za 55%, u hranjivoj otopini s 50% N i P za 47% , za 35% u hranjivoj otopini s 25% N i P te za 54% u hranjivoj otopini s 10% N i P (Slika 19).



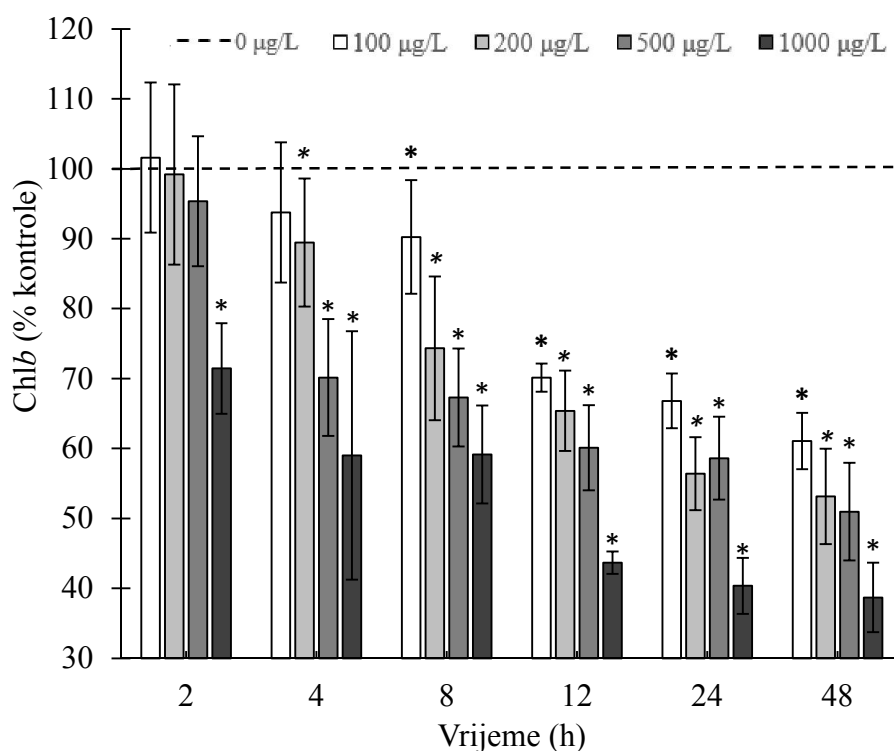
Slika 19. Koncentracije klorofila *a* (Chla) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 7. Koncentracije klorofila *a* (Chla) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman / Vrijeme		Chla (mg/g sh. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	9,000 ± 0,598	8,726 ± 0,570	8,552 ± 0,731	8,562 ± 0,326	8,370 ± 0,675	8,851 ± 0,304
	100	8,478 ± 0,999	8,371 ± 0,291	8,220 ± 0,374	7,179 ± 0,287*	7,414 ± 0,646*	7,852 ± 0,291*
	200	8,210 ± 0,869*	7,552 ± 0,374*	7,504 ± 0,449*	6,841 ± 0,551*	6,121 ± 0,601*	7,374 ± 0,437*
	500	7,940 ± 0,730*	7,255 ± 0,438*	6,503 ± 0,161*	6,166 ± 0,464*	5,740 ± 0,490*	5,616 ± 0,464*
	1000	5,859 ± 0,456*	4,927 ± 0,599*	5,105 ± 0,514*	5,311 ± 0,328*	4,085 ± 0,166*	4,017 ± 0,155*
50	0	9,246 ± 0,603	9,263 ± 0,615	9,084 ± 0,557	9,162 ± 0,476*	9,035 ± 0,333*	9,148 ± 0,578
	100	9,131 ± 0,405	9,126 ± 0,413	8,246 ± 0,458	7,688 ± 0,447*	7,343 ± 0,411*	7,087 ± 0,259*
	200	8,078 ± 0,401*	7,967 ± 0,418*	6,639 ± 0,348*	6,151 ± 0,507*	5,816 ± 0,448*	5,367 ± 0,374*
	500	7,632 ± 0,611*	7,521 ± 0,534*	6,268 ± 0,445*	6,195 ± 0,429*	5,846 ± 0,509*	5,635 ± 0,655*
	1000	7,264 ± 0,458*	7,153 ± 0,295*	5,961 ± 0,246*	5,747 ± 0,158*	5,646 ± 0,166*	4,705 ± 0,139*
25	0	8,936 ± 0,730	8,683 ± 0,441	8,967 ± 0,540*	8,958 ± 0,540*	8,905 ± 0,608*	8,863 ± 0,570
	100	9,189 ± 1,197	9,282 ± 1,252	9,244 ± 1,319*	9,234 ± 1,317*	9,328 ± 1,331*	9,289 ± 1,355
	200	8,392 ± 1,014*	8,475 ± 1,051*	8,438 ± 1,097	8,429 ± 1,096	8,264 ± 1,074	8,228 ± 1,092*
	500	8,322 ± 0,688*	8,401 ± 0,672*	8,359 ± 0,661	8,350 ± 0,660	8,186 ± 0,647	8,150 ± 0,648*
	1000	5,842 ± 0,207*	5,900 ± 0,240*	5,873 ± 0,304*	5,867 ± 0,303*	5,752 ± 0,297*	5,728 ± 0,323*
10	0	7,148 ± 0,584*	7,220 ± 0,590*	7,102 ± 0,631*	7,022 ± 0,372*	7,395 ± 0,693*	7,074 ± 0,451*
	100	7,351 ± 0,958*	7,034 ± 1,152*	6,456 ± 1,052*	6,262 ± 1,021*	6,137 ± 1,000*	5,970 ± 0,907*
	200	6,714 ± 0,811*	6,416 ± 0,952*	5,884 ± 0,833*	5,707 ± 0,808*	5,593 ± 0,792*	5,425 ± 0,768*
	500	6,774 ± 0,278*	6,465 ± 0,433*	5,934 ± 0,438*	5,756 ± 0,425*	5,526 ± 0,408*	5,360 ± 0,395*
	1000	5,258 ± 0,186*	5,024 ± 0,411*	4,607 ± 0,329*	4,469 ± 0,319*	4,290 ± 0,306*	2,245 ± 0,291*
	F	21,753	33,377	38,887	43,196	47,225	68,769
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

Koncentracija klorofila *b* (Chl*b*), kao i koncentracija Chl*a*, smanjivala se s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 20). Pri koncentraciji 100 µg/L Ag Chl*b* bila je 10% manja u usporedbi s kontrolom nakon 8 h tretmana. Povećanjem vremena izloženosti koncentracija Chl*b* pri 100 µg/L Ag bila je manja za 30% (12 h), 33% (24 h) i 39% (48 h). Koncentracija Chl*b* bila je 11% (4h), 24% (8 h), 35% (12 h), 44% (24 h) i 47% (48 h) manja u tretmanu s 200 µg/L Ag u usporedbi s kontrolom. Kada su biljke tretirane s 500 µg/L Ag u hranjivoj otopini koncentracija Chl*b* značajno je smanjena nakon 4 h (30%) te se s povećanjem vremena trajanja tretmana koncentracija Chl*b* dodatno smanjivala za 42% nakon 24 h i 49% nakon 48 h tretmana. Tretman s 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa imao je značajan utjecaj na koncentraciju Chl*b*. Najmanja vrijednosti koncentracije Chl*b* izmjerena nakon 48 h ($1,103 \pm 0,142$ mg/g sh. tv.) bila je 61% manja u usporedbi s kontrolom (Slika 20).



Slika 20. Koncentracije klorofila *b* (Chl*b*) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

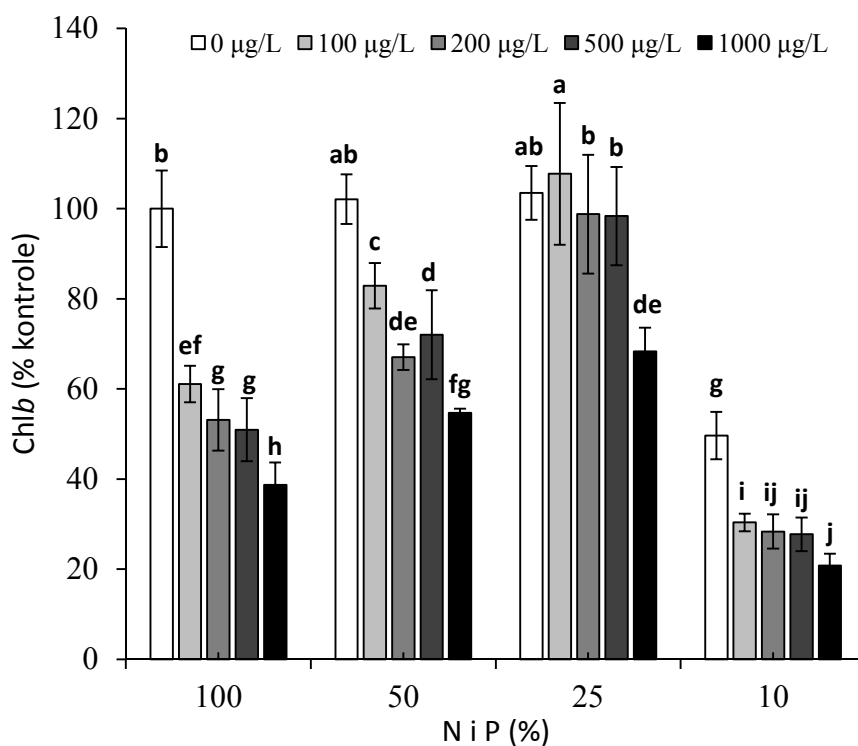
U biljkama koje su tretirane s Ag u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P, značajno smanjenje koncentracije Chlb zabilježeno je nakon 2 h tretmana s 200 (11%), 500 (13%) i 1000 µg/L (23%) (Tablica 8). Produženjem trajanja pokusa na 12 h i duže zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije Chlb pri svim koncentracijama Ag. Najveće smanjenje koncentracije Chlb zabilježeno je nakon 48 h kada je utvrđeno smanjenje od 17% pri tretmanu sa 100 µg/L, 33% pri tretmanu s 200 µg/L, 28% pri tretmanu s 500 µg/L te 45% pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag.

Kada su biljke uzgajane na hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag utvrđena je značajno veća koncentracija Chlb nakon 8 i 12 h u usporedbi s kontrolom (Tablica 8). Povećanje koncentracije u prosjeku je iznosilo 9,5%. Povećanje koncentracije Chlb u usporedbi s kontrolom utvrđeno je i pri tretmanu sa 100 µg/L ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa. Značajno smanjenje koncentracije Chlb tijekom cijelog pokusa zabilježeno je samo u tretmanu s 1000 µg/L i u prosjeku je iznosilo 28% u odnosu na kontrolu.

Koncentracija Chlb u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa bila je značajno manja u usporedbi s kontrolom (Tablica 8). Dodatak ionskog koloidnog Ag uzrokovao je dodatno smanjenje koncentracije Chlb u stanicama *L. gibba* ovisno o koncentraciji Ag i trajanju tretmana. Značajno smanjenje koncentracije Chlb zabilježeno je već nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag, kada je koncentracija bila manja od kontrole za 47% (100 µg/L), 52% (200 µg/L i 500 µg/L) te 66% (1000 µg/L). Najveće smanjenje koncentracije Chlb utvrđeno je nakon 48 h od početka tretmana, kada je koncentracija bila manja 70% (100 µg/L), 72% (200 µg/L i 500 µg/L) te 80% (1000 µg/L). Najmanja koncentracija Chlb ($0,593 \pm 0,075$ mg/g sh. tv.) izmjerena je nakon 48 h tretmana s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag i predstavlja 80% manji sadržaj Chlb u usporedbi s kontrolnim biljkama.

Usporedbom vrijednosti koncentracije Chlb nakon 48 h od početka pokusa vidi se značajan utjecaj nutrijenata na odgovor biljaka (Slika 21). Kao i u slučaju Chla, smanjenje koncentracije N i P u hranjivoj otopini na 50 i 25% nije imalo značajan utjecaj na Chlb, dok je 10% N i P u hranjivoj otopini uzrokovalo značajno smanjenje koncentracije Chlb za 51% u odnosu na kontrolu. Osim toga, smanjenje koncentracije Chlb u tretmanima sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag bilo je manje izraženo kada su biljke uzgajane na hranjivim podlogama

s 50 i 25% koncentracije N i P u odnosu na kontrolu. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 1000 $\mu\text{g/L}$, nakon 48 h, smanjio je koncentraciju Chlb u potpunoj hranjivoj otopini za 61%, u hranjivoj otopini s 50% N i P za 45% te za 32% u hranjivoj otopini s 25% N i P. Nasuprot tome, smanjenje koncentracije Chlb bilo je statistički najveće pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P.



Slika 21. Koncentracije klorofila *b* (Chl*b*) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

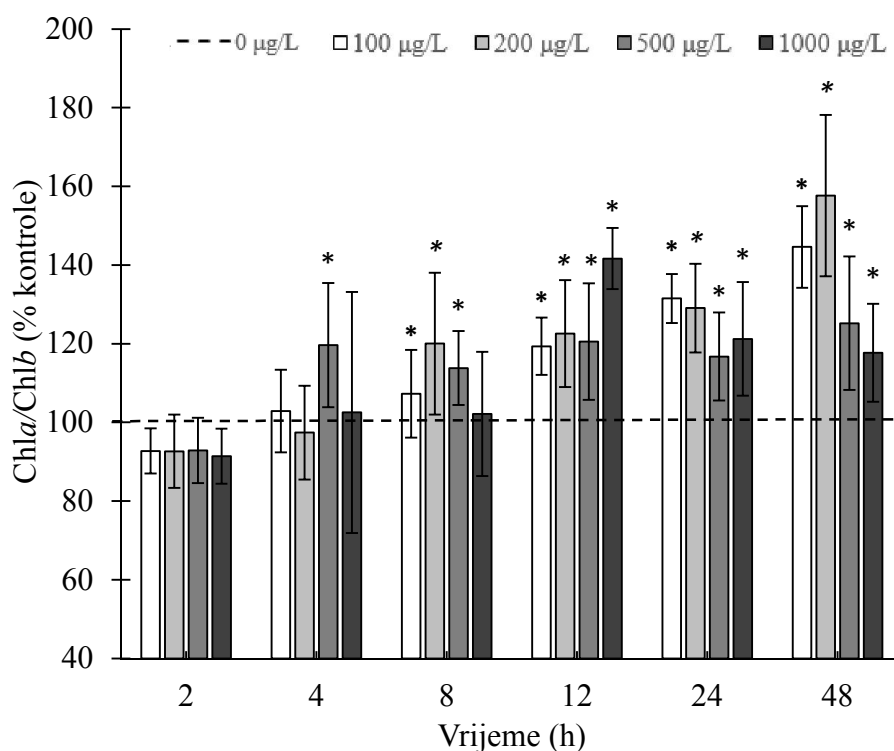
Tablica 8. Koncentracije klorofila *b* (Chl*b*) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman / Vrijeme		Chl <i>b</i> (mg/g sh. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	2,905 ± 0,179	2,795 ± 0,235	2,813 ± 0,110	2,778 ± 0,194	2,772 ± 0,304	2,849 ± 0,242
	100	2,951 ± 0,312	2,621 ± 0,280	2,539 ± 0,228*	1,948 ± 0,056*	1,852 ± 0,109*	1,741 ± 0,115*
	200	2,881 ± 0,375	2,500 ± 0,256*	2,091 ± 0,289*	1,816 ± 0,160*	1,563 ± 0,145*	1,515 ± 0,194*
	500	2,770 ± 0,270	1,961 ± 0,233*	1,893 ± 0,197*	1,669 ± 0,169*	1,624 ± 0,164*	1,452 ± 0,199*
	1000	2,075 ± 0,188*	1,650 ± 0,496*	1,664 ± 0,197*	1,213 ± 0,045*	1,119 ± 0,111*	1,103 ± 0,142*
50	0	2,948 ± 0,155	2,958 ± 0,170	2,958 ± 0,170	2,996 ± 0,160	2,909 ± 0,155	2,909 ± 0,156
	100	2,835 ± 0,231	2,837 ± 0,218	2,837 ± 0,218	2,579 ± 0,199*	2,504 ± 0,193*	2,362 ± 0,143*
	200	2,600 ± 0,273*	2,421 ± 0,277*	2,421 ± 0,277*	2,200 ± 0,252*	2,136 ± 0,244*	1,910 ± 0,081*
	500	2,520 ± 0,299*	2,391 ± 0,272*	2,391 ± 0,272*	2,174 ± 0,247*	2,111 ± 0,240*	2,052 ± 0,281*
	1000	2,224 ± 0,123*	2,297 ± 0,039*	2,297 ± 0,039*	2,088 ± 0,035*	2,027 ± 0,034*	1,559 ± 0,026*
25	0	3,006 ± 0,314	3,036 ± 0,318	3,067 ± 0,321*	3,058 ± 0,341*	2,920 ± 0,169	2,949 ± 0,171
	100	3,243 ± 0,420*	3,276 ± 0,425*	3,147 ± 0,408*	3,012 ± 0,388*	3,040 ± 0,444*	3,070 ± 0,449*
	200	2,859 ± 0,351	2,888 ± 0,355	2,917 ± 0,358	2,907 ± 0,358	2,787 ± 0,372	2,815 ± 0,376
	500	2,908 ± 0,333	2,880 ± 0,330	2,909 ± 0,333	2,899 ± 0,339	2,775 ± 0,308	2,803 ± 0,311
	1000	2,079 ± 0,137*	2,058 ± 0,136*	2,079 ± 0,137*	2,072 ± 0,140*	1,987 ± 0,153*	1,947 ± 0,150*
10	0	1,416 ± 0,058*	1,417 ± 0,093*	1,400 ± 0,052*	1,383 ± 0,091*	1,342 ± 0,161*	1,415 ± 0,150*
	100	1,532 ± 0,164*	1,303 ± 0,175*	1,270 ± 0,120*	0,972 ± 0,031*	0,941 ± 0,062*	0,865 ± 0,056*
	200	1,393 ± 0,186*	1,251 ± 0,137*	1,013 ± 0,150*	0,903 ± 0,082*	0,770 ± 0,066*	0,808 ± 0,109*
	500	1,388 ± 0,154*	0,999 ± 0,054*	0,946 ± 0,115*	0,812 ± 0,088*	0,827 ± 0,094*	0,791 ± 0,106*
	1000	0,993 ± 0,077*	0,929 ± 0,118*	0,854 ± 0,104*	0,606 ± 0,023*	0,553 ± 0,062*	0,593 ± 0,075*
	F	48,961	51,596	74,146	112,78	105,64	115,96
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.6. Omjer klorofil *a*/klorofil *b*

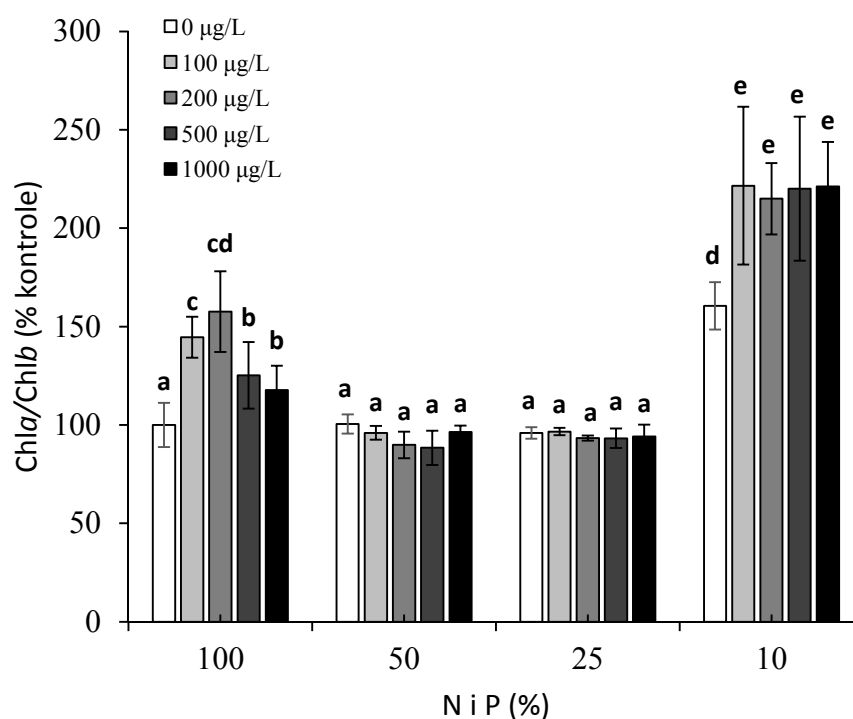
Omjer klorofil *a*/klorofil *b* (Chla/Chlb) u biljkama koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini značajno se povećao već nakon 4 h tretmana s 500 µg/L ionskog koloidnog Ag ($3,748 \pm 0,494$) u odnosu na kontrolu ($3,133 \pm 0,224$) (Slika 22, Tablica 9). Nakon 8 h značajno povećanje omjera Chla/Chlb utvrđeno je pri tretmanu s ionskim koloidnim Ag koncentracija 100, 200 i 500 µg/L. Kada su pokusi trajali 12 h i duže, pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag značajno je povišen omjer Chla/Chlb. Nakon 48 h omjer Chla/Chlb u biljkama u potpunoj hranjivoj otopini bio je 45% (100 µg/L), 57% (200 µg/L), 25% (500 µg/L) i 18% (1000 µg/L) veći od kontrole (Slika 22).



Slika 22. Omjer klorofil *a*/klorofil *b* (Chla/Chlb) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

U biljkama koje su ionskim koloidnim Ag tretirane u hranjivoj otopini s 50% i 25% koncentracije N i P tijekom trajanja pokusa nisu utvrđene statistički značajne promjene omjera Chla/Chlb (Tablica 9). Omjer Chla/Chlb u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom

s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa bilo je značajno veći u usporedbi s kontrolom (*Tablica 9*). Dodatak ionskog koloidnog Ag također je uzrokovao povećanje omjera Chla/Chlb u stanicama *L. gibba* ovisno o koncentraciji Ag i trajanju tretmana. Značajno povećanje Chla/Chlb zabilježeno je već nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag, kada je omjer bio veći od kontrole za 54% (100 $\mu\text{g/L}$), 56% (200 $\mu\text{g/L}$), 59% (500 $\mu\text{g/L}$) te 71% (1000 $\mu\text{g/L}$). Najveći omjer Chla/Chlb ($7,830 \pm 1,012$) utvrđen je nakon 24 h tretmana s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag i predstavlja 157% veću vrijednost u usporedbi s kontrolnim biljkama (*Tablica 9*). Nakon 48 h od početka tretmana ionsko koloidno Ag nije imalo značajan utjecaj na omjer Chla/Chlb u biljkama koje su tretirane u hranjivim otopinama s 25 i 10% koncentracije N i P (*Slika 23*). Pri djelovanju iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke utvrđene su statistički značajno veće vrijednosti omjera Chla/Chlb u biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke uzgajane u hranjivoj otopini s većim koncentracijama N i P (*Slika 23*).



Slika 23. Omjer klorofil *a*/klorofil *b* (Chla/Chlb) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 9. Omjer klorofil *a*/klorofil *b* (Chla/Chlb) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		Chla/Chlb					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	3,101 ± 0,145	3,133 ± 0,224	3,041 ± 0,250	3,092 ± 0,190	3,043 ± 0,312	3,131 ± 0,351
	100	2,875 ± 0,177	3,224 ± 0,329	3,263 ± 0,339*	3,690 ± 0,226*	4,001 ± 0,190*	4,527 ± 0,325*
	200	2,872 ± 0,289	3,051 ± 0,373	3,650 ± 0,548*	3,790 ± 0,420*	3,926 ± 0,344*	4,936 ± 0,642*
	500	2,879 ± 0,257	3,748 ± 0,494*	3,461 ± 0,286*	3,727 ± 0,459*	3,552 ± 0,340*	3,920 ± 0,531*
	1000	2,834 ± 0,217	3,213 ± 0,960	3,106 ± 0,480	4,379 ± 0,240*	3,688 ± 0,440*	3,685 ± 0,390*
50	0	3,140 ± 0,199	3,141 ± 0,281	3,080 ± 0,255	3,064 ± 0,202	3,111 ± 0,148	3,146 ± 0,151
	100	3,234 ± 0,217	3,237 ± 0,323	2,925 ± 0,311	2,997 ± 0,291	2,948 ± 0,284	3,005 ± 0,108
	200	3,137 ± 0,359	3,330 ± 0,419	2,775 ± 0,349	2,814 ± 0,278	2,744 ± 0,289	2,813 ± 0,213
	500	3,049 ± 0,251	3,187 ± 0,468	2,656 ± 0,390	2,887 ± 0,422	2,803 ± 0,426	2,767 ± 0,275
	1000	3,273 ± 0,249	3,115 ± 0,144	2,596 ± 0,120	2,754 ± 0,094	2,786 ± 0,097	3,018 ± 0,105
25	0	2,980 ± 0,127	2,884 ± 0,302	2,938 ± 0,196	2,946 ± 0,216	3,050 ± 0,088	3,006 ± 0,091
	100	2,835 ± 0,089	2,834 ± 0,118	2,938 ± 0,168	3,067 ± 0,196	3,070 ± 0,054	3,026 ± 0,060
	200	2,938 ± 0,083	2,938 ± 0,115	2,896 ± 0,160	2,904 ± 0,180	2,966 ± 0,033	2,924 ± 0,042
	500	2,874 ± 0,162	2,931 ± 0,179	2,889 ± 0,203	2,897 ± 0,218	2,961 ± 0,159	2,918 ± 0,156
	1000	2,819 ± 0,185	2,875 ± 0,200	2,834 ± 0,220	2,842 ± 0,233	2,904 ± 0,185	2,950 ± 0,187
10	0	5,046 ± 0,332*	5,121 ± 0,608*	5,068 ± 0,282*	5,106 ± 0,566*	5,545 ± 0,517*	5,025 ± 0,377*
	100	4,792 ± 0,259*	5,386 ± 0,281*	5,120 ± 0,928*	6,429 ± 0,921*	6,539 ± 1,096*	6,939 ± 1,255*
	200	4,824 ± 0,128*	5,216 ± 1,236*	5,840 ± 0,569*	6,342 ± 0,860*	7,319 ± 1,223*	6,731 ± 0,568*
	500	4,917 ± 0,400*	6,488 ± 0,601*	6,317 ± 0,550*	7,121 ± 0,527*	6,762 ± 0,975*	6,893 ± 1,146*
	1000	5,314 ± 0,381*	5,487 ± 0,865*	5,496 ± 1,011*	7,380 ± 0,619*	7,830 ± 1,012*	6,292 ± 0,708*
	F	87,079	31,201	49,700	96,311	69,362	70,673
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

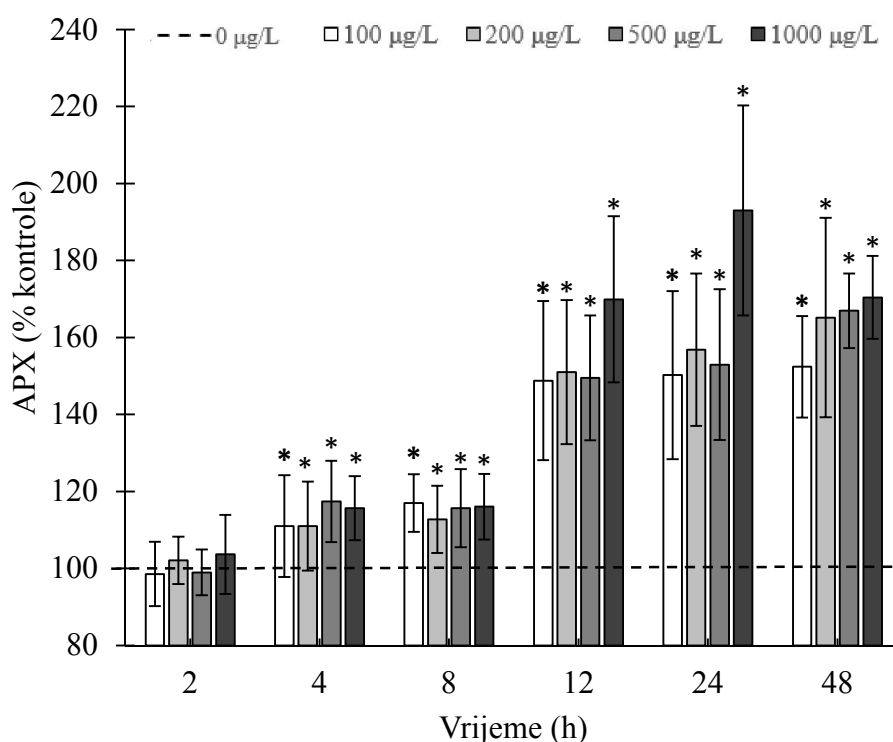
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

3.7. Komponente antioksidacijskog odgovora

3.7.1. Enzimski antioksidansi

3.7.1.1. Aktivnost askorbat-peroksidaze

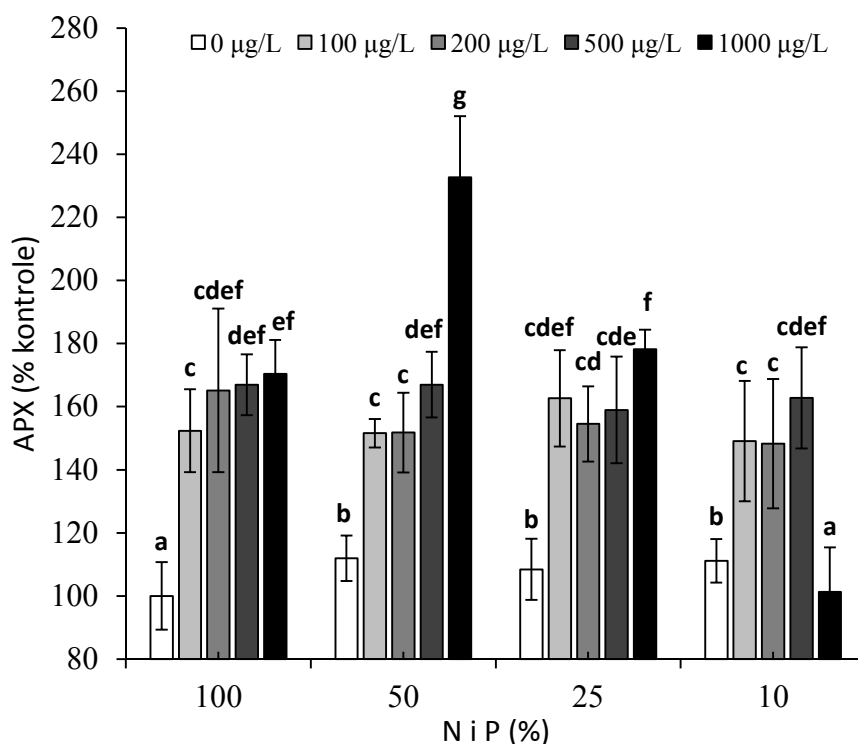
Tretman ionskim koloidnim Ag nije imao značajan utjecaj na aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u stanicama *L. gibba* nakon 2 h tretmana u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 24). Nakon 4 h tretmana i do kraja pokusa pri svim koncentracijama Ag u pokusu zabilježeno je statistički značajno povećanje aktivnosti APX. Aktivnost APX u biljkama tretiranim s ionskim koloidnim Ag koncentracije 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ nakon 12 h tretmana u prosjeku je porasla za 50% dok je u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ aktivnost bila veća 70% u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$). Aktivnost APX u biljkama uzorkovanim 24 h nakon početka tretmana s Ag bila je statistički značajno veća u usporedbi s kontrolom uz najveću vrijednost izmjerenu pri koncentraciji 1000 $\mu\text{g/L}$ (93% povećanje; $P < 0,01$). Nakon 48 h tretmana sa 100 $\mu\text{g/L}$ aktivnost APX bila je 52% veća, pri 200 $\mu\text{g/L}$ 65% veća, pri 500 $\mu\text{g/L}$ 67% veća dok je pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag zabilježeno povećanje aktivnosti APX iznosilo 70% u usporedbi s aktivnosti u kontrolnim biljkama.



Slika 24. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

U biljkama koje su uzgajane u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama N i P aktivnost APX bila je statistički značajno veća od kontrole pri svim tretmanima i tijekom cijelog pokusa (*Tablica 10*). Dodatkom ionskog koloidnog Ag biljkama u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P zabilježen je dodatni porast aktivnosti APX. Već nakon 2 h tretmana s najmanjom koncentracijom ionskog koloidnog Ag aktivnost APX iznosila je $0,380 \pm 0,009 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$, što je 31% veća vrijednost u uspoređivanju s kontrolom ($0,289 \pm 0,024 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$) dok je u tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag aktivnost APX bila viša 39% u uspoređivanju s kontrolom. S produženjem trajanja izloženosti povećavala se aktivnost APX. Nakon 48 h aktivnost APX u biljkama koje su rasle na hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bila je 51% veća pri 100 $\mu\text{g/L}$, 59% veća pri 200 $\mu\text{g/L}$, 67% veća pri 500 $\mu\text{g/L}$ te 132% veća od kontrole pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag (*Tablica 10*). U biljkama koje su uzgajane i tretirane u hranjivim otopinama s 25% i 10% N i P zabilježene su slične promjene kao i u biljkama pri 50% N i P u hranjivoj otopini (*Tablica 10*). Aktivnost APX u odnosu na kontrolu bila je značajno povišena već samim snižavanjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini te je dodatkom ionskog koloidnog Ag dodatno rasla. Već nakon 2 h tretmana s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag aktivnost APX bila je 61% veća od kontrole u biljkama u hranjivoj otopini s 25% N i P te 56% veća u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 10% N i P (*Tablica 10*). U biljkama *L. gibba* koje su uzgajane pri 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini s porastom koncentracije ionskog koloidnog Ag i s vremenom trajanja pokusa zabilježen je daljnji rast aktivnosti APX. Najveća aktivnost utvrđena nakon 48 h tretmana s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag iznosila je $0,551 \pm 0,019 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ što je 78% veća vrijednost od kontrole. Nasuprot tome, u biljkama koje su rasle u otopini s 10% koncentracije N i P progresivan porast aktivnosti APX zabilježen je pri tretmanu sa 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag te su aktivnosti APX nakon 48 h bile 63%, 55% i 59% veće od kontrole. U tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag u kombinaciji s 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini aktivnost APX bila je najveća nakon 8 h tretmana kada je iznosila $0,463 \pm 0,019 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$ (60% veća aktivnost u uspoređivanju s kontrolom). Nakon 12 h aktivnosti je bila 38% veća od kontrole dok je nakon 24 h aktivnost bila veća za 5,6% od kontrole. Nakon 48 h aktivnost APX u ovom tretmanu nije se razlikovala od kontrolne vrijednosti. Ako bi tu vrijednost usporedili s vrijednosti u biljkama koje su tretirane s hranjivom otopinom s 10% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag aktivnost APX bila je 9% manja pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$.

Usporedbom djelovanja iste koncentracije Ag pri različitim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini vidi se značajna interakcija razrjeđenja nutrijenata i koncentracije Ag na aktivnost APX ($F=64,929$; $P<0,01$). Tretman nižim koncentracijama ionskog koloidnog Ag pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini uzrokovao je povećanje aktivnosti za 50 do 60% u odnosu na kontrolu (Slika 25). Pri tretmanu s koncentracijom 1000 $\mu\text{g/L}$, nakon 48 h tretmana, aktivnost APX u potpunoj hranjivoj otopini bila je veća za 70%, dok je aktivnost pri N i P 50% bila veća 132% od kontrole. Slično tome, u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ u kombinaciji s 25% N i P aktivnost APX bila je 78% veća u usporedbi s kontrolom. Međutim, u biljkama koje su rasle na 10% N i P u hranjivoj otopini i zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ aktivnost APX nije se razlikovala od kontrole.



Slika 25. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaza (APX) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P<0,05$).

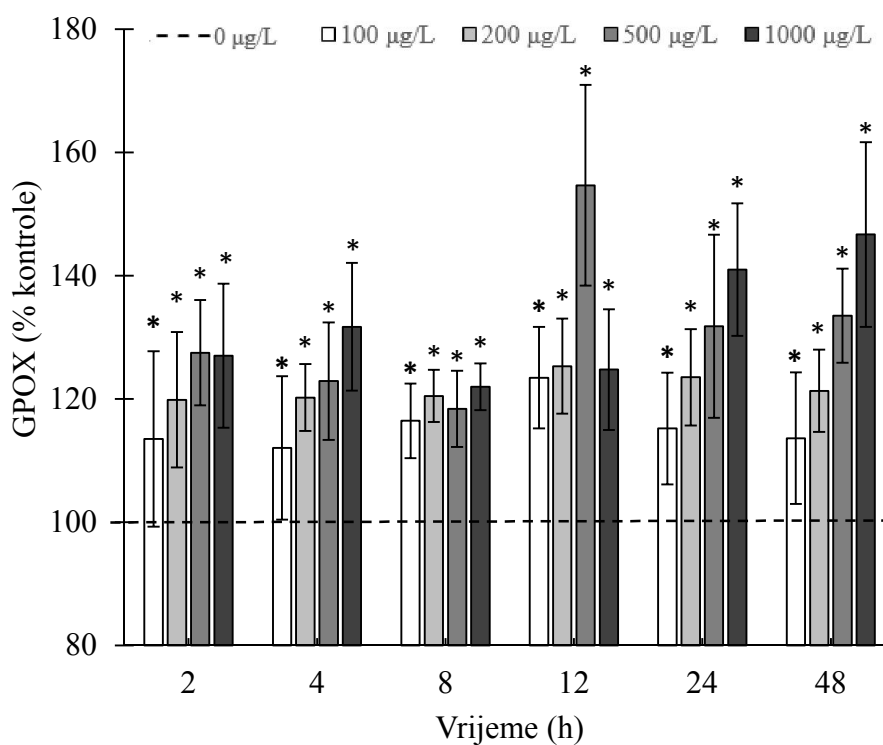
Tablica 10. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaza (APX) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Vrijeme/Tretman		APX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}$)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	0,289 ± 0,024	0,288 ± 0,026	0,289 ± 0,025	0,299 ± 0,027	0,305 ± 0,024	0,309 ± 0,033
	100	0,285 ± 0,024	0,319 ± 0,038*	0,338 ± 0,022*	0,445 ± 0,062*	0,458 ± 0,066*	0,471 ± 0,041*
	200	0,295 ± 0,018	0,319 ± 0,033*	0,326 ± 0,025*	0,451 ± 0,056*	0,478 ± 0,060*	0,511 ± 0,080*
	500	0,286 ± 0,017	0,338 ± 0,030*	0,334 ± 0,029*	0,447 ± 0,048*	0,466 ± 0,060*	0,516 ± 0,030*
	1000	0,300 ± 0,030	0,333 ± 0,024*	0,335 ± 0,025*	0,508 ± 0,064*	0,588 ± 0,083*	0,527 ± 0,033*
50	0	0,342 ± 0,008*	0,348 ± 0,016*	0,343 ± 0,019*	0,341 ± 0,029*	0,344 ± 0,030*	0,346 ± 0,022*
	100	0,380 ± 0,009*	0,386 ± 0,017*	0,410 ± 0,020*	0,410 ± 0,020*	0,458 ± 0,068*	0,469 ± 0,014*
	200	0,386 ± 0,018*	0,393 ± 0,036*	0,413 ± 0,009*	0,413 ± 0,009*	0,461 ± 0,064*	0,469 ± 0,039*
	500	0,392 ± 0,017*	0,399 ± 0,032*	0,429 ± 0,006*	0,429 ± 0,006*	0,479 ± 0,067*	0,516 ± 0,032*
	1000	0,402 ± 0,028*	0,423 ± 0,029*	0,434 ± 0,030*	0,479 ± 0,062*	0,595 ± 0,051*	0,719 ± 0,060*
25	0	0,331 ± 0,016*	0,330 ± 0,016*	0,331 ± 0,014*	0,331 ± 0,014*	0,329 ± 0,022*	0,335 ± 0,030*
	100	0,354 ± 0,026*	0,355 ± 0,026*	0,364 ± 0,027*	0,372 ± 0,027*	0,440 ± 0,031*	0,503 ± 0,047*
	200	0,359 ± 0,026*	0,363 ± 0,026*	0,371 ± 0,026*	0,369 ± 0,026*	0,444 ± 0,053*	0,478 ± 0,037*
	500	0,384 ± 0,018*	0,383 ± 0,018*	0,384 ± 0,018*	0,392 ± 0,018*	0,450 ± 0,030*	0,491 ± 0,052*
	1000	0,465 ± 0,024*	0,469 ± 0,025*	0,479 ± 0,025*	0,483 ± 0,026*	0,472 ± 0,018*	0,551 ± 0,019*
10	0	0,325 ± 0,011*	0,331 ± 0,011*	0,340 ± 0,025*	0,337 ± 0,030*	0,339 ± 0,015*	0,343 ± 0,021*
	100	0,369 ± 0,019*	0,376 ± 0,019*	0,386 ± 0,036*	0,397 ± 0,056*	0,427 ± 0,051*	0,461 ± 0,059*
	200	0,367 ± 0,023*	0,374 ± 0,023*	0,384 ± 0,037*	0,394 ± 0,056*	0,424 ± 0,053*	0,458 ± 0,063*
	500	0,388 ± 0,012*	0,396 ± 0,012*	0,423 ± 0,037*	0,433 ± 0,049*	0,466 ± 0,040*	0,503 ± 0,050*
	1000	0,451 ± 0,032*	0,457 ± 0,036*	0,463 ± 0,048*	0,412 ± 0,031*	0,322 ± 0,029*	0,313 ± 0,044*
	F	46,24	22,19	24,87	12,45	16,45	39,99
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.1.2. Aktivnost gvajakol-peroksidaze

Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOX) u biljkama uzgajanim u potpunoj hranjivoj otopini bila je statistički značajno veća u usporedbi s kontrolom pri svim tretmanima ionskim koloidnim Ag već nakon 2 h od početka pokusa (Slika 26). Nakon 4 h od početka pokusa aktivnost GPOX bila je 12%, 20%, 23% i 32% veća pri koncentracijama Ag 100 µg/L, 200 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L u usporedbi s aktivnosti u kontrolnim biljkama. Nakon 12 h tretmana najveća aktivnost GPOX zabilježena je u biljkama tretiranim s 500 µg/L kada je bila za 55% viša u odnosu na kontrolu dok su ostale koncentracije Ag uzrokovale podjednako povećanje aktivnosti GPOX, u prosjeku 24%. Nakon 24 i 48 h od početka pokusa aktivnost GPOX povećavala se s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini. Najveće vrijednosti aktivnosti GPOX zabilježene su u tretmanu s 1000 µg/L, u odnosu na kontrolu za 40% veća nakon 24 h tretmana te za 46% veća 48 h nakon početka pokusa (Slika 26).

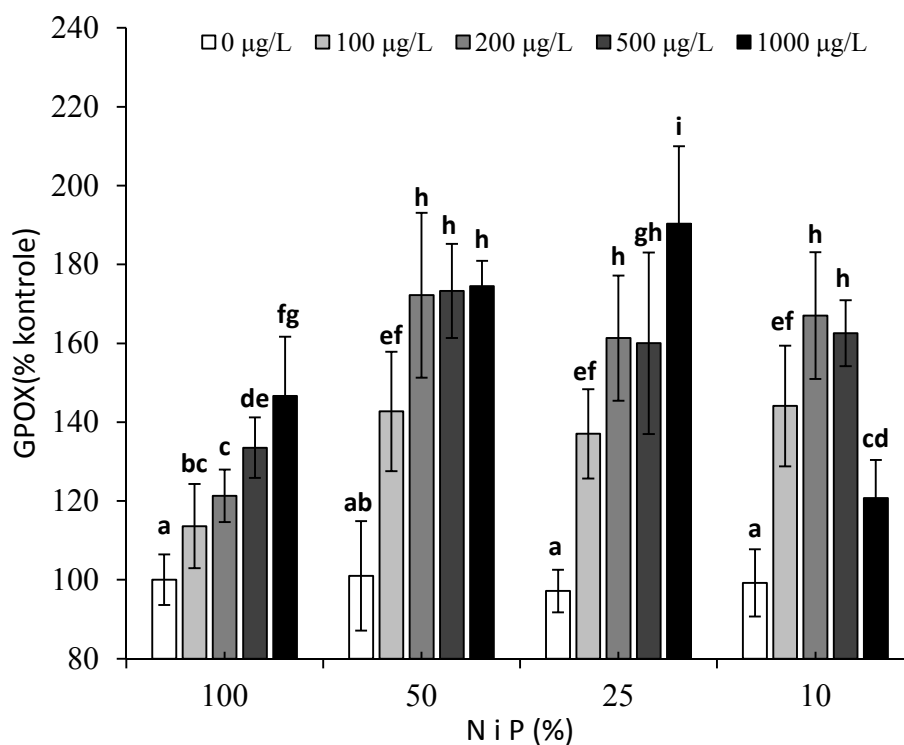


Slika 26. Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOX) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Aktivnost GPOX izmjerena u biljkama pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini ali bez dodatka ionskog koloidnog Ag nije se značajno razlikovala od aktivnosti u biljkama koje su rasle u potpunoj hranjivoj otopini tijekom cijelog pokusa (*Tablica 11*). Značajno povećanje aktivnosti GPOX u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P utvrđeno je nakon 2 i 4 h od početka tretmana s ionskim koloidnim Ag koncentracija 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$. Nakon 8 h sve koncentracije ionskog koloidnog Ag uzrokovale su značajno povećanje aktivnosti GPOX u usporedbi s kontrolom te je aktivnost nastavila rasti do kraja pokusa (*Tablica 11*). Nakon 48 h aktivnost GPOX u biljkama koje su rasle na hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bila je 43% veća pri 100 $\mu\text{g/L}$, 72% veća pri 200 $\mu\text{g/L}$, 73% veća pri 500 $\mu\text{g/L}$ te 74% veća od kontrole pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag (*Tablica 11*). Kada su biljke tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s hranjivom otopinom s 25% i 10% koncentracije N i P pri svim tretmanima je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti GPOX. Najveća aktivnost izmjerena u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s 25% N i P iznosila je $11,289 \pm 1,165 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$ i bila je 90% veća u odnosu na kontrolne biljke ($5,931 \pm 0,381 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$). U biljkama koje su tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s 10% N i P u hranjivoj otopini, najveća aktivnost GPOX izmjerena je u tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ ($9,907 \pm 0,953 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$) kada je bila 67% veća od kontrole. Povećanje aktivnosti GPOX u biljkama pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ u hranjivoj otopini s 10% N i P bilo je najveće u odnosu na kontrolu već nakon 2 h (52%). S produženjem trajanja tretmana aktivnost GPOX također je veća u usporedbi s kontrolom ali povećanje nije toliko izraženo pa je aktivnost nakon 24 h veća 30% i nakon 48h veća 21% u usporedbi s kontrolom (*Tablica 11*).

Usporedba aktivnosti GPOX u biljkama tretiranim različitim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 27*. Pri tretmanu ionskim koloidnim Ag koncentracijama 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ nakon 48 h utvrđena je statistički značajno veća aktivnost GPOX u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini sa sniženim koncentracijama N i P u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini. Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag aktivnost GPOX bila je značajno veća u biljkama koje su ovom koncentracijom tretirane u kombinaciji s 50 i 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini. Isti tretman ionskim koloidnim Ag (1000 $\mu\text{g/L}$) nakon 48 h tretmana, povećao je aktivnost GPOX u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 50% N i P za 74%, te u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 25% N i P za 90% u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, u biljkama koje

su rasle u hranjivoj otopini s 10% N i P te zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ aktivnost GOX iznosila je $7,162 \pm 0,570 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot. i prema rezultatima analize varijance bila je najmanja u usporedbi s aktivnosti u biljkama koje su ovom koncentracijom ionskog koloidnog Ag tretirane u hranjivoj otopini sa 100, 50 i 25% koncentracije N i P (Slika 27).



Slika 27. Aktivnost enzima gvajakol-peroksidaza (GPOX) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

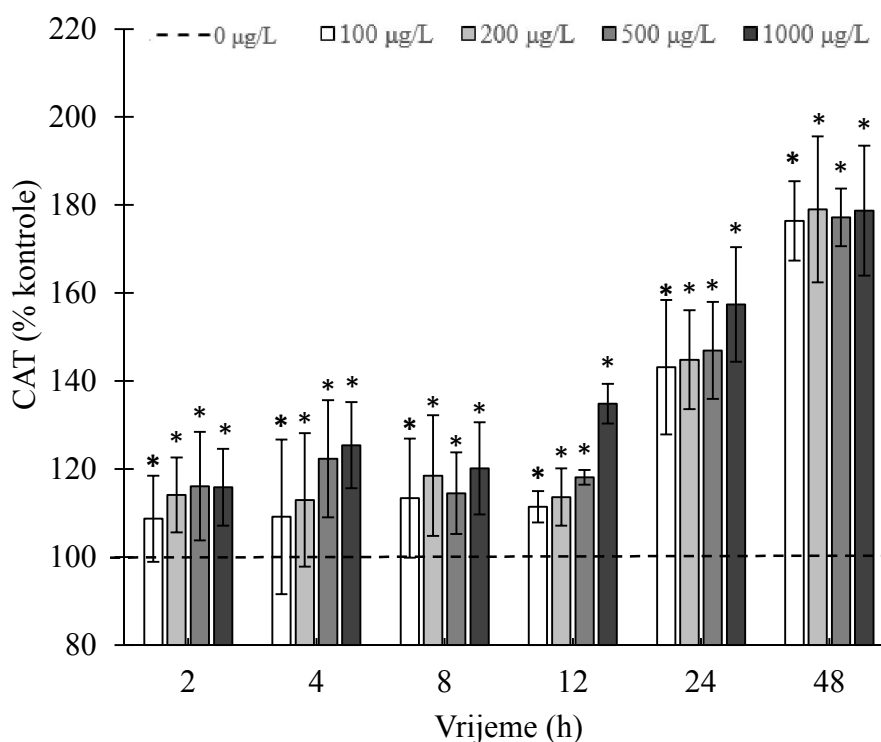
Tablica 11. Aktivnost enzima gvajakol-peroksidaza (GPOX) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

		GPOX ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$)					
Tretman/Vrijeme		2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
N i P (%)	Ag (µg/L)						
	0	5,611 ± 0,319	5,927 ± 0,607	5,964 ± 0,211	5,787 ± 0,537	5,898 ± 0,215	5,931 ± 0,381
	100	6,369 ± 0,799*	6,643 ± 0,690*	6,945 ± 0,360*	7,144 ± 0,476*	6,794 ± 0,534*	6,740 ± 0,635*
	200	6,725 ± 0,617*	7,126 ± 0,322*	7,186 ± 0,252*	7,252 ± 0,446*	7,285 ± 0,462*	7,195 ± 0,397*
	500	7,154 ± 0,479*	7,284 ± 0,566*	7,061 ± 0,368*	8,951 ± 0,942*	7,773 ± 0,876*	7,919 ± 0,454*
	1000	7,127 ± 0,655*	7,807 ± 0,614*	7,275 ± 0,226*	7,220 ± 0,567*	8,316 ± 0,634*	8,700 ± 0,890*
50	0	6,032 ± 0,603	5,989 ± 0,561	6,036 ± 0,686	6,020 ± 0,729	6,004 ± 0,775	5,989 ± 0,824
	100	5,937 ± 0,614	5,896 ± 0,579	6,536 ± 0,693*	7,124 ± 0,756*	7,766 ± 0,824*	8,465 ± 0,898*
	200	7,220 ± 0,978*	7,168 ± 0,924*	7,887 ± 0,957*	8,597 ± 1,043*	9,370 ± 1,137*	10,214 ± 1,239*
	500	7,225 ± 0,485*	7,176 ± 0,446*	7,936 ± 0,546*	8,650 ± 0,595*	9,429 ± 0,649*	10,277 ± 0,707*
	1000	7,356 ± 0,259*	7,307 ± 0,233*	7,991 ± 0,295*	8,710 ± 0,321*	9,494 ± 0,350*	10,348 ± 0,382*
25	0	5,781 ± 0,317	5,770 ± 0,317	5,729 ± 0,314	5,811 ± 0,268	5,659 ± 0,495	5,764 ± 0,321
	100	7,502 ± 0,587*	7,529 ± 0,589*	7,724 ± 0,605*	7,808 ± 0,631*	7,765 ± 0,774*	8,127 ± 0,672*
	200	7,446 ± 0,345*	7,541 ± 0,349*	7,692 ± 0,356*	7,679 ± 0,358*	9,323 ± 0,599*	9,568 ± 0,941*
	500	7,249 ± 0,367*	7,307 ± 0,487*	7,684 ± 0,452*	7,757 ± 0,426*	9,297 ± 0,186*	9,490 ± 1,364*
	1000	8,716 ± 0,503*	8,793 ± 0,508*	8,975 ± 0,518*	9,084 ± 0,559*	10,080 ± 0,298*	11,289 ± 1,165*
10	0	5,856 ± 0,495	5,861 ± 0,576	5,887 ± 0,539	5,885 ± 0,520	5,885 ± 0,509	5,884 ± 0,507
	100	8,132 ± 0,864*	8,214 ± 0,872*	8,296 ± 0,881*	8,379 ± 0,890*	8,463 ± 0,899*	8,547 ± 0,908*
	200	7,762 ± 0,747*	8,150 ± 0,784*	8,558 ± 0,823*	8,986 ± 0,864*	9,435 ± 0,908*	9,907 ± 0,953*
	500	7,798 ± 0,342*	8,188 ± 0,360*	8,530 ± 0,387*	8,886 ± 0,418*	9,257 ± 0,454*	9,643 ± 0,495*
	1000	8,530 ± 0,590*	8,615 ± 0,596*	8,533 ± 0,679*	8,106 ± 0,645*	7,701 ± 0,613*	7,162 ± 0,570*
	F	16,577	18,552	22,476	21,463	31,330	32,772
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.1.3. Aktivnost katalaze

U stanicama *L. gibba* koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini aktivnost katalaze (CAT) tijekom cijelog pokusa bila je statistički značajno veća pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u usporedbi s kontrolom (Slika 28). U tretmanu ionskim koloidnim Ag koncentracija 100 µg/L, 200 µg/L i 500 µg/L aktivnost CAT bila je u prosjeku veća za 15% u odnosu na kontrolnu vrijednost nakon 2, 4, 8 i 12 h trajanja pokusa. Nasuprot tome, aktivnost CAT u biljkama tretiranim s najvećom koncentracijom Ag (1000 µg/L) bila je povišena za 16%, 25%, 20% i 34% u odnosu na kontrolu 2, 4, 8 i 12 h od početka pokusa. Nakon 24 h aktivnost CAT bila je 43%, 45%, 47% i 57% veća u tretmanu s 100 µg/L, 200 µg/L, 500 µg/L i 1000 µg/L Ag u hranjivoj otopini. Povećanjem vremena tretmana na 48 h aktivnost CAT porasla je u prosjeku za 78% pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini (Slika 28).

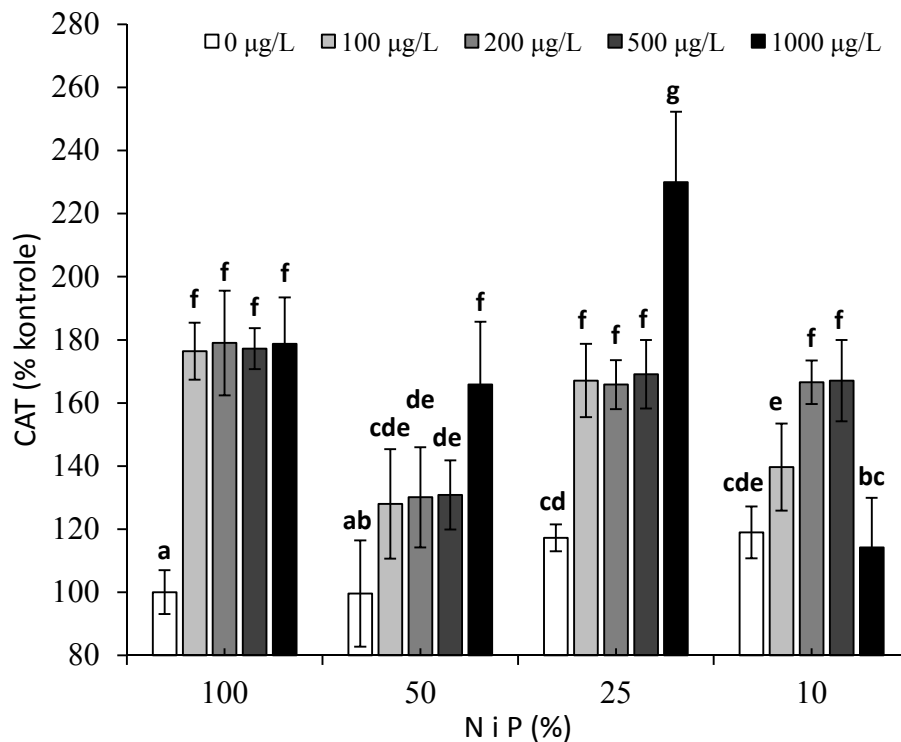


Slika 28. Aktivnost katalaze (CAT) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Tretman ionskim koloidnim Ag nakon 2, 4 i 8 h nije značajno utjecao na promjene aktivnosti CAT u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% N i P (*Tablica 12*). Samo je tretman s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag značajno povećao aktivnost CAT nakon 8 h tretmana ($1,696 \pm 0,203 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$). U pokusima koji su trajali 12 h i duže, statistički značajno veće aktivnosti CAT zabilježene su pri svim tretmanima ionskim koloidnim Ag. Najveće vrijednosti izmjerene su u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ pri čemu je aktivnost CAT nakon 12 h bila 37% veća, nakon 24 h 48% veća te nakon 48 h 66% veća u usporedbi s kontrolnom vrijednosti. U biljkama koje su tretirane s Ag u kombinaciji s 25% N i P u hranjivoj otopini, značajno povećanje aktivnost zabilježeno je pri svim tretmanima ionskim koloidnim Ag tijekom cijelog pokusa (*Tablica 12*). Aktivnost CAT u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 25% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa je bila značajno veća u odnosu na kontrolu te je tretman s ionskim koloidnim Ag dodatno povećao aktivnost ovog enzima. Nakon 48 h tretmana s koncentracijama 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag aktivnost CAT u stanicama *L. gibba* bila je povišena u prosjeku za 67% u usporedbi s kontrolom. U tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag aktivnost CAT nakon 48 h ($3,157 \pm 0,306 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$) bila je 129% veća u usporedbi s kontrolnom vrijednosti ($1,373 \pm 0,095 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$). Aktivnost CAT u biljkama koje su tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s 10% N i P u hranjivoj otopini bila je značajno veća pri svim tretmanima tijekom cijelog pokusa u usporedbi s kontrolnim vrijednostima. Najveća aktivnost izmjerena u tretmanu s 500 $\mu\text{g/L}$ nakon 48 h ($2,294 \pm 0,177 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$) bila je 67% veća u usporedbi s kontrolom ($1,373 \pm 0,095 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$). Aktivnost CAT u biljkama koje su tretirane s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag bila je u prosjeku 29% veća nakon 2, 4, 8 i 12 h tretmana, dok je nakon 24 h i 48 h aktivnost CAT bila 21% i 14% veća u usporedbi s kontrolom (*Tablica 12*).

Nakon 48 h od početka tretmana aktivnost CAT u biljkama koje su tretirane samo hranjivim otopinama s 25 i 10% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag bila je značajno veća u odnosu na aktivnost ovog enzima u kontrolnim biljkama (*Slika 29*). Slično kao i kod aktivnosti APX, tretman ionskim koloidnim Ag koncentracija 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini uzrokovao je povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (*Slika 29*). Pri tretmanu s koncentracijom 1000 $\mu\text{g/L}$, nakon 48 h tretmana, aktivnost CAT u potpunoj hranjivoj otopini bila je veća za 79%, dok je aktivnost pri N i P 50% bila veća 66% od kontrole. Slično tome, u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ u kombinaciji s 25% N i P aktivnost CAT bila je 129% veća u usporedbi s kontrolom. Međutim, u biljkama koje su

rasle na 10% N i P u hranjivoj otopini i zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ aktivnost CAT bila je 14% veća od kontrole.



Slika 29. Aktivnost enzima katalaza (CAT) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 12. Aktivnost enzima katalaza (CAT) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		CAT ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	1,364 ± 0,076	1,356 ± 0,126	1,348 ± 0,082	1,347 ± 0,018	1,360 ± 0,073	1,373 ± 0,095
	100	1,483 ± 0,134*	1,480 ± 0,238*	1,529 ± 0,183*	1,501 ± 0,048*	1,946 ± 0,208*	2,422 ± 0,124*
	200	1,557 ± 0,116*	1,532 ± 0,206*	1,598 ± 0,185*	1,530 ± 0,088*	1,969 ± 0,153*	2,458 ± 0,228*
	500	1,584 ± 0,168*	1,659 ± 0,181*	1,544 ± 0,125*	1,590 ± 0,023*	1,998 ± 0,150*	2,433 ± 0,089*
	1000	1,580 ± 0,119*	1,701 ± 0,133*	1,620 ± 0,141*	1,816 ± 0,060*	2,140 ± 0,177*	2,453 ± 0,203*
50	0	1,392 ± 0,091	1,390 ± 0,126	1,394 ± 0,166	1,384 ± 0,185	1,375 ± 0,207	1,367 ± 0,231
	100	1,402 ± 0,088	1,424 ± 0,139	1,488 ± 0,162	1,543 ± 0,165*	1,567 ± 0,241*	1,757 ± 0,238*
	200	1,401 ± 0,047	1,421 ± 0,080	1,450 ± 0,110	1,505 ± 0,171*	1,563 ± 0,242*	1,786 ± 0,218*
	500	1,417 ± 0,108	1,437 ± 0,125	1,426 ± 0,158	1,498 ± 0,166*	1,572 ± 0,174*	1,796 ± 0,151*
	1000	1,425 ± 0,129	1,446 ± 0,158	1,696 ± 0,203*	1,849 ± 0,221*	2,015 ± 0,241*	2,277 ± 0,273*
25	0	1,605 ± 0,058*	1,602 ± 0,058*	1,591 ± 0,057*	1,591 ± 0,057*	1,533 ± 0,028*	1,610 ± 0,058*
	100	1,684 ± 0,117*	1,690 ± 0,118*	1,734 ± 0,121*	1,771 ± 0,123*	1,967 ± 0,160*	2,294 ± 0,160*
	200	1,658 ± 0,079*	1,679 ± 0,080*	1,713 ± 0,082*	1,707 ± 0,081*	1,937 ± 0,172*	2,276 ± 0,107*
	500	1,738 ± 0,108*	1,785 ± 0,093*	1,791 ± 0,093*	1,828 ± 0,096*	1,913 ± 0,194*	2,322 ± 0,149*
	1000	1,787 ± 0,173*	1,803 ± 0,175*	1,840 ± 0,179*	1,884 ± 0,183*	2,150 ± 0,199*	3,157 ± 0,306*
10	0	1,625 ± 0,111*	1,626 ± 0,135*	1,634 ± 0,123*	1,633 ± 0,117*	1,633 ± 0,113*	1,633 ± 0,113*
	100	1,825 ± 0,180*	1,843 ± 0,182*	1,862 ± 0,184*	1,880 ± 0,186*	1,899 ± 0,188*	1,918 ± 0,190*
	200	1,791 ± 0,074*	1,881 ± 0,078*	1,975 ± 0,082*	2,074 ± 0,086*	2,178 ± 0,090*	2,286 ± 0,095*
	500	1,854 ± 0,117*	1,947 ± 0,123*	2,028 ± 0,134*	2,113 ± 0,147*	2,202 ± 0,161*	2,294 ± 0,177*
	1000	1,751 ± 0,204*	1,768 ± 0,206*	1,752 ± 0,222*	1,736 ± 0,240*	1,650 ± 0,228*	1,567 ± 0,217*
	F	13,278	10,745	10,781	17,672	16,008	43,255
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

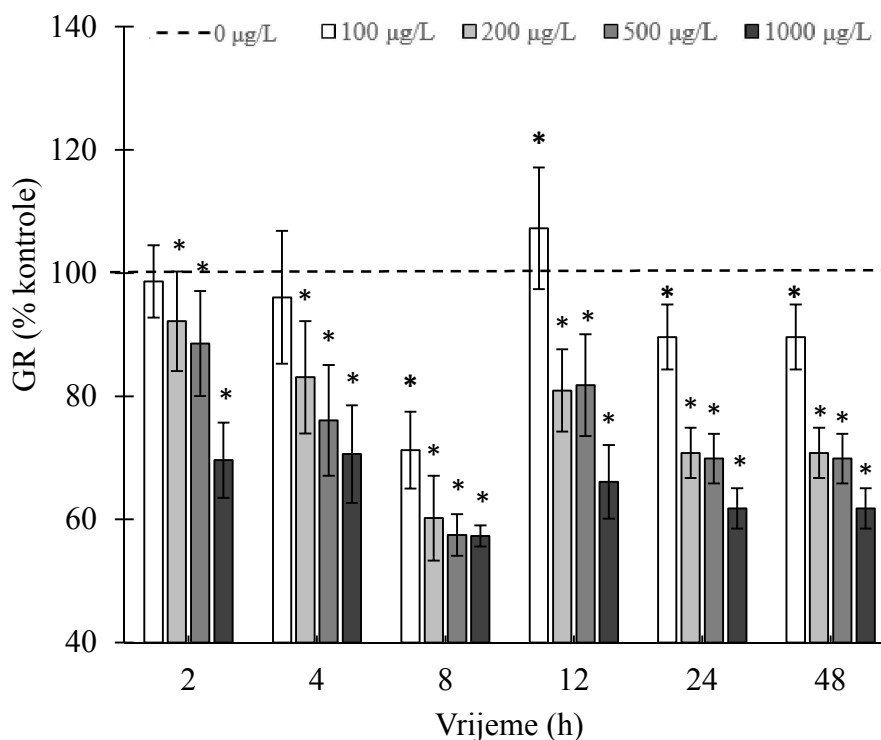
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

3.7.1.4. Aktivnost glutation-reduktaze

Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u biljkama koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini bila je značajno manja od kontrole pri tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag nakon 2 i 4 h od početka pokusa (*Slika 30*). Aktivnost enzima GR u tretmanu s ionskim koloidnim Ag koncentracije 100 µg/L bila je značajno manja nakon 8 h tretmana (29%) u usporedbi s kontrolnom vrijednosti. Nakon pada aktivnosti pri 8 h, u biljkama koje su tretirane ovom koncentracijom Ag zabilježen je skok aktivnost GR u odnosu na kontrolu za 7% nakon čega je pri 24 h i 48 h aktivnost bila u prosjeku 10% manja u usporedbi s kontrolom (*Slika 30*). Kada su biljke izložene ionskom koloidnom Ag koncentracije 200 µg/L aktivnost GR bila je statistički značajno manja u svim terminima uzorkovanja ($P < 0,05$). Nakon 24 i 48 h od početka tretmana aktivnost GR bila je prosječno 30% manja od kontrolne aktivnosti. Izlaganje biljaka ionskom koloidnom Ag koncentracije 500 µg/L i 1000 µg/L uzrokovalo je značajno smanjenje aktivnosti GR po istom trendu kao i koncentracija 200 µg/L Ag. Nakon 8 h tretmana aktivnost je bila najniža, u prosjeku 43% manja u usporedbi s kontrolom za obje koncentracije Ag. Nakon 24 h i 48 h aktivnost je u prosjeku bila manja za 30% u tretmanu s 500 µg/L, dok je tretman s 1000 µg/L aktivnost GR smanjio za 39% u odnosu na kontrolu.

U biljkama koje su tretirane s Ag u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag utvrđena je značajno veća aktivnost GR od kontrolnih biljaka (*Tablica 13*). Više aktivnosti utvrđene su i nakon 2, 4 i 8 h tretmana s nižim koncentracijama ionskog koloidnog Ag, pri čemu je aktivnost bila u prosjeku 15% viša od kontrolne vrijednosti. Značajno smanjenje aktivnosti GR zabilježeno je nakon 8 h tretmana s 1000 µg/L kada je izmjerena aktivnost ($9,486 \pm 0,480 \Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$) bila 10% manja u usporedbi s kontrolom (*Tablica 13*). Produženjem trajanja pokusa na 24 i 48 h aktivnost GR u stanicama *L. gibba* uzgajanim u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bila je značajno snižena pri tretmanu s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag. U biljkama koje su uzgajane na hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag također je utvrđena značajno veća aktivnost GR u usporedbi s kontrolom (*Tablica 13*). Osim toga, značajno veća aktivnosti GR zabilježena je nakon 2, 4 i 8 h od početka tretmana s ionskim koloidnim Ag koncentracija 100 i 200 µg/L. Smanjenje aktivnosti GR utvrđeno je nakon 8 h tretmana s 1000 µg/L (8%) te nakon 12, 24 i 48 h tretmana s 500 i 1000 µg/L. Aktivnost GR u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog pokusa bila je značajno veća u usporedbi s kontrolom (*Tablica 13*). Više aktivnosti utvrđene su i nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag te u tretmanima sa 100, 200 i

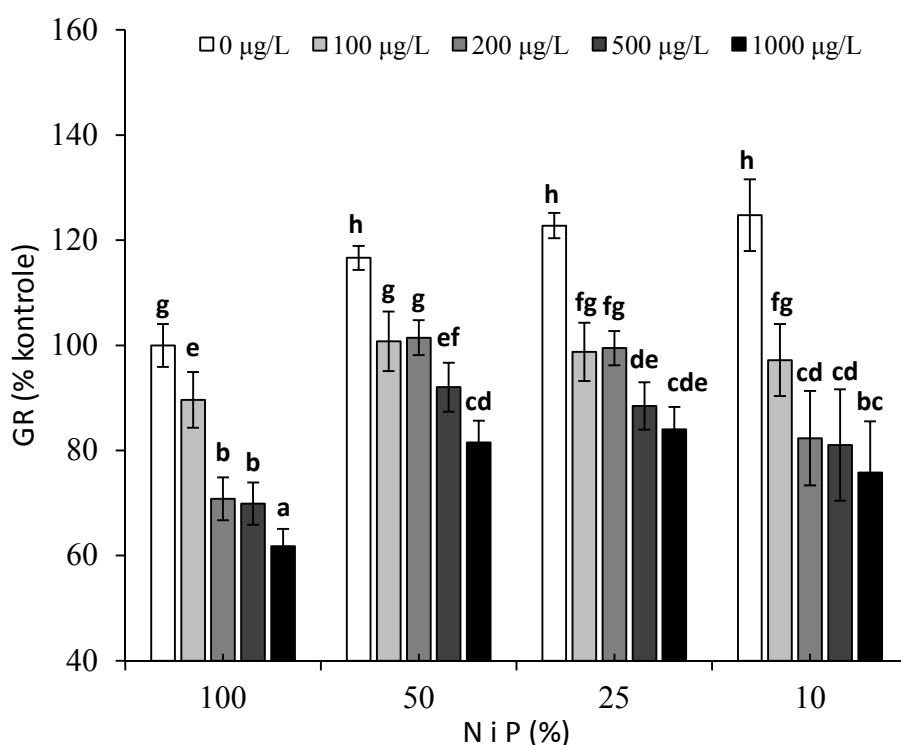
500 $\mu\text{g/L}$ nakon 4 i 8 h od početka pokusa. Dodatak ionskog koloidnog Ag koncentracije 1000 $\mu\text{g/L}$ u hranjivu otopinu s 10% koncentracije N i P značajno je smanjio aktivnost GR u stanicama *L. gibba* nakon 24 h tretmana ($9,232 \pm 0,686 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{prot.}$). Nakon 48 h značajno smanjenje aktivnosti utvrđeno je pri tretmanu s 200 $\mu\text{g/L}$ (18%), 500 $\mu\text{g/L}$ (19%) i 1000 $\mu\text{g/L}$ (24%).



Slika 30. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Usporedba aktivnosti GR u biljkama tretiranim različitim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 31*. Pri tretmanu svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag nakon 48 h utvrđena je statistički značajno manja aktivnost GR u biljkama koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke tretirane u hranjivoj otopini sa sniženim koncentracijama N i P. Aktivnost GOX u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini sa

100% N i P te zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ iznosila je $6,495 \pm 0,345 \Delta\text{A min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ prot. i prema rezultatima analize varijance bila je najmanja u usporedbi s aktivnosti u biljkama koje su ovom koncentracijom ionskog koloidnog Ag tretirane u hranjivoj otopini s 50, 25 i 10% koncentracije N i P (Slika 31). Isti tretman ionskim koloidnim Ag (1000 $\mu\text{g/L}$) nakon 48 h tretmana, smanjio je aktivnost GR u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 50% N i P za 19%, u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 25% N i P za 16% te za 24% u odnosu na kontrolu u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P.



Slika 31. Aktivnost enzima glutation-reduktaza (GR) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 13. Aktivnost enzima glutation-reduktaza (GR) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

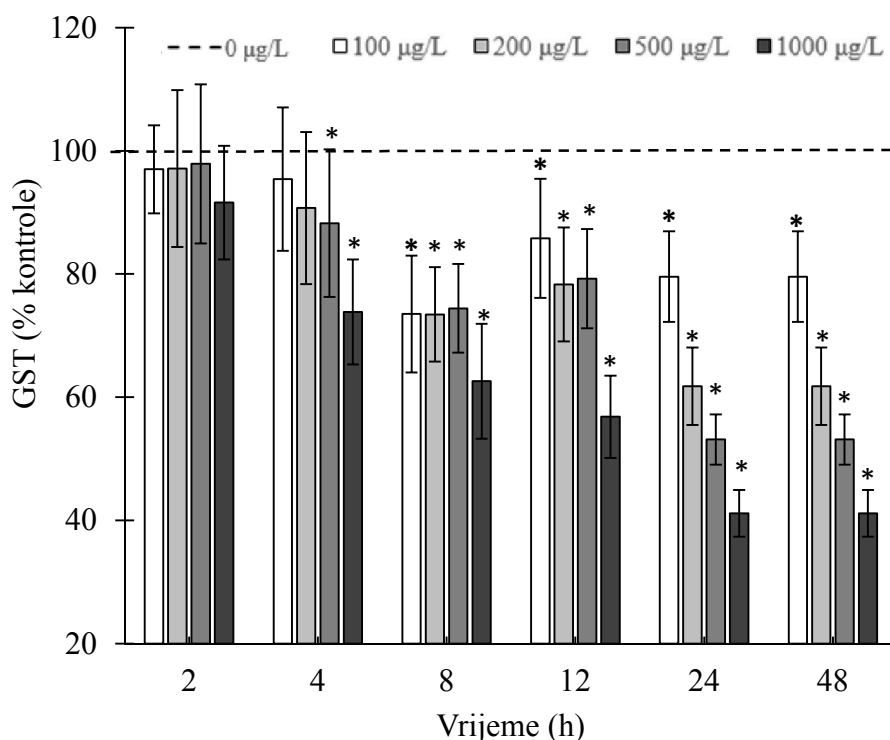
Tretman/Vrijeme		GR ($\Delta A \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot.}$)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	10,140 ± 0,892	10,122 ± 0,796	10,510 ± 0,530	10,940 ± 0,617	10,725 ± 0,437	10,510 ± 0,429
	100	10,002 ± 0,593	9,722 ± 1,091	7,488 ± 0,655*	11,734 ± 1,081*	9,611 ± 0,568*	9,419 ± 0,557*
	200	9,345 ± 0,819*	8,410 ± 0,924*	6,329 ± 0,724*	8,855 ± 0,730*	7,592 ± 0,438*	7,440 ± 0,429*
	500	8,980 ± 0,863*	7,701 ± 0,913*	6,040 ± 0,353*	8,949 ± 0,903*	7,495 ± 0,433*	7,345 ± 0,424*
	1000	7,059 ± 0,619*	7,146 ± 0,804*	6,023 ± 0,180*	7,232 ± 0,653*	6,627 ± 0,352*	6,495 ± 0,345*
50	0	12,334 ± 0,639*	12,307 ± 0,461*	12,244 ± 0,203*	12,336 ± 0,495*	12,335 ± 0,083*	12,259 ± 0,239*
	100	11,596 ± 0,651*	11,962 ± 0,672*	11,603 ± 0,652*	11,255 ± 0,632	10,917 ± 0,613	10,590 ± 0,595
	200	11,676 ± 0,381*	12,045 ± 0,393*	11,917 ± 0,389*	11,333 ± 0,370	10,993 ± 0,359	10,663 ± 0,348
	500	10,385 ± 0,526	10,713 ± 0,542	10,600 ± 0,537	10,080 ± 0,510	9,973 ± 0,505*	9,674 ± 0,490*
	1000	9,672 ± 0,490	9,878 ± 0,500	9,486 ± 0,480*	9,294 ± 0,471*	9,015 ± 0,456*	8,571 ± 0,434*
25	0	12,983 ± 0,672*	12,955 ± 0,485*	12,889 ± 0,214*	12,985 ± 0,521*	12,984 ± 0,088*	12,904 ± 0,251*
	100	11,967 ± 0,672*	11,727 ± 0,658*	11,375 ± 0,639*	11,034 ± 0,620	10,703 ± 0,601	10,382 ± 0,583
	200	12,050 ± 0,393*	11,809 ± 0,385*	11,454 ± 0,374*	11,111 ± 0,363	10,777 ± 0,352	10,454 ± 0,341
	500	10,717 ± 0,543	10,503 ± 0,532	10,188 ± 0,516	9,882 ± 0,500*	9,586 ± 0,485*	9,298 ± 0,471*
	1000	10,182 ± 0,515	9,978 ± 0,505	9,679 ± 0,490*	9,388 ± 0,475*	9,107 ± 0,461*	8,833 ± 0,447*
10	0	13,235 ± 0,350*	13,110 ± 0,589*	13,110 ± 0,589*	13,210 ± 0,674*	13,177 ± 0,233*	13,114 ± 0,718
	100	12,036 ± 1,194*	13,162 ± 0,298*	12,767 ± 0,289*	12,484 ± 0,987*	11,500 ± 0,496*	10,215 ± 0,720
	200	12,228 ± 0,215*	11,982 ± 1,025*	11,622 ± 0,994*	10,733 ± 0,640	10,499 ± 0,203	8,653 ± 0,944*
	500	12,031 ± 0,521*	11,748 ± 1,390*	11,396 ± 1,348*	10,136 ± 0,850	10,158 ± 0,393	8,519 ± 1,113*
	1000	12,073 ± 0,323*	10,565 ± 0,885	10,248 ± 0,859	10,006 ± 0,928	9,232 ± 0,686*	7,967 ± 1,023*
	F	26,99	24,36	87,904	22,253	78,945	53,160
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.1.5. Aktivnost glutation-S-transferaze

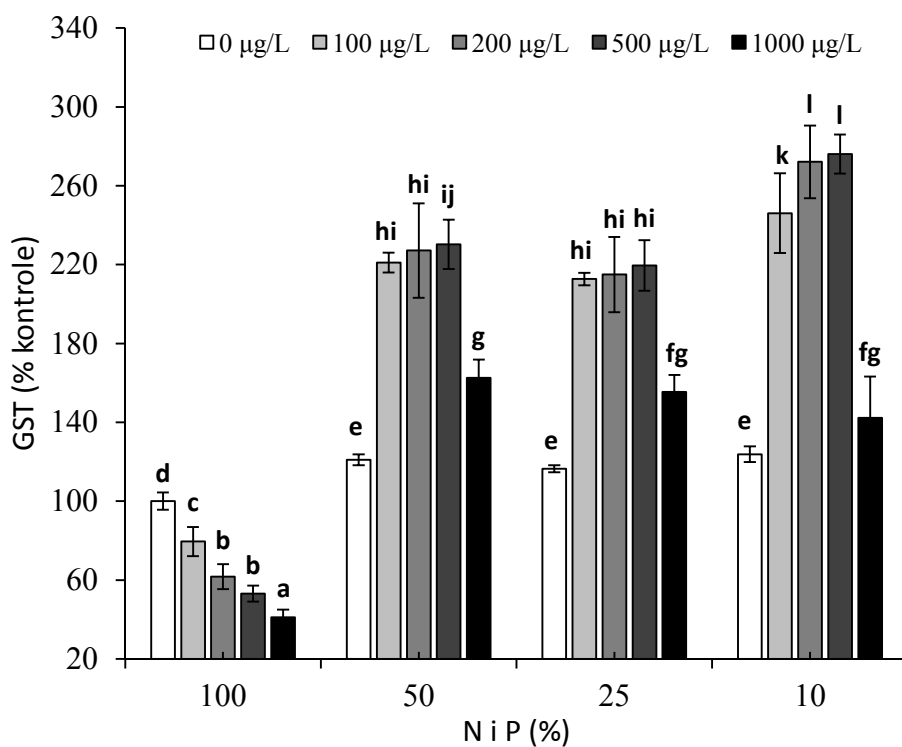
Nakon 2 h tretman ionskim koloidnim Ag nije imao značajan utjecaj na aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u stanicama *L. gibba* tretiranim u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 32). Ionsko koloidno Ag koncentracije 100 µg/L značajno je smanjilo aktivnost GST nakon 8 h (26%). U tretmanu s 200 µg/L Ag aktivnost GST također je manja u usporedbi s netretiranim biljkama nakon 8 h od početka pokusa (26%). Produženjem trajanja tretmana aktivnost se dodatno smanjuje do najniže vrijednosti nakon 48 h koja je 38% manja u usporedbi s netretiranim biljkama. U tretmanima s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag zabilježeno je značajno smanjenje aktivnosti već nakon 4 h trajanja pokusa. Aktivnost GST nakon 24 h bila je 47% manja u usporedbi s kontrolom pri 500 µg/L dok je u tretmanu s 1000 µg/L aktivnost bila smanjena za 59%. Produženje trajanja pokusa na 48 h nije primijećeno daljnje smanjenje aktivnosti GST pri ove dvije koncentracije (Slika 32).

Aktivnost GST izmjerena u biljkama pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini bez tretmana ionskim koloidnim Ag bila je značajno veća u usporedbi s aktivnosti u biljkama koje su rasle u potpunoj hranjivoj otopini s najvećim vrijednostima izmjerenim u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P (u prosjeku $3,439 \pm 0,241$ U mg⁻¹ prot.). Dodatak ionskog koloidnog Ag uzrokovao je porast aktivnost GST u *L. gibba* pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini (Tablica 14). Značajno povećanje aktivnosti GST zabilježeno je pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag već nakon 2 h tretmana. S povećanjem trajanja izloženosti utvrđeno je povećanje aktivnosti GST s najvećim vrijednostima izmjerenim u tretmanu s 500 µg/L Ag. Aktivnost GST pri 500 µg/L bila je 130% veća od kontrole pri 50% N i P, 120% veća od kontrole pri 25% N i P te 176% veća od kontrole pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini (Tablica 14). Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag aktivnost GST također je bila značajno veća u usporedbi s kontrolom i to povećanje bilo je 63% pri 50% N i P, 56% 25% N i P te 42% pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini.



Slika 32. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Djelovanje tretmana ionskim koloidnim Ag na biljke uzgajane pri različitim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini prikazano je na slici 33. Tretman ionskim koloidnim Ag nakon 48 h, uzrokovao je smanjenje aktivnosti GST u potpunoj hranjivoj otopini dok je aktivnost bila veća pri tretmanu ionskim koloidnim Ag u kombinaciji sa smanjenim koncentracijama N i P. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 100, 200 i 500 µg/L uzrokovao je slično povećanje aktivnosti u biljkama koje su uzgajane pri 50 i 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini. S druge strane, aktivnost GST pri ovim koncentracijama ionskog koloidnog Ag bile su značajno više u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P. Aktivnosti GST pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag nisu se statistički značajno razlikovale u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50, 25 i 10% koncentracije N i P (Slika 33).



Slika 33. Aktivnost enzima glutation-S-transferaza (GST) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

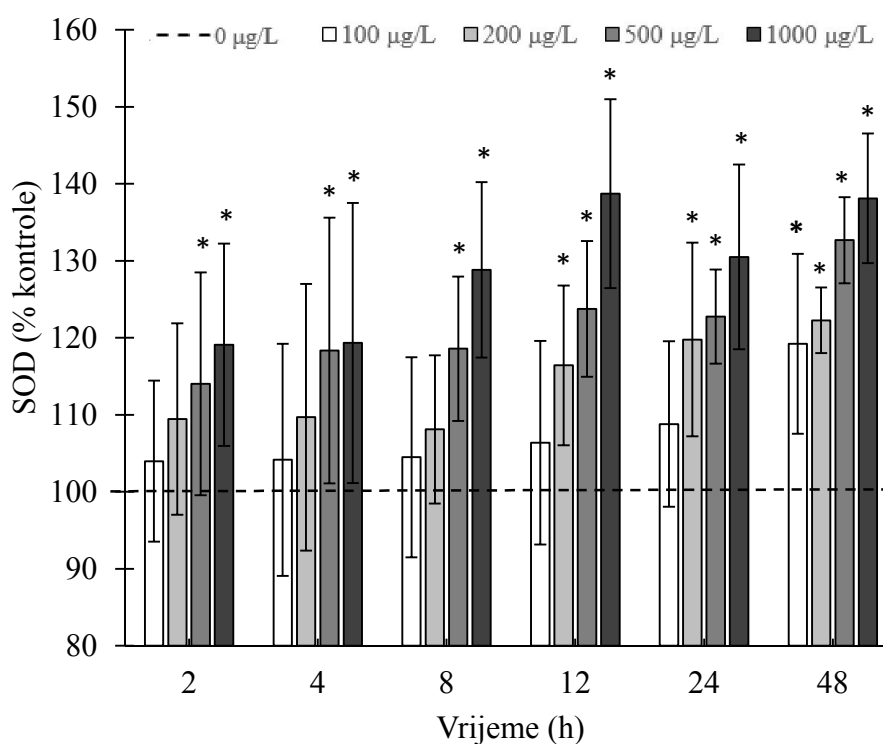
Tablica 14. Aktivnost enzima glutation-S-transferaza (GST) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		GST (U mg ⁻¹ prot.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	2,812 ± 0,376	2,823 ± 0,314	2,838 ± 0,130	2,772 ± 0,240	2,805 ± 0,123	2,746 ± 0,120
	100	2,728 ± 0,201	2,694 ± 0,328	2,086 ± 0,269*	2,378 ± 0,268*	2,232 ± 0,207*	2,185 ± 0,202*
	200	2,731 ± 0,358	2,561 ± 0,349	2,084 ± 0,218*	2,170 ± 0,256*	1,732 ± 0,176*	1,696 ± 0,172*
	500	2,753 ± 0,363	2,491 ± 0,338*	2,112 ± 0,204*	2,196 ± 0,224*	1,490 ± 0,115*	1,459 ± 0,112*
	1000	2,576 ± 0,260	2,085 ± 0,241*	1,776 ± 0,265*	1,575 ± 0,185*	1,155 ± 0,106*	1,130 ± 0,104*
50	0	3,239 ± 0,163*	3,234 ± 0,120*	3,549 ± 0,285*	3,314 ± 0,448*	3,405 ± 0,364*	3,323 ± 0,075*
	100	3,357 ± 0,384*	3,387 ± 0,141*	3,608 ± 0,505*	5,864 ± 0,288*	6,040 ± 0,364*	6,069 ± 0,137*
	200	3,719 ± 0,387*	3,638 ± 0,326*	3,809 ± 0,387*	5,760 ± 0,371*	5,935 ± 0,475*	6,237 ± 0,656*
	500	4,215 ± 0,187*	4,174 ± 0,176*	4,979 ± 0,692*	5,819 ± 0,313*	6,022 ± 0,550*	6,323 ± 0,342*
	1000	3,892 ± 0,453*	3,950 ± 0,397*	4,229 ± 0,113*	4,435 ± 0,516*	4,600 ± 0,592*	4,463 ± 0,255*
25	0	3,117 ± 0,135	3,113 ± 0,088	3,251 ± 0,189*	3,193 ± 0,461*	3,279 ± 0,381*	3,198 ± 0,049*
	100	3,232 ± 0,380*	3,261 ± 0,158*	3,476 ± 0,517*	5,645 ± 0,314*	5,814 ± 0,360*	5,841 ± 0,087*
	200	3,541 ± 0,304*	3,504 ± 0,348	3,668 ± 0,395*	5,494 ± 0,402*	5,659 ± 0,461*	5,903 ± 0,524*
	500	4,018 ± 0,134*	4,017 ± 0,130*	4,793 ± 0,676*	5,549 ± 0,331*	5,742 ± 0,532*	6,029 ± 0,351*
	1000	3,746 ± 0,428*	3,800 ± 0,353*	4,071 ± 0,130*	4,238 ± 0,445*	4,372 ± 0,564*	4,268 ± 0,235*
10	0	3,481 ± 0,343*	3,555 ± 0,380*	3,473 ± 0,390*	3,341 ± 0,120*	3,385 ± 0,086*	3,399 ± 0,109*
	100	3,597 ± 0,153*	3,670 ± 0,122*	3,977 ± 0,209*	5,101 ± 0,663*	5,272 ± 0,694*	6,757 ± 0,555*
	200	3,996 ± 0,443*	4,077 ± 0,439*	4,443 ± 0,468*	5,680 ± 0,734*	5,863 ± 0,698*	7,472 ± 0,506*
	500	4,231 ± 0,457*	4,317 ± 0,464*	4,749 ± 0,510*	6,770 ± 1,056*	6,997 ± 1,110*	7,581 ± 0,271*
	1000	3,343 ± 0,137	3,411 ± 0,114*	3,693 ± 0,045*	3,715 ± 0,130	3,839 ± 0,157*	3,908 ± 0,575*
	F	12,803	21,816	104,83	86,480	113,70	286,17
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.1.6. Aktivnost superoksid-dismutaze

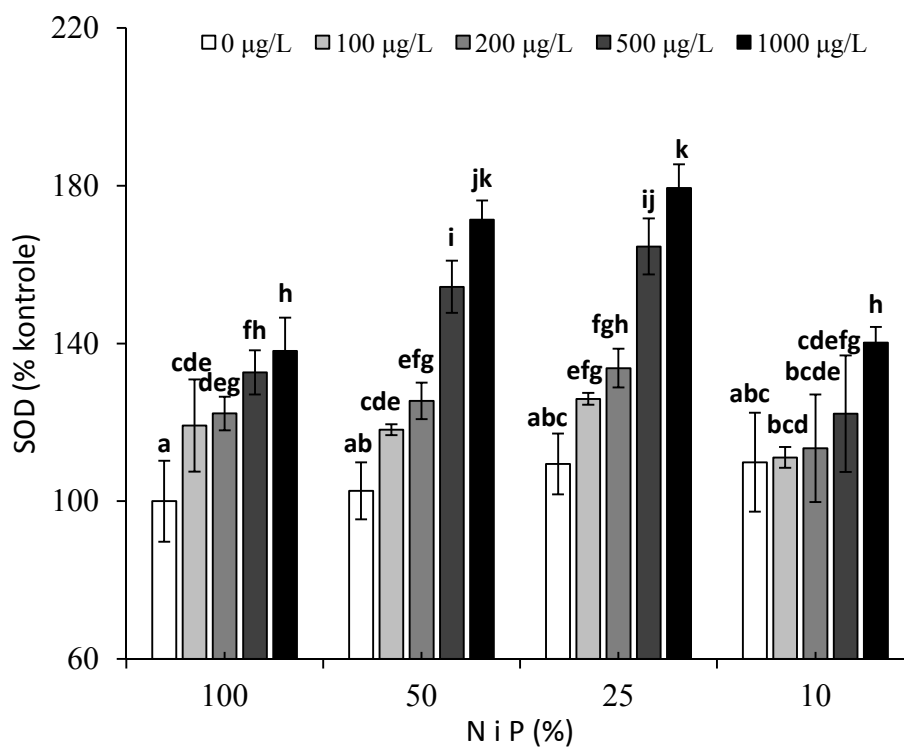
Tretman nižim koncentracijama ionskog koloidnog Ag nakon 2 h i 4 h nije imao značajan utjecaj na aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u stanicama *L. gibba* uzgajanim u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 34). Pri tretmanu s 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ već nakon 2 h utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti SOD za 14% i 19% u odnosu na kontrolu. Ionsko koloidno Ag koncentracije 100 $\mu\text{g/L}$ nije imalo značajan utjecaj na aktivnost SOD u biljkama uzorkovanim 24 h nakon početka tretmana, dok je aktivnost u ostalim tretmanima bila povišena za 20% (200 $\mu\text{g/L}$), 23% (500 $\mu\text{g/L}$) i 30% (1000 $\mu\text{g/L}$). Nakon 48 h tretmana, aktivnost SOD u stanicama *L. gibba* bila je značajno povećana u usporedbi s kontrolom pri svim primijenjenim koncentracijama ionskog koloidnog Ag s najvećom vrijednosti u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ($5,863 \pm 0,347 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$).



Slika 34. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Aktivnost SOD izmjerena u biljkama pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini ali bez dodatka ionskog koloidnog Ag nije se značajno razlikovala od aktivnosti u biljkama koje su rasle u potpunoj hranjivoj otopini tijekom cijelog pokusa (*Tablica 15*). Značajno povećanje aktivnosti SOD u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P utvrđeno je nakon 2 i 4 h od početka tretmana s ionskim koloidnim Ag koncentracija 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$. Nakon 8 h sve koncentracije ionskog koloidnog Ag uzrokovale su značajno povećanje aktivnosti SOD u usporedbi s kontrolom te je aktivnost nastavila rasti do kraja pokusa (*Tablica 15*). Nakon 48 h aktivnost SOD u biljkama koje su rasle na hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bila je 18% veća pri 100 $\mu\text{g/L}$, 25% veća pri 200 $\mu\text{g/L}$, 54% veća pri 500 $\mu\text{g/L}$ te 71% veća od kontrole pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag (*Tablica 15*). Kada su biljke tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s hranjivom otopinom s 25% i 10% koncentracije N i P pri svim tretmanima je utvrđeno značajno povećanje aktivnosti SOD. Najveća aktivnost izmjerena u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s 25% N i P iznosila je $7,619 \pm 0,253 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$ i bila je 79% veća u odnosu na kontrolne biljke ($4,245 \pm 0,437 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$). U biljkama koje su tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s 10% N i P u hranjivoj otopini, najveća aktivnost SOD izmjerena je u tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag 24 h od početka pokusa ($5,953 \pm 0,486 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$) kada je bila 42% veća od kontrole (*Tablica 15*).

Usporedba aktivnosti SOD u biljkama tretiranim različitim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 35*. Pri tretmanu s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag aktivnost SOD bila je značajno veća u biljkama koje su ovom koncentracijom tretirane u kombinaciji s 50 i 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini. Isti tretman ionskim koloidnim Ag (1000 $\mu\text{g/L}$) nakon 48 h tretmana, povećao je aktivnost SOD u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 50% N i P za 71%, te u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 25% N i P za 79% u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, u biljkama koje su rasle u potpunoj hranjivoj otopini aktivnost SOD pri ovoj koncentraciji ionskog koloidnog Ag bila je 38% veća od kontrole i 40% veća od kontrole u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% N i P te zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ (*Slika 35*).



Slika 35. Aktivnost enzima superoksid-dismutaza (SOD) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 15. Aktivnost enzima superoksid-dismutaza (SOD) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

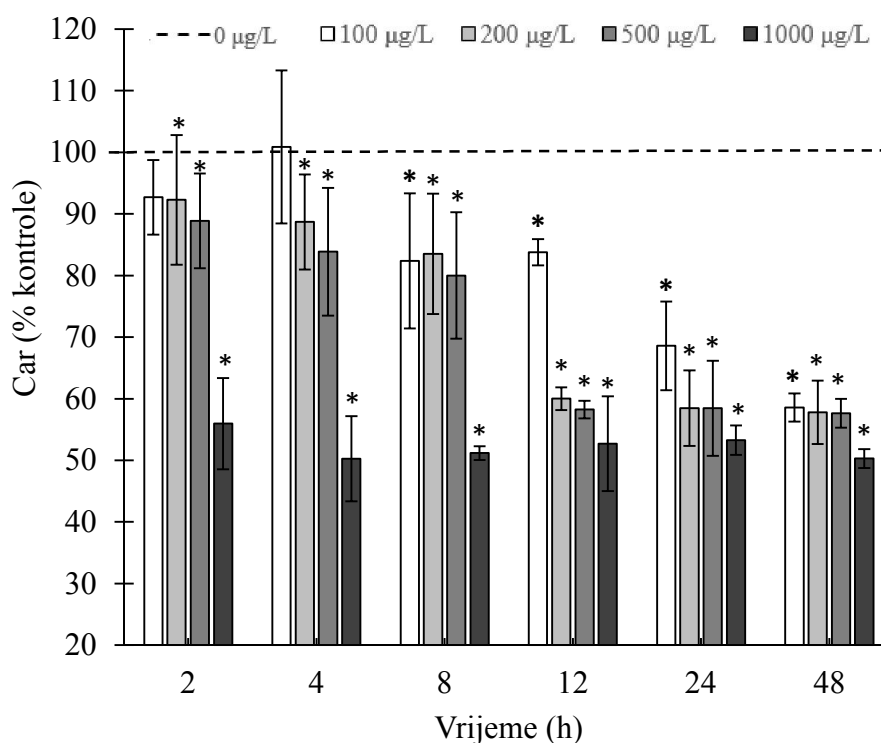
Tretman/Vrijeme		SOD (U mg ⁻¹ prot.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	4,024 ± 0,402	4,104 ± 0,508	4,118 ± 0,441	4,207 ± 0,537	4,181 ± 0,533	4,245 ± 0,437
	100	4,184 ± 0,421	4,275 ± 0,619	4,303 ± 0,535	4,475 ± 0,556	4,549 ± 0,449	5,061 ± 0,496*
	200	4,405 ± 0,500	4,502 ± 0,710	4,452 ± 0,397	4,898 ± 0,436*	5,008 ± 0,526*	5,191 ± 0,181*
	500	4,589 ± 0,583*	4,857 ± 0,708*	4,884 ± 0,386*	5,206 ± 0,370*	5,133 ± 0,256*	5,633 ± 0,237*
	1000	4,793 ± 0,529*	4,898 ± 0,746*	5,305 ± 0,469*	5,835 ± 0,516*	5,456 ± 0,502*	5,863 ± 0,357*
50	0	4,363 ± 0,172	4,296 ± 0,104	4,409 ± 0,242	4,316 ± 0,357	4,399 ± 0,183	4,358 ± 0,307
	100	4,528 ± 0,172	4,566 ± 0,055	5,022 ± 0,061*	4,981 ± 0,188*	5,178 ± 0,320*	5,016 ± 0,060*
	200	4,686 ± 0,638*	4,891 ± 0,113*	5,032 ± 0,059*	5,008 ± 0,158*	5,284 ± 0,452*	5,325 ± 0,196*
	500	5,059 ± 0,332*	5,431 ± 0,527*	5,571 ± 0,424*	5,601 ± 0,572*	5,745 ± 0,747*	6,554 ± 0,282*
	1000	6,504 ± 0,751*	6,796 ± 0,091*	7,084 ± 0,166*	7,020 ± 0,075*	7,191 ± 0,203*	7,278 ± 0,204*
25	0	4,652 ± 0,184	4,581 ± 0,111	4,701 ± 0,258	4,556 ± 0,450	4,690 ± 0,195	4,647 ± 0,328
	100	4,828 ± 0,183*	4,868 ± 0,059*	5,355 ± 0,065*	5,311 ± 0,200*	5,522 ± 0,341*	5,348 ± 0,064*
	200	4,996 ± 0,681*	5,215 ± 0,121*	5,319 ± 0,123*	5,340 ± 0,168*	5,623 ± 0,499*	5,678 ± 0,208*
	500	5,348 ± 0,428*	5,745 ± 0,568*	6,032 ± 0,597*	5,851 ± 0,769*	5,848 ± 0,733*	6,989 ± 0,300*
	1000	6,935 ± 0,800*	7,237 ± 0,107*	7,599 ± 0,113*	7,621 ± 0,418*	7,621 ± 0,287*	7,619 ± 0,253*
10	0	4,653 ± 0,249	4,742 ± 0,164	4,744 ± 0,326	4,749 ± 0,471	4,736 ± 0,022	4,665 ± 0,533
	100	4,746 ± 0,254*	4,793 ± 0,256*	4,745 ± 0,254*	4,790 ± 0,173*	4,761 ± 0,273*	4,717 ± 0,113*
	200	4,841 ± 0,259*	4,889 ± 0,261*	4,983 ± 0,172*	4,941 ± 0,126*	4,773 ± 0,409*	4,816 ± 0,579*
	500	4,937 ± 0,264*	4,987 ± 0,267*	5,082 ± 0,176*	5,183 ± 0,192*	5,204 ± 0,132*	5,189 ± 0,627*
	1000	5,036 ± 0,269*	5,087 ± 0,272*	5,184 ± 0,179*	5,287 ± 0,195*	5,953 ± 0,486*	5,952 ± 0,170*
	F	7,889	8,792	20,429	13,011	12,222	25,838
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.2. Neenzimski antioksidansi

3.7.2.1. Koncentracija ukupnih karotenoida

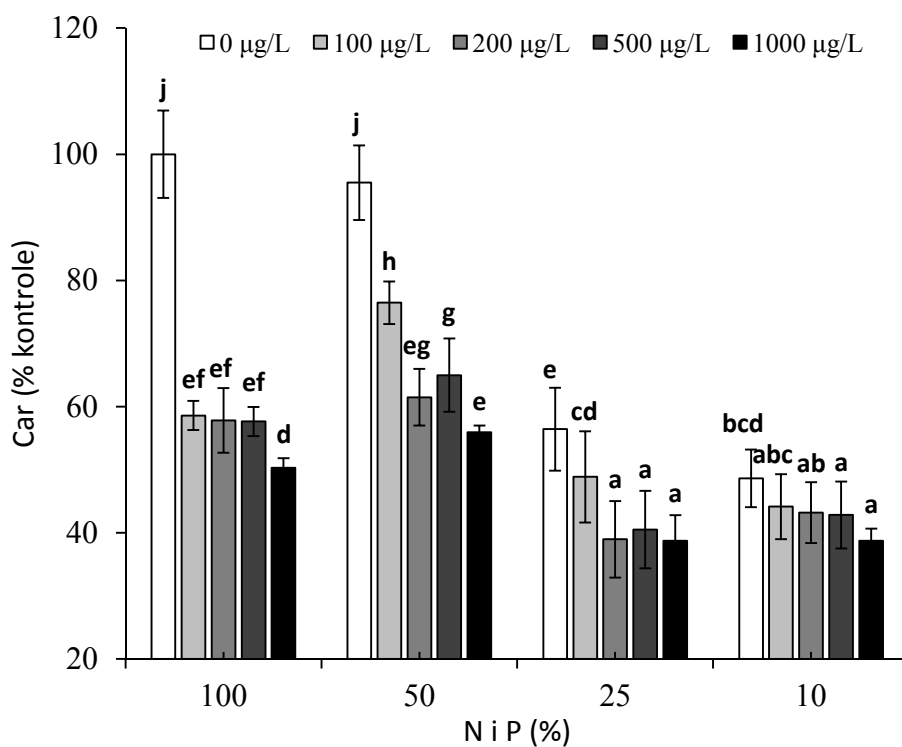
Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 100 $\mu\text{g/L}$ je statistički značajno smanjio koncentraciju karotenoida (Car) u tkivu *L. gibba* nakon 8 h ($P < 0,05$) kada je koncentracija bila 18% manja u usporedbi s kontrolom (Slika 36). Tretmani s 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag imali su značajan utjecaj na koncentraciju Car već 2 h od početka pokusa. S povećanjem trajanja pokusa, dodatno se smanjivala koncentracija ovih antioksidansa u tkivu. Najniže vrijednosti u svim terminima mjerenja zabilježene su u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ kada je koncentracija Car bila u prosjeku 50% manja od vrijednosti izmjenjenih u kontrolnim biljkama. Nakon 48 h tretmana koncentracija Car u tkivu *L. gibba* bila je za 41% manja u tretmanu sa 100 $\mu\text{g/L}$, 42% u tretmanima s 200 $\mu\text{g/L}$ i 500 $\mu\text{g/L}$ te 50% manja u usporedbi s kontrolnom vrijednosti u tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag (Slika 36).



Slika 36. Koncentracija ukupnih karotenoida (Car) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

U biljkama koje su ionskim koloidnim Ag tretirane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P, značajno smanjenje koncentracije Car zabilježeno je nakon 2 h tretmana s 200 (9%), 500 (6%) i 1000 $\mu\text{g/L}$ (11%) (*Tablica 16*). Produženjem trajanja pokusa na 12 h i duže zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije Car pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag s najmanjom vrijednosti pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ nakon 48 h tretmana ($1,763 \pm 0,033$ mg/g sh. tv.). Kada su biljke uzgajane u hranjivoj otopini s 25% N i P bez tretmana ionskim koloidnim Ag koncentracija Car bila je značajno manja u usporedbi s kontrolom. Tretman ionskim koloidnim Ag dodatno je smanjio koncentraciju Car već nakon 2 h (*Tablica 16*). Najniže koncentracije izmjerene su nakon 48 h i iznosile su $1,778 \pm 0,207$ mg/g sh. tv. pri 0 $\mu\text{g/L}$, $1,540 \pm 0,228$ mg/g sh. tv. pri 100 $\mu\text{g/L}$, $1,228 \pm 0,191$ mg/g sh. tv. pri 200 $\mu\text{g/L}$, $1,277 \pm 0,193$ mg/g sh. tv. pri 500 $\mu\text{g/L}$ i $1,220 \pm 0,129$ mg/g sh. tv. pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag. U biljkama koje su tretirane s Ag u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag koncentracija Car bila je 50% manja od koncentracije u kontrolnim biljkama. Koncentracija Car bila je značajno snižena u odnosu na kontrolu i pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag i svim terminima uzorkovanja.

Usporedba koncentracije Car u biljkama tretiranim različitim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 37*. Sniženje koncentracija N i P u hranjivoj otopini na 25 i 10% uzrokovalo je značajno smanjenje koncentracije Car u usporedbi s biljkama koje su rasle pri 100 i 50% koncentracije N i P u hranjivoj otopini. Tretman ionskim koloidnim Ag pri svim koncentracijama uzrokovao je veće smanjenje koncentracije Car u biljkama koje su uzgajane pri 25 i 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke koje su rasle u hranjivoj otopini sa 100 i 50% N i P.



Slika 37. Koncentracija ukupnih karotenoida (Car) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 16. Koncentracija ukupnih karotenoida (Car) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

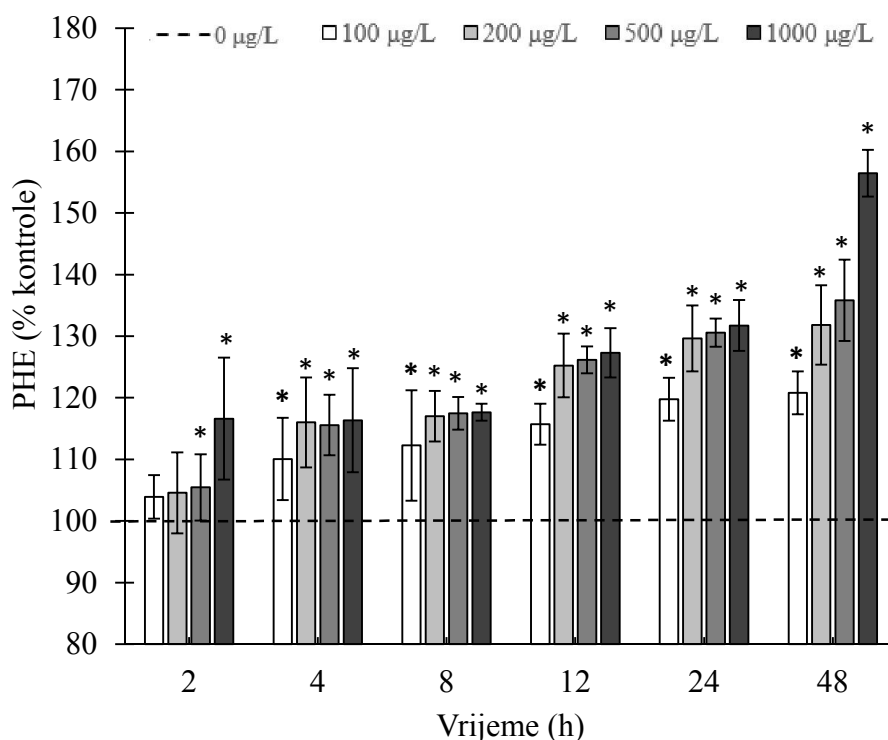
Tretman/Vrijeme		Car (mg/g sh. tv.)					
		2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
N i P (%)	Ag (µg/L)						
100	0	3,153 ± 0,249	3,123 ± 0,179	3,096 ± 0,423	3,106 ± 0,303	3,047 ± 0,436	3,151 ± 0,218
	100	2,922 ± 0,191	3,150 ± 0,387	2,550 ± 0,340*	2,602 ± 0,066*	2,091 ± 0,219*	1,846 ± 0,073*
	200	2,909 ± 0,332*	2,770 ± 0,241*	2,586 ± 0,303*	1,864 ± 0,057*	1,782 ± 0,187*	1,822 ± 0,162*
	500	2,802 ± 0,242*	2,619 ± 0,323*	2,477 ± 0,318*	1,809 ± 0,044*	1,781 ± 0,236*	1,816 ± 0,073*
	1000	1,764 ± 0,234*	1,569 ± 0,216*	1,561 ± 0,101*	1,637 ± 0,239*	1,618 ± 0,179*	1,585 ± 0,049*
50	0	3,065 ± 0,248	3,049 ± 0,207	3,042 ± 0,194	3,035 ± 0,186	3,029 ± 0,184	3,009 ± 0,186*
	100	3,193 ± 0,125	3,235 ± 0,140	2,935 ± 0,127	2,668 ± 0,115*	2,425 ± 0,105*	2,409 ± 0,107*
	200	2,868 ± 0,207*	2,601 ± 0,187*	2,359 ± 0,170*	2,145 ± 0,155*	1,950 ± 0,141*	1,937 ± 0,142*
	500	2,954 ± 0,256*	2,735 ± 0,243*	2,480 ± 0,221*	2,255 ± 0,201*	2,050 ± 0,182*	2,047 ± 0,183*
	1000	2,610 ± 0,054*	2,367 ± 0,049*	2,147 ± 0,045*	1,952 ± 0,041*	1,774 ± 0,037*	1,763 ± 0,033*
25	0	1,850 ± 0,227*	1,831 ± 0,215*	1,823 ± 0,212*	1,814 ± 0,211*	1,778 ± 0,207*	1,778 ± 0,207*
	100	1,798 ± 0,172*	1,635 ± 0,156*	1,630 ± 0,189*	1,587 ± 0,235*	1,555 ± 0,230*	1,540 ± 0,228*
	200	1,628 ± 0,165*	1,357 ± 0,138*	1,351 ± 0,143*	1,265 ± 0,197*	1,240 ± 0,193*	1,228 ± 0,191*
	500	1,675 ± 0,210*	1,396 ± 0,175*	1,390 ± 0,180*	1,315 ± 0,199*	1,289 ± 0,195*	1,277 ± 0,193*
	1000	1,677 ± 0,199*	1,290 ± 0,153*	1,282 ± 0,135*	1,257 ± 0,132*	1,233 ± 0,130*	1,220 ± 0,129*
10	0	1,522 ± 0,084*	1,510 ± 0,151*	1,548 ± 0,203*	1,534 ± 0,181*	1,548 ± 0,141*	1,533 ± 0,144*
	100	1,383 ± 0,086*	1,432 ± 0,123*	1,470 ± 0,198*	1,391 ± 0,162*	1,391 ± 0,162*	1,391 ± 0,162*
	200	1,369 ± 0,163*	1,414 ± 0,147*	1,446 ± 0,162*	1,418 ± 0,159*	1,389 ± 0,155*	1,361 ± 0,152*
	500	1,352 ± 0,129*	1,399 ± 0,138*	1,434 ± 0,177*	1,405 ± 0,174*	1,377 ± 0,170*	1,149 ± 0,167*
	1000	1,309 ± 0,130*	1,352 ± 0,108*	1,379 ± 0,068*	1,324 ± 0,066*	1,271 ± 0,063*	0,625 ± 0,060*
F	92,950	96,153	58,141	93,474	57,005	106,51	
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	

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

3.7.2.2. Koncentracija ukupnih topljivih fenola

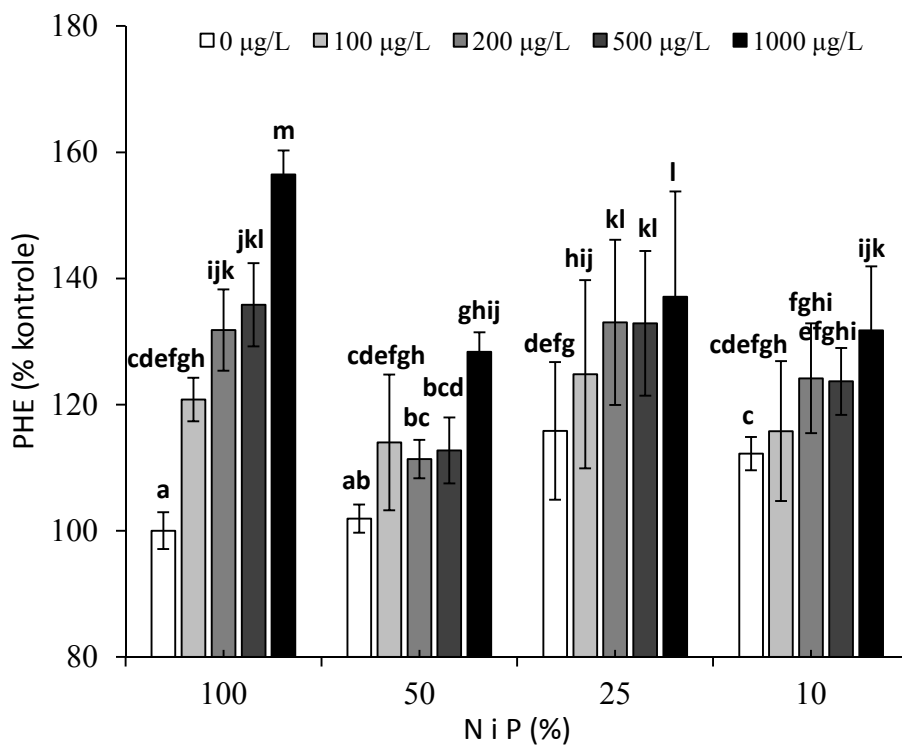
Povišene koncentracije ukupnih topljivih fenola (PHE) u tkivu *L. gibba* uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini zabilježene su pri dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag već nakon 2 h tretmana (*Slika 38*). Nakon 4 h tretmana koncentracija PHE ($7,477 \pm 0,454$ mg_(GAE)/g sv. tv.) statistički je značajno veća za 11% pri 100 µg/L ionskog koloidnog Ag u usporedbi s kontrolom. Trajanjem tretmana duže od 4 h koncentracija PHE u biljkama tretiranim ovom koncentracijom ionskog koloidnog Ag veća je za 12% (8 h), 16% (12 h), 20% (24 h) i 21% (48 h) u odnosu na kontrolu. Tretman biljaka *L. gibba* s 200, 500 i 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini imao je sličan utjecaj na koncentraciju PHE nakon 4, 8, 12 i 24 h. Koncentracije PHE bila je u prosjeku 16% veća nakon 4 h, 17% veća nakon 8 h, 26% veća nakon 12 h i 30% veća nakon 24 h pri sve tri navedene koncentracije ionskog koloidnog Ag. Nakon 48 h od početka tretmana koncentracija PHE u *L. gibba* bila je 32% pri 200 µg/L i 36% pri 500 µg/L ionskog koloidnog Ag. Najveća izmjerena koncentracija PHE ($10,68 \pm 0,260$ mg_(GAE)/g sv. tv.), zabilježena nakon 48 h tretmana najvećom koncentracijom Ag, bila je 56% veća u usporedbi s vrijednosti u kontrolnim biljkama (*Slika 38*).

U biljkama koje su uzgajane na hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P značajno povećanje koncentracije PHE zabilježeno je nakon 2 h tretmana sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag (*Tablica 17*). Najviša koncentracija ($8,768 \pm 0,213$ mg_(GAE)/g sv. tv.) izmjerena u tretmanu s 1000 µg/L nakon 48 h bila je 28% veća u usporedbi s kontrolom ($6,831 \pm 0,199$ mg_(GAE)/g sv. tv.). Koncentracija PHE u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 25% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag bila je statistički značajno veća od kontrolne vrijednosti ($P < 0,05$). Već nakon 2 h utvrđeno je značajno povećanje koncentracije PHE pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag (*Tablica 17*). Najviša koncentracija ($9,715 \pm 0,674$ mg_(GAE)/g sv. tv.) izmjerena u tretmanu s 1000 µg/L nakon 48 h bila je 37% veća u usporedbi s kontrolom. U biljkama koje su uzgajane pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini bez dodatka ionskog koloidnog Ag utvrđena je značajno veća koncentracija PHE u odnosu na kontrolu. Dodatak ionskog koloidnog Ag također je uzrokovao značajnu akumulaciju PHE već nakon 2 h pri svim testiranim koncentracijama (*Tablica 17*). Najveća koncentracija izmjerena u tretmanu s 1000 µg/L nakon 48 h ($9,715 \pm 0,674$ mg_(GAE)/g sv. tv.) bila je 32% veća u usporedbi s kontrolom.



Slika 38. Koncentracija ukupnih topljivih fenola (PHE) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Povećanje koncentracije PHE u biljkama uzgajanim pri različitim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini nakon 48 h tretmana ionskim koloidnim Ag prikazano je na slici 39. Sniženje koncentracija N i P u hranjivoj otopini na 25 i 10% uzrokovalo je značajno povećanje koncentracije PHE u usporedbi s biljkama koje su rasle pri 100 i 50% koncentracije N i P u hranjivoj otopini. Akumulacija PHE u biljkama koje su uzgajane pri 50% i 10% N i P u hranjivoj otopini i tretirane ionskim koloidnim Ag koncentracije 200 i 500 µg/L bila je manja u usporedbi s djelovanjem istih koncentracija ionskog Ag na biljke uzgajane u hranjivoj otopini sa 100 i 25% N i P. Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag koncentracija PHE bila je statistički značajno najniža u biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P.



Slika 39. Koncentracija ukupnih topljivih fenola (PHE) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

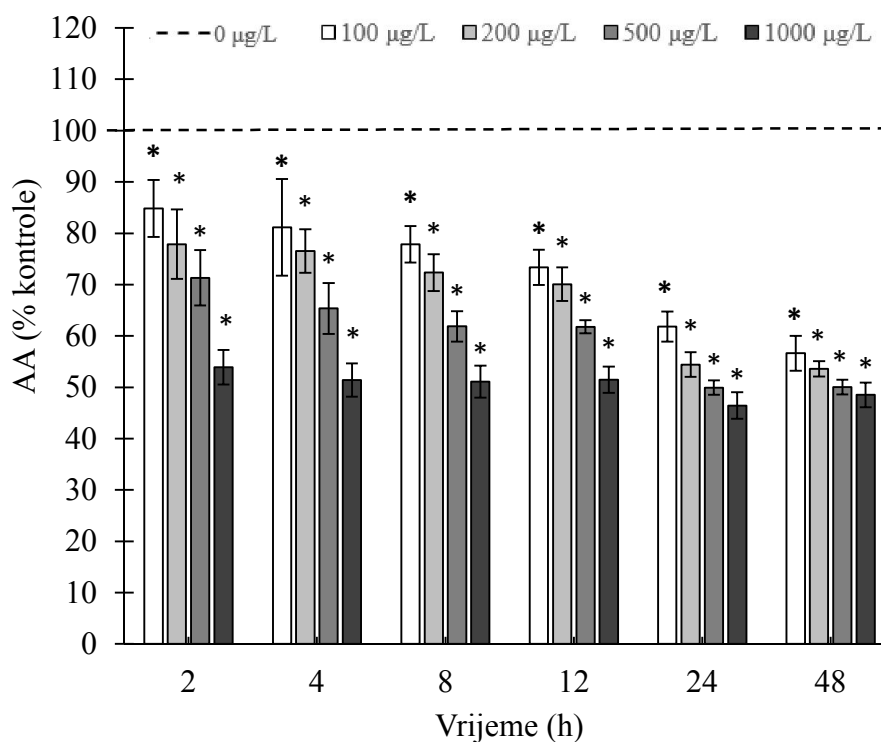
Tablica 17. Koncentracija ukupnih topljivih fenola (PHE) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		PHE (mg _(GAE) /g sv. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	6,761 ± 0,199	6,793 ± 0,155	6,775 ± 0,253	6,702 ± 0,181	6,799 ± 0,225	6,831 ± 0,199
	100	7,027 ± 0,239*	7,477 ± 0,454*	7,607 ± 0,608*	7,755 ± 0,224*	8,143 ± 0,236*	8,253 ± 0,237*
	200	7,071 ± 0,444*	7,881 ± 0,496*	7,929 ± 0,279*	8,393 ± 0,347*	8,813 ± 0,364*	9,005 ± 0,441*
	500	7,130 ± 0,363*	7,851 ± 0,333*	7,959 ± 0,179*	8,455 ± 0,148*	8,878 ± 0,155*	9,279 ± 0,449*
	1000	7,884 ± 0,669*	7,904 ± 0,573*	7,971 ± 0,093*	8,530 ± 0,268*	8,956 ± 0,281*	10,68 ± 0,260*
50	0	6,958 ± 0,207	6,910 ± 0,143	6,984 ± 0,534	6,936 ± 0,608	6,983 ± 0,330	6,962 ± 0,152
	100	7,033 ± 0,251*	7,312 ± 1,018*	7,641 ± 0,348*	7,863 ± 0,395*	7,841 ± 0,442*	7,788 ± 0,735*
	200	7,072 ± 0,315*	7,790 ± 0,527*	7,606 ± 0,174*	8,075 ± 0,636*	7,903 ± 0,425*	7,607 ± 0,208*
	500	7,005 ± 0,405*	7,802 ± 0,344*	7,674 ± 0,145*	8,293 ± 0,723*	8,124 ± 0,721*	7,700 ± 0,356*
	1000	7,753 ± 0,614*	7,917 ± 0,532*	7,714 ± 0,439*	8,304 ± 0,937*	8,392 ± 0,841*	8,768 ± 0,213*
25	0	8,199 ± 0,366*	8,147 ± 0,052*	8,225 ± 0,057*	8,401 ± 0,242*	8,159 ± 0,371*	8,244 ± 0,672*
	100	8,409 ± 0,273*	8,918 ± 0,176*	8,809 ± 0,054*	8,900 ± 0,320*	8,495 ± 0,317*	8,857 ± 0,704*
	200	8,607 ± 0,475*	8,940 ± 0,283*	9,030 ± 0,289*	9,467 ± 0,156*	9,531 ± 0,320*	9,449 ± 0,571*
	500	8,817 ± 0,326*	8,934 ± 0,050*	9,056 ± 0,033*	9,464 ± 0,485*	9,591 ± 0,567*	9,437 ± 0,335*
	1000	8,863 ± 0,249*	9,064 ± 0,165*	9,181 ± 0,177*	9,556 ± 0,903*	9,689 ± 0,501*	9,715 ± 0,674*
10	0	7,607 ± 0,184*	7,671 ± 0,081*	7,517 ± 0,049*	7,676 ± 0,279*	7,745 ± 0,363*	7,665 ± 0,181*
	100	7,666 ± 0,218*	7,973 ± 0,176*	7,859 ± 0,055*	8,076 ± 0,443*	7,751 ± 0,249*	7,910 ± 0,757*
	200	7,635 ± 0,221*	7,992 ± 0,261*	8,078 ± 0,265*	8,641 ± 0,430*	8,614 ± 0,311*	8,483 ± 0,593*
	500	7,843 ± 0,298*	7,995 ± 0,053*	8,112 ± 0,052*	8,515 ± 0,405*	8,652 ± 0,481*	8,448 ± 0,364*
	1000	7,887 ± 0,245*	7,990 ± 0,111*	8,177 ± 0,173*	8,564 ± 0,741*	8,848 ± 0,487*	9,000 ± 0,694*
	F	22,277	16,086	34,472	9,399	16,561	16,647
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.2.3. Koncentracija askorbinske kiseline

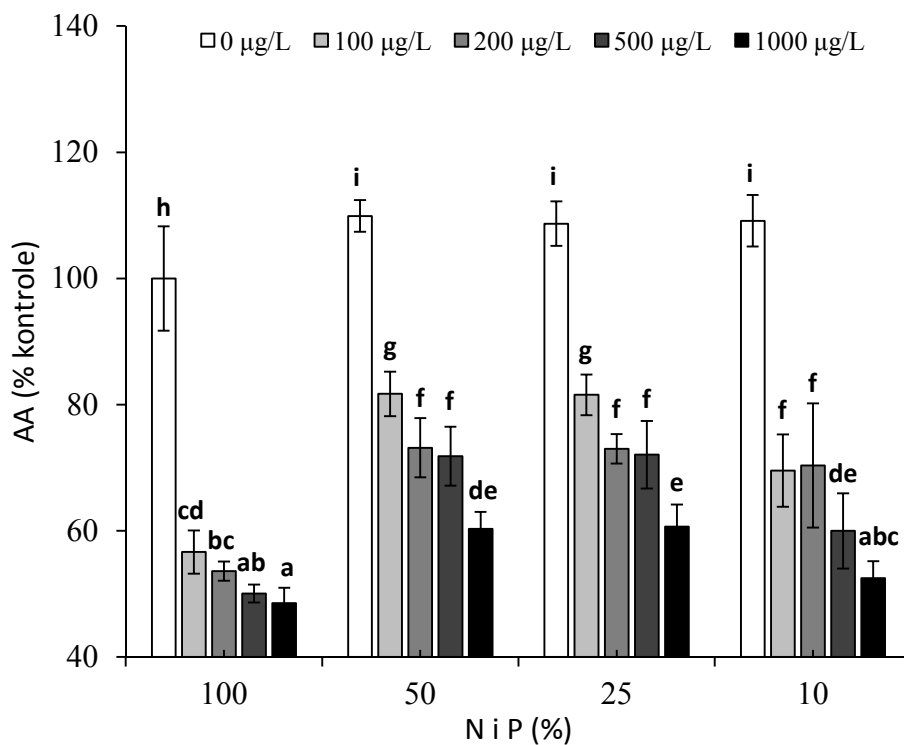
Sve testirane koncentracije ionskog koloidnog Ag imale su statistički značajan utjecaj na koncentraciju askorbinske kiseline (AA) u tkivu *L. gibba* uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 40). Statistički značajno smanjenje koncentracije AA zabilježeno je već nakon 2 h tretmana: 17% (100 µg/L), 22% (200 µg/L), 28% (500 µg/L) i 46% (1000 µg/L). Tijekom pokusa zabilježeno je progresivno smanjenje koncentracije AA u svim tretmanima s najmanjim vrijednostima izmjerenim nakon 48 h. Koncentracija AA u biljkama nakon 48 h od početka pokusa bila je 45% manja u tretmanu sa 100 µg/L, 46% u tretmanu s 200 µg/L i 50% u tretmanu s 500 µg/L (Slika 40). Najmanja izmjerena vrijednost, $49,193 \pm 2,436$ µmol/g sv. tv., izmjerena je u tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag i bila je dvostruko manja od vrijednosti izmjerenih u kontroli ($101,36 \pm 8,392$ µmol/g sv. tv.) (Slika 40).



Slika 40. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

U biljkama koje su uzgajane u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama N i P koncentracija AA statistički se značajno razlikovala od kontrole pri svim tretmanima i tijekom cijelog pokusa. Koncentracija AA u biljkama koje su tretirane samo hranjivom otopinom s 50% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag bila je značajno veća u odnosu na kontrolu (*Tablica 18*). Dodatkom ionskog koloidnog Ag ovim biljkama zabilježeno je smanjenje koncentracije AA. Već nakon 2 h tretmana s najmanjom koncentracijom ionskog koloidnog Ag koncentracija AA iznosila je $98,357 \pm 8,653 \mu\text{mol/g sv. tv.}$, što je 4% manja vrijednost u uspoređivanju s kontrolom, dok je pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag koncentracija AA bila manja 46% u uspoređivanju s kontrolom. S produženjem trajanja izloženosti smanjivala se koncentracija AA. Nakon 48 h koncentracija AA u biljkama koje su rasle na hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bila je 19% manja pri 100 $\mu\text{g/L}$, 27% manja pri 200 $\mu\text{g/L}$, 28% manja pri 500 $\mu\text{g/L}$ te 40% manja od kontrole pri tretmanu s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag (*Tablica 18*). U biljkama koje su uzgajane i tretirane u hranjivim otopinama s 25% i 10% N i P zabilježene su slične promjene kao i u biljkama pri 50% N i P u hranjivoj otopini (*Tablica 18*). Samim sniženjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini došlo je do značajnog povećanja koncentracije AA u biljkama koje su uzgajane pri 25 i 10% N i P u odnosu na potpunu hranjivu otopinu kao kontrolu. Već nakon 2 h tretmana s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag koncentracija AA bila je 30% manja od kontrole u biljkama u hranjivoj otopini s 25% N i P te 29% manja u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 10% N i P (*Tablica 18*). U biljkama *L. gibba* koje su uzgajane pri 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini s porastom koncentracije ionskog koloidnog Ag i s vremenom trajanja pokusa zabilježen je daljnji pad koncentracije AA. Najmanja koncentracija utvrđena nakon 48 h tretmana s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag iznosila je $61,498 \pm 3,525 \mu\text{mol/g sv. tv.}$ što je 39% manja vrijednost od kontrole. Smanjenje koncentracije AA u biljkama koje su uzgajane pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini i tretirane ionskim koloidnim Ag nakon 48 h iznosilo je 30% (100 $\mu\text{g/L}$), 30% (200 $\mu\text{g/L}$), 40% (500 $\mu\text{g/L}$) i 48% (1000 $\mu\text{g/L}$).

Usporedbom djelovanja iste koncentracije Ag pri različitim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini vidi se značajna interakcija razrjeđenja nutrijenata i koncentracije Ag na koncentraciju AA u *L. gibba*. Pri svim tretmanima utvrđene su značajno veće koncentracije AA u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini sa sniženim koncentracijama N i P u uspoređivanju s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini (*Slika 41*).



Slika 41. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

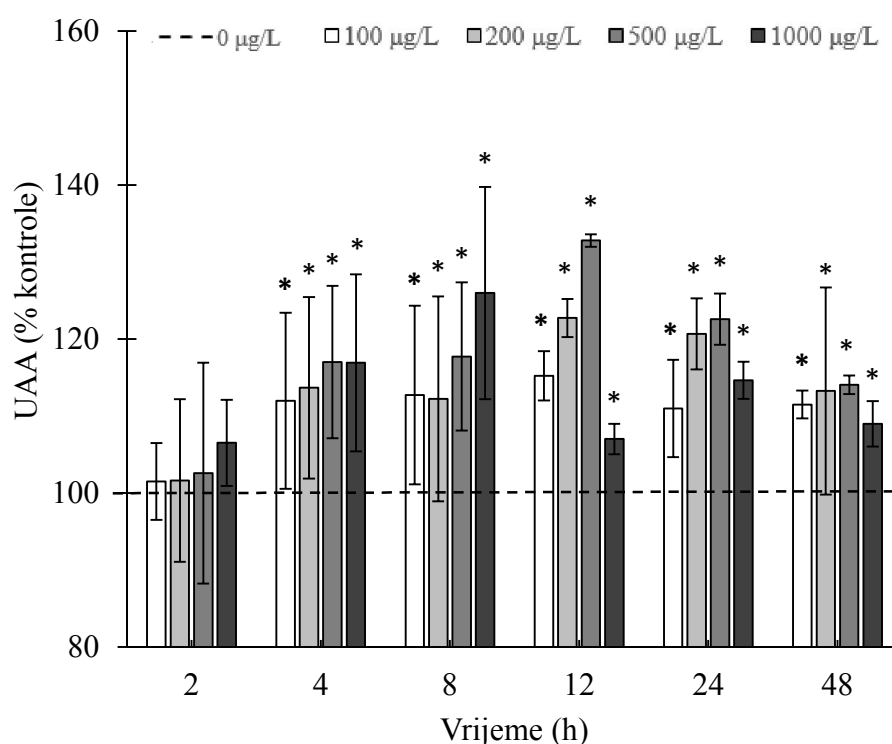
Tablica 18. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		AA (µmol/g sv. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	101,48 ± 5,153	102,07 ± 3,341	102,73 ± 2,515	102,54 ± 2,349	101,58 ± 2,356	101,36 ± 8,392
	100	86,096 ± 5,654*	82,820 ± 9,598*	79,967 ± 3,643*	75,235 ± 3,530*	62,793 ± 2,999*	57,391 ± 3,461*
	200	79,025 ± 6,886*	78,120 ± 4,338*	74,317 ± 3,689*	71,866 ± 3,359*	55,280 ± 2,454*	54,334 ± 1,535*
	500	72,380 ± 5,478*	66,704 ± 5,042*	63,551 ± 3,024*	63,353 ± 1,327*	50,730 ± 1,440*	50,730 ± 1,440*
	1000	54,706 ± 3,422*	52,479 ± 3,296*	52,478 ± 3,201*	52,781 ± 2,608*	47,176 ± 2,613*	49,193 ± 2,436*
50	0	110,070 ± 5,367*	112,943 ± 6,076*	111,723 ± 4,847*	111,862 ± 3,876*	111,188 ± 2,701*	111,386 ± 2,545*
	100	98,357 ± 8,653*	95,023 ± 7,269*	93,004 ± 6,587*	83,585 ± 3,903*	82,682 ± 3,875*	82,819 ± 3,573*
	200	86,781 ± 7,560*	86,781 ± 7,560*	83,435 ± 5,834*	75,484 ± 5,586*	74,715 ± 5,529*	74,152 ± 4,769*
	500	78,978 ± 5,582*	77,724 ± 3,794*	81,674 ± 8,098*	73,879 ± 6,294*	73,130 ± 6,238*	72,793 ± 4,740*
	1000	64,937 ± 3,009*	63,366 ± 2,693*	60,054 ± 5,553*	60,766 ± 4,612*	60,101 ± 4,735*	61,095 ± 2,759*
25	0	110,607 ± 8,937*	109,673 ± 2,962*	109,375 ± 7,044*	110,394 ± 3,585*	109,714 ± 5,046*	110,162 ± 3,594*
	100	99,052 ± 6,220*	95,461 ± 10,218*	93,254 ± 6,379*	82,966 ± 3,314*	82,666 ± 3,721*	82,653 ± 3,259*
	200	86,684 ± 7,429*	87,594 ± 5,864*	84,815 ± 4,909*	74,769 ± 1,880*	72,431 ± 3,868*	73,982 ± 2,369*
	500	80,210 ± 8,019*	80,574 ± 5,771*	83,306 ± 5,813*	74,498 ± 3,950*	70,059 ± 6,187*	73,035 ± 5,423*
	1000	71,412 ± 3,290*	65,981 ± 2,645*	62,466 ± 2,195*	62,414 ± 2,917*	60,926 ± 3,289*	61,498 ± 3,525*
10	0	110,241 ± 8,334*	111,259 ± 7,843*	111,042 ± 5,656*	111,505 ± 4,547*	111,047 ± 2,710*	110,606 ± 4,146*
	100	91,087 ± 7,532*	86,533 ± 7,156*	82,206 ± 6,798*	78,096 ± 6,458*	74,191 ± 6,135*	70,482 ± 5,828*
	200	92,132 ± 2,898*	87,525 ± 2,254*	83,149 ± 4,641*	78,992 ± 3,059*	75,042 ± 1,506*	71,290 ± 9,981*
	500	80,248 ± 8,002*	76,235 ± 7,602*	72,423 ± 7,222*	68,802 ± 6,861*	65,362 ± 6,518*	60,787 ± 6,062*
	1000	71,766 ± 3,683*	68,178 ± 3,499*	64,769 ± 3,324*	61,531 ± 3,158*	57,223 ± 2,937*	48,668 ± 2,731*
	F	43,914	57,442	72,291	115,83	147,82	161,30
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.7.3. Ukupna antioksidacijska aktivnost

Nakon 4 h tretmana s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini zabilježeno je povećanje ukupne antioksidacijske aktivnosti (UAA) u biljkama (Slika 42). Nakon 12 h u tretmanima sa 100, 200 i 500 $\mu\text{g/L}$ Ag UAA bila je 15%, 23% i 33%, dok je pri 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag vrijednost UAA bila 7% veća u usporedbi s kontrolom. Iako su sve vrijednosti UAA izmjerene nakon 24 h i 48 h bile statistički značajno veće od vrijednosti u kontroli ($P < 0,05$), u svim tretmanima zabilježena aktivnost bila je manja od aktivnosti nakon 12 h.

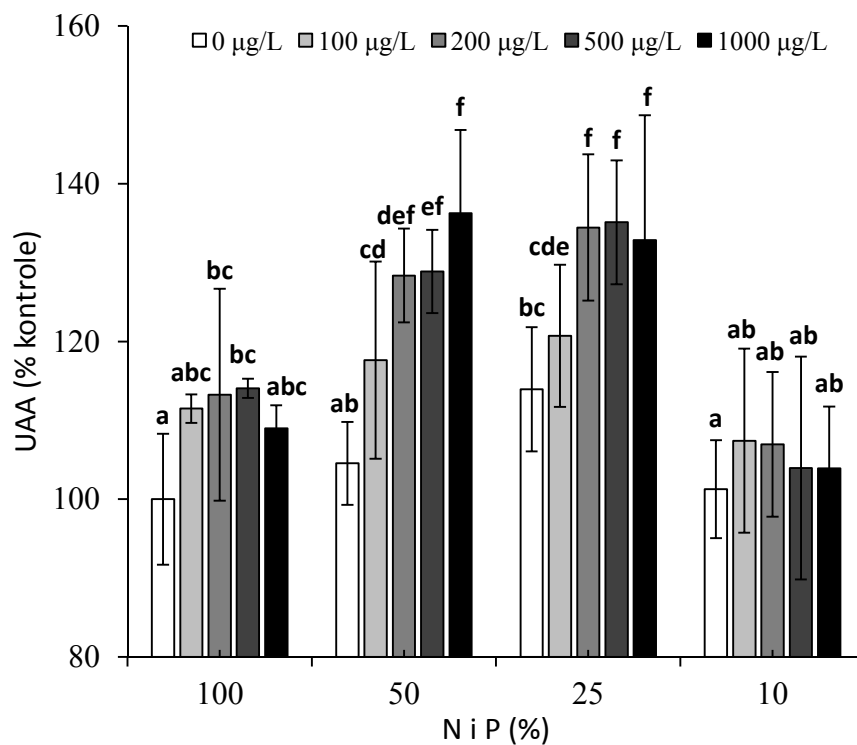


Slika 42. Ukupna antioksidacijska aktivnosti (UAA) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

UAA u biljkama koje su tretirane ionskim koloidnim Ag u kombinaciji s 50% N i P u hranjivoj otopini, povećavala se s povećanjem koncentracije Ag (Tablica 19). Najveće vrijednosti zabilježene su u tretmanu koji je trajao 8 h. Kada je tretman trajao 12, 24 i 48 h, pri svim koncentracijama Ag UAA bila je veća u usporedbi s kontrolom ali manja u usporedbi s

vrijednosti izmjerenoj u istom tretmanu 8 h od početka izlaganja (*Tablica 19*). U biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag izmjerene vrijednosti UAA bile su značajno veće od kontrole. Dodatak ionskog koloidnog Ag također je značajno povećao vrijednosti UAA u odnosu na kontrolu tijekom cijelog pokusa. Najveće vrijednosti pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag izmjerene su nakon 12 h. Pri tretmanu s 1000 µg/L Ag nakon 12 h vrijednost UAA iznosila je $9,796 \pm 0,426 \mu\text{mol}_{\text{TROLOX}}/\text{g sv. tv.}$ te je 46% veća u usporedbi s kontrolom. Nakon 24 h i 48 h pri tretmanima svim koncentracijama Ag UAA bila je veća u usporedbi s kontrolom ali manja u usporedbi s vrijednosti izmjerenoj u istom tretmanu 12 h od početka izlaganja (*Tablica 19*). U biljkama koje su tretirane s Ag u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P značajno povećanje vrijednosti UAA utvrđeno je pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag nakon 2 i 4 h od početka pokusa. Nakon 8 i 12 h značajan utjecaj imala je samo najveća koncentracija ionskog koloidnog Ag pri kojoj je UAA bila 13% veća od kontrole. U pokusima koji su trajali 24 i 48 h nisu zabilježene statistički značajne promjene UAA ($P < 0,05$) (*Tablica 19*).

Usporedba djelovanja iste koncentracije Ag na *L. gibba* uzgajane pri različitim razrijeđenjima N i P u hranjivoj otopini prikazana je na *slici 43*. Ukupna antioksidacijska aktivnost nakon 48 h tretmana s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag bila je statistički značajno veća u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50 i 25% koncentracije N i P u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije na biljke u hranjivoj otopini sa 100 i 10% N i P. Pri tretmanu s 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag UAA bila je 9 % veća od kontrole u biljkama tretiranim u potpunoj hranjivoj otopini. Ista koncentracija ionskog koloidnog Ag povećala je UAA u biljkama tretiranim u hranjivoj otopini s 50% N i P za 36% te u hranjivoj otopini s 25% N i P za 38% u usporedbi s kontrolom (*Slika 43*).



Slika 43. Ukupna antioksidacijska aktivnosti (UAA) u *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

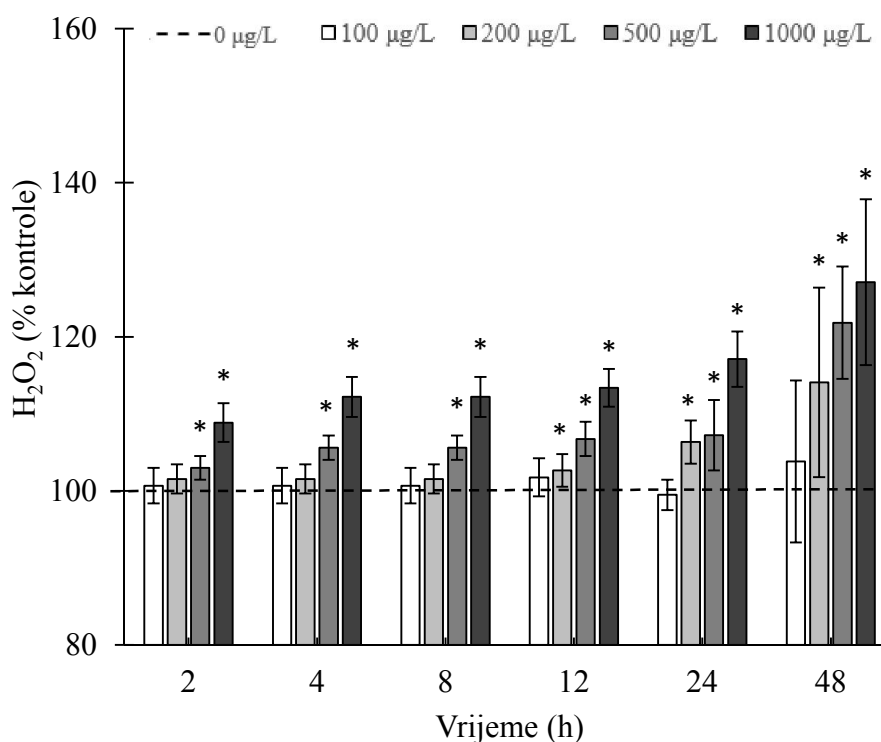
Tablica 19. Ukupna antioksidacijska aktivnost (UAA) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		UAA (µmol _{Trolox} /g sv. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	6,172 ± 0,388	6,432 ± 0,751	6,675 ± 0,778	6,698 ± 0,284	6,869 ± 0,128	6,871 ± 0,569
	100	6,264 ± 0,309	7,203 ± 0,737*	7,525 ± 0,774*	7,718 ± 0,215*	7,624 ± 0,433*	7,661 ± 0,124*
	200	6,273 ± 0,652	7,312 ± 0,758*	7,492 ± 0,888*	8,221 ± 0,166*	8,290 ± 0,317*	7,782 ± 0,923*
	500	6,331 ± 0,884	7,527 ± 0,636*	7,859 ± 0,642*	8,895 ± 0,053*	8,420 ± 0,229*	7,837 ± 0,083*
	1000	6,574 ± 0,345	7,520 ± 0,740*	8,409 ± 0,920*	7,169 ± 0,132*	7,875 ± 0,165*	7,488 ± 0,202*
50	0	7,086 ± 0,341*	7,157 ± 0,345*	7,158 ± 0,357	7,134 ± 0,346	7,156 ± 0,446	7,183 ± 0,362
	100	7,715 ± 0,820*	8,487 ± 0,902*	9,335 ± 0,992*	9,149 ± 0,972*	8,508 ± 0,904*	8,083 ± 0,859*
	200	8,419 ± 0,389*	9,261 ± 0,428*	10,187 ± 0,471*	9,983 ± 0,462*	9,284 ± 0,429*	8,820 ± 0,408*
	500	8,279 ± 0,339*	9,107 ± 0,373*	10,018 ± 0,411*	9,817 ± 0,402*	9,130 ± 0,374*	8,856 ± 0,363*
	1000	8,395 ± 0,651*	9,654 ± 0,749*	10,813 ± 0,839*	10,597 ± 0,822*	9,855 ± 0,764*	9,362 ± 0,726*
25	0	7,847 ± 0,652*	7,806 ± 0,158*	7,973 ± 0,088*	7,893 ± 0,087*	7,992 ± 0,600*	7,830 ± 0,541*
	100	7,745 ± 0,719*	7,843 ± 0,242*	8,141 ± 0,216*	8,455 ± 0,375*	8,389 ± 1,026*	8,295 ± 0,619*
	200	8,198 ± 0,575*	8,538 ± 0,467*	8,868 ± 0,601*	9,217 ± 0,797*	9,377 ± 0,578*	9,238 ± 0,638*
	500	8,468 ± 0,719*	8,902 ± 0,244*	9,244 ± 0,405*	9,606 ± 0,638*	9,461 ± 0,935*	9,284 ± 0,540*
	1000	8,506 ± 0,803*	9,095 ± 0,477*	9,436 ± 0,365*	9,796 ± 0,426*	9,096 ± 1,158*	9,130 ± 1,088*
10	0	6,930 ± 0,268*	6,990 ± 0,274	7,000 ± 0,265	6,984 ± 0,297	6,970 ± 0,354	6,958 ± 0,427
	100	7,049 ± 0,484*	7,111 ± 0,515*	7,176 ± 0,566	7,242 ± 0,634	7,310 ± 0,714	7,381 ± 0,803
	200	7,045 ± 0,635*	7,102 ± 0,594*	7,161 ± 0,571	7,222 ± 0,570	7,285 ± 0,590	7,350 ± 0,630
	500	7,008 ± 0,873*	7,075 ± 0,936*	7,143 ± 1,007	7,275 ± 0,929	7,345 ± 0,570	7,143 ± 0,970
	1000	7,395 ± 0,470*	7,459 ± 0,478*	7,525 ± 0,513*	7,593 ± 0,571*	7,517 ± 0,565	7,141 ± 0,537
	F	13,142	16,080	23,349	27,563	11,534	10,573
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.8. Koncentracija vodikovog peroksida

Utjecaj ionskog koloidnog Ag na koncentraciju vodikovog peroksida (H_2O_2) u stanicama *L. gibba* u potpunoj hranjivoj otopini prikazan je na slici 44. S povećanjem vremena trajanja pokusa zabilježeno je progresivno povećanje koncentracije H_2O_2 u stanicama *L. gibba*. U biljkama koje su uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini (100% N i P) utvrđeno je značajno povećanje koncentracije H_2O_2 nakon 2, 4 i 8 h pri tretmanu s 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag. Kada je tretman trajao 12 h i duže značajno povećanje koncentracije H_2O_2 zabilježeno je pri tretmanima s 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag. Nakon 48 h u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag koncentracija H_2O_2 ($6,114 \pm 0,518 \mu\text{mol/g sv. tv.}$) bila je 27% veća u usporedbi s kontrolom ($4,811 \pm 0,177 \mu\text{mol/g sv. tv.}$).

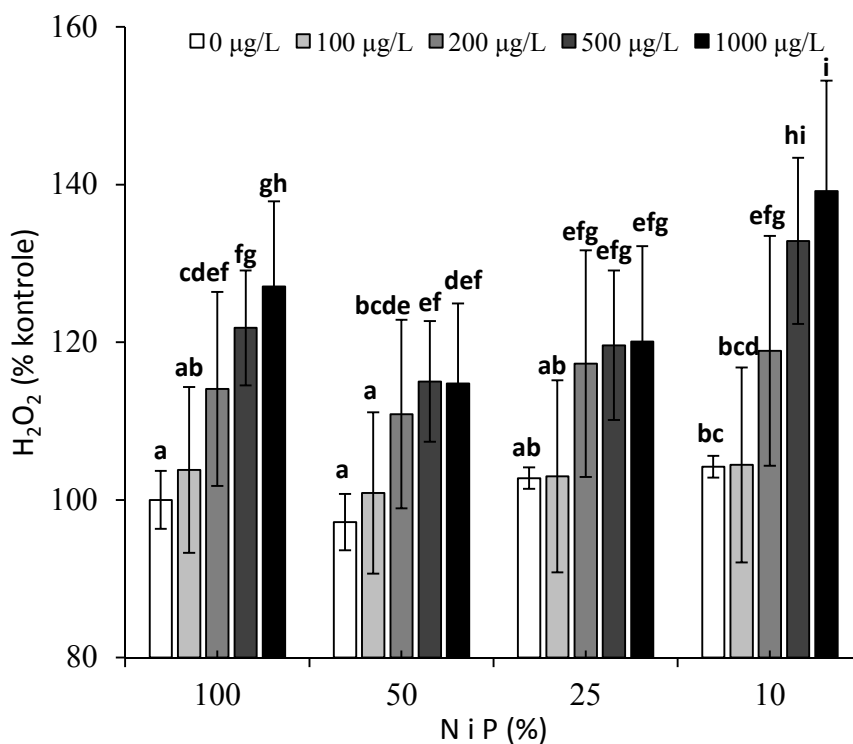


Slika 44. Koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Tijekom prvih 12 h trajanja pokusa, koncentracija H₂O₂ u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag bila je statistički značajno manja u usporedbi s kontrolom (*Tablica 20*). Značajno povećanje koncentracije H₂O₂ u biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P utvrđeno je nakon 4, 8, 12 i 24 h tretmana s 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag, dok je nakon 48 h značajno povećanje koncentracije H₂O₂ zabilježeno pri tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag. Nakon 48 h koncentracija H₂O₂ bila je 11% (200 µg/L) i 15% (500 µg/L i 1000 µg/L) veća u usporedbi s kontrolom. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 200, 500 i 1000 µg/L uzrokovao je značajno povećanje koncentracije H₂O₂ u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P tijekom cijelog pokusa (*Tablica 20*). S povećanjem vremena trajanja pokusa zabilježeno je progresivno povećanje koncentracije H₂O₂ u stanicama *L. gibba* te su najveće vrijednosti izmjerene nakon 48 h. Nakon 48 h koncentracija H₂O₂ bila je 20% veća pri tretmanu s 1000 µg/L u usporedbi s kontrolom (P<0,05). U biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag, koncentracija H₂O₂ bila je značajno veća u usporedbi s kontrolom. Tretman svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag uzrokovao je značajno povećanje koncentracije H₂O₂ već nakon 2 h tretmana (P<0,05) pa je tako pri tretmanu s 1000 µg/L Ag zabilježeno povećanje koncentracije H₂O₂ za 17% u usporedbi s kontrolom. Povećanje koncentracije H₂O₂ od 33% i 60% u odnosu na kontrolu zabilježeno je u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P 48 h od početka tretmana s 500 i 1000 µg/L.

Usporedba koncentracije H₂O₂ u biljkama tretiranim s različitim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P prikazana je na *slici 45*. Pri tretmanu ionskim koloidnim Ag koncentracija 100 i 200 µg/L nakon 48 h nije utvrđena statistički značajna razlika među biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P. Pri tretmanu s 500 µg/L ionskog koloidnog Ag koncentracija H₂O₂ bila je najveća u biljkama koje su rasle pri 10% koncentracije N i P u hranjivoj otopini (6,392 ± 0,506 µmol/g sv. tv.). Nakon 48 h tretmana s 500 µg/L sadržaj H₂O₂ u biljkama koje su uzgajane pri 50% i 25% koncentracije N i P nije se razlikovao od koncentracije H₂O₂ pri istom tretmanu u potpunoj hranjivoj otopini i hranjivoj otopini s 10% N i P (*Slika 45*). Pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag koncentracija H₂O₂ bila je statistički značajno manja u biljkama koje su uzgajane pri 50% koncentracije N i P u odnosu na biljke uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini. Najveća koncentracija H₂O₂ (7,692 ± 0,674 µmol/g sv. tv.) izmjerena je u biljkama koje su tretirane s 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag u

hranjivoj otopini s 10% N i P i ta je vrijednost bila značajno veća od vrijednosti pri istom tretmanu i 100, 50 i 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini (Slika 45).



Slika 45. Koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) u stanicama *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole \pm SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

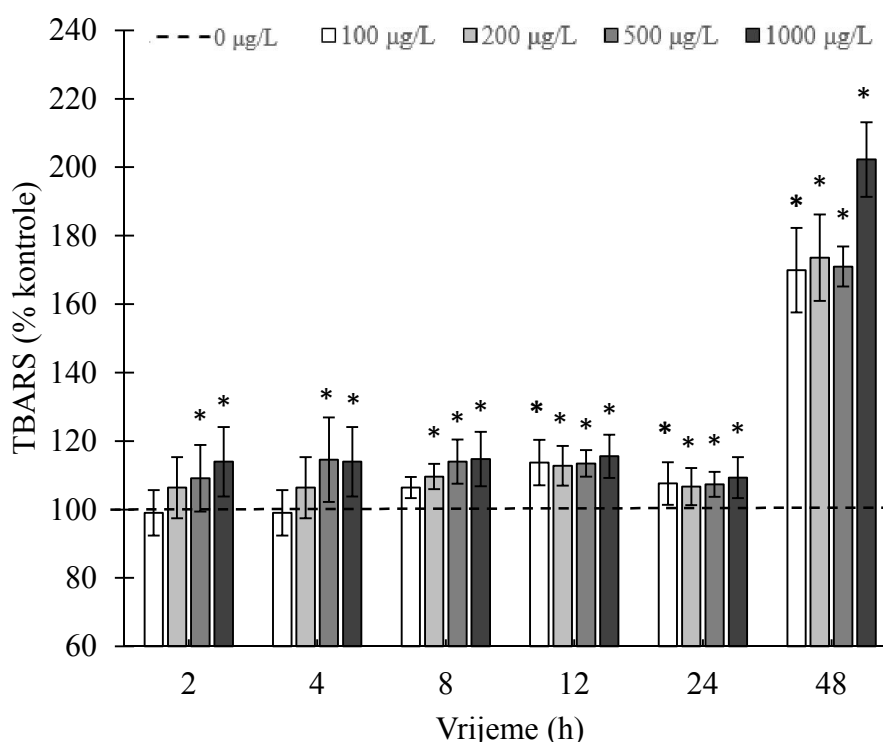
Tablica 20. Koncentracija vodikovog peroksida (H₂O₂) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		H ₂ O ₂ (µmol/g sv. tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	4,881 ± 0,045	4,857 ± 0,045	4,905 ± 0,046	4,885 ± 0,101	4,710 ± 0,183	4,811 ± 0,177
	100	4,913 ± 0,113	4,889 ± 0,112	4,938 ± 0,114	4,970 ± 0,120	4,685 ± 0,093	4,994 ± 0,506
	200	4,956 ± 0,092	4,931 ± 0,091	4,981 ± 0,092	5,014 ± 0,103*	5,008 ± 0,132*	5,488 ± 0,592*
	500	5,026 ± 0,075*	5,128 ± 0,077*	5,179 ± 0,077*	5,214 ± 0,109*	5,050 ± 0,215*	5,861 ± 0,351*
	1000	5,313 ± 0,122*	5,448 ± 0,125*	5,503 ± 0,127*	5,539 ± 0,120*	5,516 ± 0,170*	6,114 ± 0,518*
50	0	4,477 ± 0,044*	4,721 ± 0,045*	4,768 ± 0,061*	4,748 ± 0,098*	4,578 ± 0,174	4,677 ± 0,172
	100	4,775 ± 0,110*	4,752 ± 0,109*	4,799 ± 0,110	4,831 ± 0,117	4,621 ± 0,091	4,854 ± 0,492
	200	4,817 ± 0,089	7,793 ± 0,089	4,841 ± 0,090	4,873 ± 0,100	4,868 ± 0,129	5,335 ± 0,575*
	500	4,865 ± 0,069	4,841 ± 0,109	4,889 ± 0,110	4,922 ± 0,130	4,767 ± 0,224	5,534 ± 0,369*
	1000	4,973 ± 0,114	5,143 ± 0,152*	5,195 ± 0,154*	5,229 ± 0,144*	5,206 ± 0,172*	5,521 ± 0,488*
25	0	4,954 ± 0,057	4,930 ± 0,057	4,979 ± 0,057	4,898 ± 0,059	4,854 ± 0,189	4,944 ± 0,066
	100	4,987 ± 0,123	4,962 ± 0,122	5,012 ± 0,123	5,011 ± 0,116	4,805 ± 0,108	4,955 ± 0,586
	200	5,031 ± 0,101*	5,006 ± 0,101*	5,056 ± 0,102*	5,055 ± 0,098*	5,078 ± 0,168*	5,642 ± 0,692*
	500	5,029 ± 0,078*	5,004 ± 0,116*	5,054 ± 0,117*	5,053 ± 0,116*	4,926 ± 0,281*	5,755 ± 0,456*
	1000	5,152 ± 0,141*	5,318 ± 0,216*	5,406 ± 0,187*	5,370 ± 0,184*	5,410 ± 0,147*	5,777 ± 0,582*
10	0	5,049 ± 0,058*	4,967 ± 0,060	4,991 ± 0,118	5,013 ± 0,134*	4,922 ± 0,271*	5,014 ± 0,067*
	100	5,082 ± 0,125*	5,082 ± 0,118*	4,873 ± 0,109	5,082 ± 0,118*	4,873 ± 0,155*	5,025 ± 0,594*
	200	5,127 ± 0,103*	5,126 ± 0,099*	5,150 ± 0,171*	5,126 ± 0,099*	5,150 ± 0,242*	5,722 ± 0,701*
	500	5,369 ± 0,124*	5,368 ± 0,123*	5,471 ± 0,313*	5,612 ± 0,129*	5,471 ± 0,443*	6,392 ± 0,506*
	1000	5,706 ± 0,231*	5,704 ± 0,196*	6,009 ± 0,163*	6,223 ± 0,213*	7,270 ± 0,242*	7,692 ± 0,674*
	F	31,961	36,382	38,758	52,958	34,776	9,248
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.9. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije

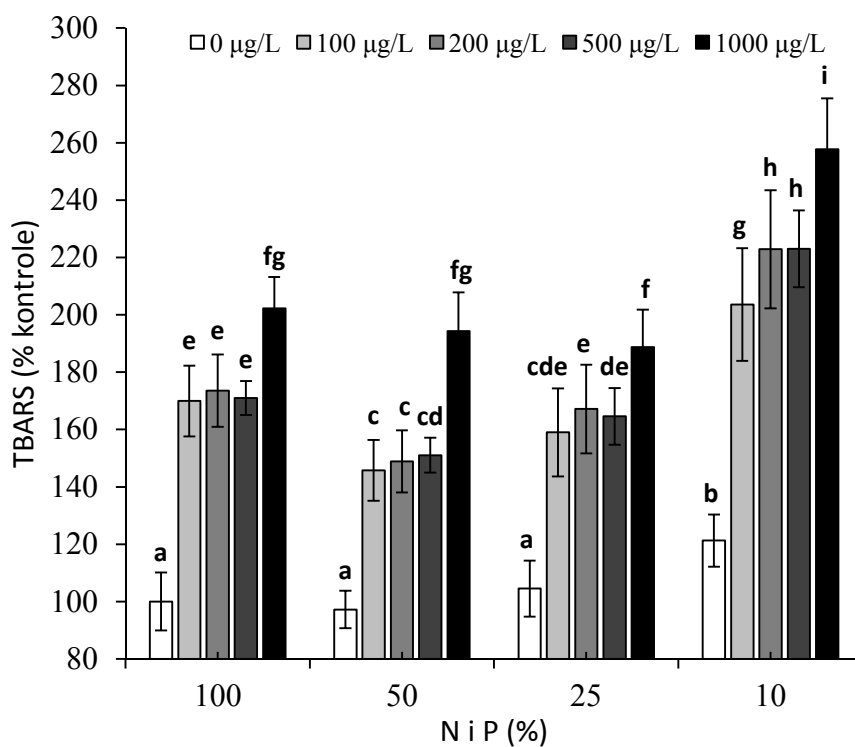
Značajno povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u biljkama koje su tretirane sa 100 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini zabilježena je nakon 12 h kada je vrijednost bila veća za 13% od kontrole (Slika 46). Najveća vrijednost, zabilježena u tretmanu s ovom koncentracijom Ag nakon 48 h, iznosila je $3,968 \pm 0,289$ nmol/g sv. tv. što je 70%-tno povećanje u usporedbi s kontrolom. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 200 $\mu\text{g/L}$ uzrokovao je značajno povećanje koncentracije TBARS-a nakon 8 h te je koncentracija rasla do kraja pokusa. Nakon 48 h koncentracija TBARS-a ($4,053 \pm 0,295$ nmol/g sv. tv.) bila je 73% veća od kontrole (Slika 46). Kada su biljke *L. gibba* tretirane s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag, značajno povećanje koncentracije TBARS-a zabilježeno je već 2 h od početka izlaganja. Najveće vrijednosti zabilježene 48 h od početka pokusa iznosile su $3,993 \pm 0,137$ nmol/g sv. tv. pri 500 $\mu\text{g/L}$ Ag i $4,723 \pm 0,255$ nmol/g sv. tv. pri 1000 $\mu\text{g/L}$ Ag (Slika 46).



Slika 46. Koncentracija produkta lipidne peroksidacije (TBARS) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$) u potpunoj hranjivoj otopini. Podaci su prikazani kao postotak kontrole (vrijednosti netretiranih biljaka) \pm SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (ANOVA, Tukey HSD test, $P < 0,05$).

Značajno povećanje koncentracije TBARS-a u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P utvrđeno je nakon 8 h tretmana s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag (*Tablica 21*). Nakon 24 h izmjerene vrijednosti koncentracije produkata lipidne peroksidacije bile su 11% (200 µg/L), 15% (500 µg/L) i 17% (1000 µg/L) veće od kontrole. Nakon 48 h tretmana koncentracije TBARS-a pri nižim koncentracijama ionskog koloidnog Ag bile su 46% i 49% veće od kontrole. Pri tretmanu s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag koncentracija TBARS-a iznosila je $3,527 \pm 0,141$ nmol/g sv. tv. (500 µg/L) i $4,538 \pm 0,314$ nmol/g sv. tv. (1000 µg/L) što je 51% i 94% veća vrijednost u odnosu na kontrolu. Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracije 200, 500 i 1000 µg/L uzrokovao je značajno povećanje koncentracije TBARS-a u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 25% koncentracije N i P tijekom cijelog pokusa dok je pri 100 µg/L značajno povećanje zabilježeno nakon 8 h (*Tablica 21*). S povećanjem vremena trajanja pokusa zabilježeno je progresivno povećanje koncentracije H₂O₂ u stanicama *L. gibba* te su najveće vrijednosti izmjerene nakon 48 h. Nakon 48 h koncentracija TBARS-a bila je 59% veća pri tretmanu sa 100 µg/L, 67% veća pri tretmanu s 200 µg/L, 65% veća pri tretmanu s 500 µg/L te 89% veća pri tretmanu s 1000 µg/L u usporedbi s kontrolom ($P < 0,05$). U biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag, koncentracija TBARS bila je značajno veća u usporedbi s kontrolom (*Tablica 21*). Tretman svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag uzrokovao je značajno povećanje koncentracije TBARS-a već nakon 2 h tretmana ($P < 0,05$) pa je tako pri tretmanu s 1000 µg/L Ag zabilježeno povećanje iznosilo 52% u usporedbi s kontrolom. Nakon 48 h tretmana koncentracije produkata lipidne peroksidacije bile su 103% veća pri tretmanu sa 100 µg/L, 123% veća pri tretmanu s 200 i 500 µg/L te 158% veća pri tretmanu s 1000 µg/L u usporedbi s kontrolom ($P < 0,05$).

Tretman ionskim koloidnim Ag koncentracija 100, 200 i 500 µg/L uzrokovao je statistički značajno manju akumulaciju produkata peroksidacije lipida u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije ionskog koloidnog Ag na biljke uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini (*Slika 47*). S druge strane, tretman istim koncentracijama ionskog koloidnog Ag uzrokovao je veću akumulaciju produkata lipidne peroksidacije u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P. Prema rezultatima analize varijance i LSD testa pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag nisu zabilježene značajne razlike između biljaka koje su uzgajane pri 100, 50 i 25% koncentracije N i P u hranjivoj otopini, dok je pri 10% N i P koncentracija produkata peroksidacije lipida bila najveća ($6,018 \pm 0,416$ nmol/g sv. tv.) (*Slika 47*).



Slika 47. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u stanicama *L. gibba* nakon 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%). Podaci su prikazani kao postotak kontrole ± SD. Rezultati označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (ANOVA, LSD test, $P < 0,05$).

Tablica 21. Koncentracija produkata lipidne peroksidacije (TBARS) u *L. gibba* nakon 2, 4, 8, 12, 24 i 48 h od početka tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman/Vrijeme		TBARS (nmol/g sv.tv.)					
N i P (%)	Ag (µg/L)	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
100	0	2,265 ± 0,077	2,243 ± 0,076	2,263 ± 0,076	2,284 ± 0,155	2,299 ± 0,099	2,335 ± 0,236
	100	2,243 ± 0,150	2,221 ± 0,148	2,409 ± 0,070	2,597 ± 0,151*	2,473 ± 0,144*	3,968 ± 0,289*
	200	2,411 ± 0,202	2,387 ± 0,200	2,481 ± 0,084*	2,576 ± 0,132*	2,453 ± 0,125*	4,053 ± 0,295*
	500	2,472 ± 0,221*	2,569 ± 0,277*	2,580 ± 0,146*	2,591 ± 0,088*	2,468 ± 0,084*	3,993 ± 0,137*
	1000	2,581 ± 0,230*	2,556 ± 0,228*	2,597 ± 0,180*	2,639 ± 0,144*	2,513 ± 0,138*	4,723 ± 0,255*
50	0	2,267 ± 0,035	2,244 ± 0,035	2,265 ± 0,076	2,286 ± 0,171	2,301 ± 0,111	2,270 ± 0,153
	100	2,275 ± 0,159	2,279 ± 0,126	2,441 ± 0,074	2,529 ± 0,180	2,474 ± 0,121	3,405 ± 0,248*
	200	2,344 ± 0,188	2,352 ± 0,169	2,451 ± 0,178	2,551 ± 0,274*	2,562 ± 0,061*	3,477 ± 0,253*
	500	2,369 ± 0,116	2,464 ± 0,229	2,479 ± 0,161*	2,495 ± 0,202*	2,644 ± 0,136*	3,527 ± 0,141*
	1000	2,476 ± 0,162	2,466 ± 0,140	2,507 ± 0,092*	2,549 ± 0,073*	2,699 ± 0,283*	4,538 ± 0,314*
25	0	2,433 ± 0,082	2,409 ± 0,081	2,432 ± 0,122	2,456 ± 0,211	2,470 ± 0,117	2,440 ± 0,229
	100	2,477 ± 0,167	2,483 ± 0,170	2,660 ± 0,159*	2,753 ± 0,181*	2,697 ± 0,196*	3,713 ± 0,358*
	200	2,554 ± 0,200*	2,561 ± 0,188*	2,746 ± 0,177*	2,858 ± 0,307*	2,875 ± 0,171*	3,903 ± 0,360*
	500	2,584 ± 0,220*	2,691 ± 0,339*	2,705 ± 0,262*	2,719 ± 0,264*	2,879 ± 0,161*	3,844 ± 0,231*
	1000	2,697 ± 0,200*	2,727 ± 0,155*	2,773 ± 0,102*	2,818 ± 0,081*	3,114 ± 0,326*	4,407 ± 0,304*
10	0	2,842 ± 0,070*	2,872 ± 0,202*	2,873 ± 0,181*	2,835 ± 0,211*	2,865 ± 0,132*	2,832 ± 0,212*
	100	3,171 ± 0,214*	3,178 ± 0,218*	3,405 ± 0,204*	3,523 ± 0,323*	3,452 ± 0,251*	4,753 ± 0,459*
	200	3,269 ± 0,256*	3,415 ± 0,251*	3,662 ± 0,237*	3,811 ± 0,409*	3,834 ± 0,228*	5,204 ± 0,481*
	500	3,308 ± 0,281*	3,645 ± 0,460*	3,665 ± 0,355*	3,684 ± 0,357*	3,900 ± 0,218*	5,207 ± 0,313*
	1000	3,452 ± 0,256*	3,723 ± 0,212*	3,785 ± 0,140*	3,848 ± 0,111*	4,252 ± 0,446*	6,018 ± 0,416*
	F	24,974	27,353	47,420	30,800	48,446	66,854
	P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

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

3.10. Mineralni sastav tkiva vodene leće

3.10.1. Koncentracija srebra u tkivu *L. gibba*

Nakon 48 h tretmana s ionskim koloidnim Ag u tkivu vodne leće došlo je do akumulacije srebra (Ag) (*Tablica 22*). Pri tretmanu s koncentracijama 100, 200 i 500 µg/L koncentracija akumuliranog Ag bila je u intervalu od 9,57 do 11,07 mg/kg dok pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag dolazi do nakupljanja veće koncentracije Ag u tkivu *L. gibba* (19,5 mg/kg sh. tv.). S povećanjem koncentracije Ag u hranjivoj otopini rasla je i koncentracija Ag u tkivu. Kada su biljke tretirane s Ag pri 50% N i P koncentracija Ag u tkivu bila je u rasponu od 4,79 do 10,64 mg/kg sh. tv. Kada su biljke tretirane s Ag u kombinaciji s koncentracijom N i P smanjenom na 25% vrijednosti potpune hranjive otopine akumulacija Ag bila je od 4,67 do 7,14 mg/kg sh. tv. dok je pri 10% N i P u hranjivoj otopini koncentracija Ag bila u raspon od 5,0 do 8,82 mg/kg sh.tv. (*Tablica 22*).

3.10.2. Koncentracija željeza, magnezija i kalija u tkivu *L. gibba*

Uz akumulaciju Ag u tkivu *L. gibba* zabilježeno je smanjenje koncentracije Mg, K i Fe (*Tablica 22*). Koncentracija Fe bila je značajno smanjena pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag dok je na smanjenje koncentracije Mg u tkivu *L. gibba* značajan utjecaj imao tretman s 200, 500 i 1000 µg/L.

Smanjenjem koncentracije N i P na 50% u odnosu na potpunu hranjivu otopinu zabilježeno je povećanje koncentracije K, Mg i Fe, dok je daljnjim razrjeđenjem koncentracije N i P zabilježeno i smanjenje koncentracije ovih nutrijenata u tkivu *L. gibba*.

U biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag, zabilježeno je smanjenje koncentracije Mg i Fe u odnosu na kontrolu (*Tablica 22*). Biljke koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P imale su značajno manje koncentracije Mg i K pri tretmanu sa svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag i manju koncentraciju Fe pri tretmanu s 200, 500 i 1000 µg/L ionskog koloidnog Ag u usporedbi s kontrolom.

Tablica 22. Koncentracija Ag i elemenata Fe, K i Mg u *L. gibba* nakon 48 h tretmana ionskim koloidnim Ag (100, 200, 500 i 1000 µg/L) u hranjivoj otopini s različitim koncentracijama N i P (100, 50, 25 i 10%).

Tretman		Ag	Fe	Mg	K
N i P (%)	Ag (µg/L)	mg/kg			
100	0		106,3 ± 2,6	3219 ± 148	41091 ± 740
	100	10,08 ± 1,92*	83,85 ± 2,88	2249 ± 1232	34905 ± 8547
	200	9,57 ± 0,68*	90,87 ± 25,9	2152 ± 152*	34454 ± 10378
	500	11,07 ± 1,41*	101,8 ± 21	2291 ± 51*	38416 ± 10731
	1000	19,495 ± 0,37*	48,145 ± 12*	1866 ± 791*	29777 ± 13820
50	0		153,8 ± 11	3411 ± 45*	46675 ± 7113
	100	4,79 ± 1,92*	120,6 ± 12	3444 ± 12*	60893 ± 91,57*
	200	4,96 ± 0,17*	132,1 ± 35	3549 ± 680*	62773 ± 1261*
	500	5,06 ± 0,65*	167,65 ± 53	4427 ± 651*	73672 ± 1447*
	1000	10,69 ± 3,0*	61,84 ± 8,44*	1230 ± 10*	27411 ± 436*
25	0		94,36 ± 6,10	2731 ± 37	23860 ± 1663
	100	4,677 ± 1,42*	105,6 ± 0,56	2883 ± 609	37554 ± 1369
	200	4,731 ± 2,86*	94,5 ± 13,01	2609 ± 545	35474 ± 11082
	500	6,45 ± 0,99*	93,31 ± 17,52	2519 ± 379	35020 ± 11475
	1000	7,145 ± 1,99*	97,69 ± 6,55	2479 ± 192	34515 ± 4702
10	0		126,4 ± 14	1671 ± 122*	31523 ± 257*
	100	5,00 ± 2,38*	88,52 ± 8,57	2514 ± 219*	33361 ± 2928*
	200	6,48 ± 0,84*	81,44 ± 14,45*	2163 ± 241*	37216 ± 252*
	500	6,96 ± 2,81*	93,73 ± 37,43*	2030 ± 82*	32072 ± 509*
	1000	8,82 ± 1,72*	81,355 ± 7,71*	2042 ± 140*	31392 ± 771*

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD. *Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Studentov t- test, P<0,05).

4. Rasprava

4. Rasprava

Akumulacija metala uzrokuje brojne promjene metaboličkih procesa u biljkama od kojih neke mogu direktno doprinijeti povećanju otpornosti na štetno djelovanje metala (Ding i sur., 2007; Prasad i sur., 2001). Srebro je jedan od najtoksičnijih metala za vodene makrofite (Xu i sur., 2010). Prema istraživanjima koje su proveli Naumann i sur. (2007) Ag je u usporedbi s drugim metalima najviše inhibiralo rast vodene leće vrste *Lemna minor*.

U ovom istraživanju koncentracija Ag u tkivu *L. gibba* povećavala se s povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini. Akumulacija Ag zabilježena je i u tkivu *L. gibba* (Oukarroum i sur., 2013) i drugih vodenih makrofita kao što je *Potamogeton crispus* (Xu i sur., 2010) nakon tretmana s AgNO₃. Dodatak Ag i drugih toksičnih metala u hranjivu otopinu sprječavao je unos različitih nutrijenata u biljke (Xu i sur., 2010; Ouzounidou i Constantinidou, 1999). Slični rezultati zabilježeni su i u ovom istraživanju. S povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini zabilježene su smanjenje koncentracije Fe i Mg u tkivu *L. gibba* (Tablica 22). Dakle, tretman ionskim koloidnim Ag narušio je ravnotežu nutrijenata u stanicama *L. gibba*. Toksični metali najčešće u stanice ulaze pomoću membranskog transportnog sustava za mineralne nutrijente te kompeticija za specifične transportere može rezultirati narušenom ravnotežom nutrijenata u stanicama (Sunda i Huntsman, 1998; Fortin i Campbell, 2001). Smanjenje unosa Fe u stanice navodi se kao tipični primjer metalima inducirane promjene staničnog metabolizma (Alcantara i sur., 1994). Xu i suradnici (2010) smatraju da bi smanjenje koncentracije nutrijenata u stanicama moglo biti posljedica poremećaja staničnog metabolizma i smanjene dostupnosti energije (ATP-a) o kojoj direktno ovisi transportni sustav preko membrane. Tretman s Ag smanjuje koncentraciju ATP-a u stanicama *P. crispus* (Xu i sur., 2010) zbog moguće inhibicije enzima uključenih u sintezu ATP-a, kao na primjer ATPaze do čije inhibicije dolazi zbog moguće reakcije Ag sa sulfhidrilnim skupinama enzima (Jeanne i sur., 1993).

U biljkama vrste *L. gibba* koje su ionskim koloidnim Ag tretirane u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P utvrđena je manja akumulacija Ag u tkivu u usporedbi s akumulacijom u potpunoj hranjivoj otopini (Tablica 22). Niže koncentracije P mogu dovesti do redukcije sinteze ATP-a što u konačnici može rezultirati smanjenjem aktivnog transporta metalnih kationa preko stanične membrane (Hermans i sur., 2006). Povećanjem koncentracije ionskog koloidnog Ag u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama N i P nije došlo do proporcionalnog smanjenja koncentracije Fe i Mg u tkivu *L. gibba*. Za razliku od ovog

istraživanja u kojem je najduži tretman bio 48 h, štetno djelovanje srebra i drugih metala na unos različitih nutrijenata u biljke uglavnom je istraživano kroz duži period izlaganja (Ouzounidou i Constantinidou, 1999; Xu i sur., 2010). Dulje izlaganje biljaka ionskom koloidnom Ag moglo bi dati bolji uvid u promjene koncentracija i omjera mikronutrijenata u stanicama *L. gibba*.

Specifični prirast broja biljaka i prirast svježe mase *L. gibba* bili su značajno smanjeni u usporedbi s kontrolom nakon 48 h tretmana ionskim koloidnim Ag koncentracija većih od 100 µg/L u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 13 i 15). Prirast svježe mase vodene leće vrste *L. minor* značajno je smanjen pod utjecajem Cr, Co, Cu, Hg, Ni, Tl i Zn (Naumann i sur., 2007). Inhibicija prirasta broja biljaka *L. gibba* i *L. minor* nakon sedam dana tretmana s AgNO₃ ovisila je o koncentraciji dodanog Ag (Bian i sur., 2013; Gubbins i sur., 2011). U ovom istraživanju najveća inhibicija prirasta broja biljaka (55%) zabilježena je tek pri najvećoj koncentraciji ionskog koloidnog Ag. Prema podacima dostupnim u literaturi, efektivna koncentracija Ag koja uzrokuje 50% inhibiciju prirasta broja biljaka za vrstu *L. gibba* (EC₅₀) u potpunoj hranjivoj otopini iznosi 159 ± 39 µg/L (Bian i sur., 2013). Primijećene razlike u inhibiciji prirasta broja biljaka mogu biti posljedica različitog vremena izlaganja biljaka štetnom djelovanju Ag.

Pad specifičnog prirasta broja i svježe mase biljaka nakon 48 h tretmana ionskim koloidnim Ag najviše testirane koncentracije (1000 µg/L) u hranjivoj otopini s 50% koncentracije N i P bio je manji nego pri istoj koncentraciji Ag u potpunoj hranjivoj otopini (Slike 13 i 15). Budući da smanjenje koncentracije N i P na 50% bez dodatka Ag nije imalo značajan utjecaj na specifični prirast *L. gibba*, dobiveni se rezultat može objasniti toksičnim djelovanjem Ag. Iako su vrijednosti prirasta broja biljaka pri tretmanu s Ag u hranjivim otopinama s 25% i 10% koncentracije N i P bile značajno manje u usporedbi s kontrolom, to smanjenje je rezultat nižih koncentracija nutrijenata, a ne toksičnog djelovanja Ag (Slika 13). S druge strane, smanjenje prirasta svježe mase biljaka posljedica je sinergističkog djelovanja nedostatka nutrijenata i povišenih koncentracija Ag (Slika 15).

Raspad kolonija vrste *L. gibba* pokazatelj je značajnih fizioloških promjena u frondovima (Henke i sur., 2011). Apscizija frondova prije sazrijevanja kod vodenih leća inducirana je djelovanjem metalnih iona kao što su Cu²⁺, Cd²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺, CrO₄²⁻ i SeO₄²⁻ (Li i Xiong, 2004a, b; Severi, 2001). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da tretman ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini uzrokuje preuranjeno otpuštanje frondova kćeri od majčinske biljke te da je taj proces bio završen nakon 8 h pri svim primijenjenim koncentracijama Ag

(Tablica 5). Preuranjena apscizija frondova pri tretmanu ionskim koloidnim Ag u hranjivoj otopini s 50 i 25% koncentracije N i P bila je maksimalna već nakon 4 h tretmana. Ioni Ag uzrokovali su preuranjeni raspad kolonija i kod vrste *L. minor* nakon 7 h od početka tretmana (Topp i sur., 2011). Pojava otpuštanja mladih frondova iz kolonije može spriječiti transport metala iz majčinske biljke u mlađe biljke čime se povećava vjerojatnost preživljenja biljke-kćeri (Li i Xiong, 2004b). Raspad kolonija kao odgovor na tretman teškim metalima ovisi prvenstveno o vrsti samog metala, budući da neki metali, kao što su Cd^{2+} , Hg^{2+} i SeO_3^{2-} , pokazuju veću toksičnost pri nižim, nego pri višim koncentracijama (Henke i sur., 2011).

Značajno smanjenje koncentracije *Chla* i *Chlb* u biljkama koje su u potpunoj hranjivoj otopini tretirane ionskim koloidnim Ag utvrđeno je već nakon 2 h (Slike 18 i 20). Manje koncentracije fotosintetskih pigmenata pod utjecajem Ag utvrđene su i kod drugih vrsta vodenih makrofita (Jiang i sur., 2012; Xu i sur., 2010). Niže koncentracije *Chla* i *Chlb* mogu biti rezultat povećane degradacije ali i smanjene sinteze klorofila (Ding i sur., 2007; Gupta i Chandra, 1998), ultrastrukturnih promjena u kloroplastima te peroksidacije lipida u membranama (Xu i sur., 2010). Smanjenje koncentracije klorofila u tkivu *L. gibba* pri tretmanu ionskim koloidnim Ag može biti posljedica utvrđenih smanjenih koncentracija Fe i Mg, što su pokazali i rezultati drugih istraživanja (Ouzounidou i Constantinidou, 1999; Uruç Parlak i Yilmaz, 2012). Pad koncentracije *Chla* i *Chlb* bio je manji u biljkama koje su ionskim koloidnim Ag tretirane u hranjivim otopinama s 50% i 25% koncentracije N i P. Koncentracija *Chla* i *Chlb* bila je najniža u biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P te je tretman ionskim koloidnim Ag još dodatno smanjio koncentracije ovih pigmenata. Smanjene koncentracije klorofila uvjetuju smanjenje fotosintetske aktivnosti uslijed čega dolazi do inhibicije rasta (Tewari i sur., 2004).

S povećanjem razdoblja izloženosti ionskom koloidnom Ag u stanicama *L. gibba* više se smanjivala koncentracija *Chlb* nego *Chla*, što je rezultiralo značajnim povećanjem omjera *Chla/Chlb* (Slika 22). Ovo povećanje omjera *Chla/Chlb* može se objasniti konverzijom *Chlb* u *Chla* do koje dolazi tijekom procesa degradacije fotosintetskih pigmenata (Fang i sur., 1998). Do značajnog povećanja omjera *Chla/Chlb* došlo je i prilikom tretmana vodenih leća s olovom (Garnczarska i Ratajczak, 2000).

Karotenoidi su antioksidansi topljivi u lipidima koji direktno sudjeluju u zaštiti biljnih stanica od ROS-a u uvjetima stresa uzrokovanim teškim metalima (Hou i sur., 2007). Koncentracija ukupnih karotenoida u stanicama *L. gibba* pri tretmanu s tri najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini bila je već nakon 2 h značajno manja u odnosu na

kontrolu. Nakon 8 h tretmana zabilježeno je progresivno smanjenje koncentracije Car pri svim testiranim koncentracijama ionskog koloidnog Ag (*Slika 36*). Smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida zabilježeno je i kod vrsta *P. crispus* nakon tretmana s AgNO₃ (Xu i sur., 2010); *Elodea nuttallii* nakon tretmana s Fe (Xing i sur., 2010) te *L. minor* nakon tretmana s Cu, Cd i Zn (Hou i sur., 2007; Radić i sur., 2010). Biljke sa smanjenim koncentracijama Car nemaju učinkovit mehanizam disipacije suviška ekscitacijske energije u obliku topline niti gašenja tripletnog stanja klorofila čime nastaje ¹O₂ i drugi oblici ROS-a (Karuppanapandian i sur., 2011). Zbog smanjenih koncentracija karotenoida može doći i do fotooksidacije klorofila (Dankov i sur., 2009). S obzirom da karotenoidi mogu djelovati kao stabilizatori lipidne faze tilakoidnih membrana, u biljnim stanicama koje imaju smanjene koncentracije karotenoida tilakoidne mebrane mogu biti podložnije lipidnoj peroksidaciji (Havaux, 1998). Smanjenje koncentracije ukupnih Car uz smanjenje koncentracije Chla i Chlb u *L. gibba* uzrokovano tretmanom s ionskim koloidnim Ag ukazuje na oštećenje fotosintetskog sustava.

Ionsko koloidno Ag uzrokovalo je smanjenje koncentracije karotenoida i u biljkama koje su uzgajane pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini. Značajno smanjenje koncentracije karotenoida u *L. gibba* utvrđeno je već i pri smanjenim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini na 25% i 10% te je tretman ionskim koloidnim Ag dodatno smanjio koncentraciju Car (*Slika 37*). Smanjenje koncentracije karotenoida u uvjetima niskih dostupnih koncentracija N i P može rezultirati nakupljanjem ROS-a u stanicama, što dovodi do oštećenja pigmenata (Crafts-Brandner, 1992).

Koncentracija ukupnih proteina u organizmu važan je pokazatelj ireverzibilnih i reverzibilnih promjena metabolizma i mijenja se kao odgovor na široki raspon stresnih čimbenika (Piotrowska i sur., 2010; Doganlar i Atmaca, 2011). Nakon 4 h tretmana ionskim koloidnim Ag koncentracija većih od 100 µg/L u potpunoj hranjivoj otopini zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije proteina u stanicama *L. gibba*. Najveće smanjenje koncentracije proteina zabilježeno je u biljkama nakon 48 h tretmana s 1000 µg/L Ag (*Slika 16*). Osim srebra, visoke koncentracije Cu, Cd i Fe uzrokovale su smanjenje koncentracije proteina u tkivu biljaka vrste *L. minor* (Kanoun-Boulé i sur., 2009; Razinger i sur., 2007) i *E. nuttallii* (Xing i sur., 2010). Smanjenje koncentracije proteina može biti posljedica povišene aktivnosti proteaza i drugih kataboličkih enzima aktiviranih različitim metalima (Sinha i sur., 1996). Također, srebro kao i brojni drugi metali, stvara komplekse s aminokiselinama čime mijenja njihovu strukturu te ometa proces sinteze proteina (Emamverdian i sur., 2015).

U biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P, smanjenje koncentracije proteina pod utjecajem ionskog koloidnog Ag bilo je manje izraženo nego u biljkama koje su tretirane u potpunoj hranjivoj otopini (*Slika 17*). Već i samim smanjenjem koncentracije N i P u hranjivoj otopini, utvrđene su značajno veće koncentracije proteina u *L. gibba* u odnosu na biljke u potpunoj hranjivoj otopini. Veće koncentracije proteina pri smanjenim koncentracijama nutrijenata zabilježene su također i u tkivu *P. crispus* (Zhang i sur., 2010). Wang i sur. (2000) pokazali su da u uvjetima smanjene dostupnosti nutrijenata dolazi do povećane ekspresije gena za transportere, enzime i transkripcijske faktore koji imaju važnu ulogu u signalnom putu i odgovoru biljaka na nedostatak nutrijenata.

Nakupljanje ROS-a u stanicama jedna je od glavnih posljedica toksičnog djelovanja teških metala na biljne stanice (Sharma i Dietz, 2009). U stanicama *L. gibba* pri visokim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini dolazi vrlo brzo (unutar 2 h) do nakupljanja H₂O₂, dok najniža koncentracija ionskog koloidnog Ag tijekom cijelog eksperimenta nije uzrokovala značajno povećanje koncentracije H₂O₂ (*Slika 44*). Oukarroum i sur. (2013) dokazali su da u stanicama *L. gibba* dolazi do povećanja koncentracije ROS-a unutar 24 h od početka tretmana s AgNO₃.

Nakon 48 h povećanje koncentracije H₂O₂ pri tretmanu s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag bilo je značajno veće u biljkama u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije Ag u hranjivim otopinama sa 100, 50 i 25% N i P (*Slika 45*). Pri razrjeđenju N i P u hranjivoj otopini na 10% utvrđena je značajno veća koncentracija H₂O₂ i bez dodatka Ag (*Slika 44*). U uvjetima nedostatka nutrijenata u biljnim stanicama dolazi do brze produkcije i akumulacije ROS-a (Shin i Schachtman, 2004; Shin i sur., 2005). Vodikov peroksid pri niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula u stresnim uvjetima (Quan i sur., 2008) u koje se ubraja i stres uslijed niskih koncentracija nutrijenata (Shin i sur., 2005). Povećanje koncentracije H₂O₂ zabilježeno je pri nedostatku makronutrijenata, kao što su N (Shin i Schachtman, 2004; Shin i sur., 2005), P (Malusà i sur., 2002) i K (Kim i sur., 2010; Hernandez i sur., 2012). U uvjetima smanjene dostupnosti nutrijenata, posebno K, kao mogući izvori ROS-a navode se povećane aktivnosti NADPH-oksidade i peroksidaza (Ho i Tsay, 2010; Kim i sur., 2010; Shin i Schachtman, 2004).

Uslijed nemogućnosti stanica da u potpunosti neutraliziraju štetno djelovanje ROS-a dolazi do peroksidacije masnih kiselina. Smatra se da je peroksidacija lipida najštetnija posljedica oksidacijskog stresa, koja ne samo da znatno narušava normalno funkcioniranje stanica, nego i pojačava oksidacijski stres stvaranjem lipidnih radikala (Farmer i Mueller, 2013). Pri tretmanu

s dvije najveće koncentracije ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini u usporedbi s kontrolom već nakon 2 h dolazi do povećanja koncentracije TBARS-a u stanicama *L. gibba*. Pri koncentracijama ionskog koloidnog Ag višim od 100 µg/L akumulacija H₂O₂ praćena je akumulacijom TBARS-a. Akumulacija TBARS-a pri tretmanu sa 100 µg/L ionskog koloidnog Ag može ukazati na toksično djelovanje ostalih ROS-a. Hidroksilni i superoksidni radikali mogu također štetno djelovati na PUFA, što za posljedicu ima akumulaciju hidroperoksida, lipidnih peroksidnih radikala i konjugiranih diena (Smirnoff, 1995). Povećanje koncentracije produkata lipidne peroksidacije u stanicama vodenih leća utvrđeno je i kao posljedica djelovanja Zn i Al (Radić i sur., 2010), Cu (Hou i sur., 2007), Cd (Hou i sur., 2007; Razinger i sur., 2008; Tkalec i sur., 2008).

Koncentracije TBARS-a u biljkama koje su tretirane ionskim koloidnim Ag u hranjivoj otopini s 10% N i P bile su veće u usporedbi s djelovanjem iste koncentracije Ag u ostalim testiranim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini (Slika 47). U biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P i bez dodatka Ag, uz značajan porast koncentracije H₂O₂, utvrđeno je i značajno povećanje koncentracije TBARS-a. Tewari i sur., (2004) utvrdili su da osim pri smanjenoj dostupnosti N i P do peroksidacije lipida uslijed akumulacije ROS-a dolazi i pri nedostatku i smanjenoj dostupnosti K, Ca, Mg i S.

Za uklanjanje ROS-a u biljnim je stanicama razvijen zaštitni sustav koji uključuje brojne antioksidacijske enzime i neenzimske antioksidanse lokalizirane u različitim dijelovima stanice (Mittler, 2002). Superoksid-dismutaza predstavlja prvi enzim u antioksidacijskom odgovoru biljaka. SOD disproporcionira O₂⁻ u H₂O₂ i H₂O što može dovesti do akumulacije H₂O₂ u stanicama (Alscher i sur., 2002), a što pokazuju i rezultati ovog istraživanja. U stanicama *L. gibba* koje su rasle u potpunoj hranjivoj otopini aktivnost SOD bila je značajno povećana pri dužem izlaganju višim koncentracijama ionskog koloidnog Ag uz istovremeno značajno povećanje koncentracije H₂O₂ (r=0,7815; P=0,002) (Slike 34 i 44). Tretman srebrom uzrokovao je povećanje aktivnosti SOD i u tkivu *P. crispus* (Xu i sur., 2010). Povećanje aktivnosti SOD u stanicama vodenih leća utvrđeno je i kao posljedica djelovanja Zn, Al, Ni, Mn i Cd (Radić i sur., 2010; Doganlar i sur., 2012; John i sur., 2007).

Aktivnost SOD u biljkama koje su tretirane s ionskim koloidnim Ag u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P bila je također značajno povišena nakon 48 h tretmana (Slika 35). Povećanje aktivnosti SOD uslijed štetnog djelovanja teških metala može biti posljedica *de novo* sinteze enzima (Cakmak i Horst, 1991; Verma i Dubey, 2003) uslijed indukcije gena za SOD potaknute nakupljanjem O₂⁻ (Fatima i Ahmad, 2005). Aktivnost SOD u biljkama koje su

uzgajane u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P te zatim tretirane najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag bila je značajno manja od aktivnosti u biljkama koje su istom koncentracijom Ag tretirane u hranjivoj otopini s 50% i 25% N i P (Slika 35). Unatoč manjoj aktivnosti SOD, akumulacija H_2O_2 u biljkama pri 10% koncentracije N i P i 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag bila je najveća što može biti posljedica povećane aktivnosti NADPH-oksidade i peroksidaza (Ho i Tsay, 2010; Kim i sur., 2010; Shin i Schachtman, 2004). Romero-Puertas i sur. (2004) utvrdili su da se akumulacija H_2O_2 pri štetnom djelovanju Cd može pripisati upravo povišenoj aktivnosti NADPH-oksidade.

Za održavanje koncentracije $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u fiziološkim granicama u biljnim stanicama važna je ravnoteža između sustava za stvaranje i uklanjanje H_2O_2 (Mittler, 2002). Katalaza je jedan od glavnih enzima koji uklanjaju H_2O_2 u biljnim stanicama (Mittler, 2002). Tretman ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini uzrokovao je povećanje aktivnosti CAT u stanicama *L. gibba* (Slika 28). Aktivnost CAT bila je povećana već i pri kraćem izlaganju ionskom koloidnom Ag, dok je progresivan porast aktivnosti zabilježen pri dužem izlaganju svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag. Aktivnost CAT pri tretmanu s $AgNO_3$ inducirana je i u stanicama *P. crispus* (Xu i sur., 2010). U stanicama vodenih leća, *L. gibba* i *L. minor*, povišene aktivnosti CAT utvrđene su i pri djelovanju Ni, Mn, Cd i Cu (Doganlar i sur., 2012; Yilmaz i Parlak, 2011; Razinger i sur., 2007; 2008).

Tretman ionskim koloidnim Ag pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini nakon 48 h uzrokovao je povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (Slika 29). Aktivnost CAT u biljkama koje su tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag tretmanu u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P bila je značajno manja nego u biljkama koje su istom koncentracijom Ag tretirane pri 100, 50 i 25% N i P. Smanjenje aktivnosti CAT može biti posljedica poremećaja u primanju Fe koje je neophodno za sintezu hem skupine enzima (Siedlecka i Krupa, 1999).

Osim CAT, važnu ulogu u uklanjanju H_2O_2 imaju i peroksidaze. Nakon 4 h tretmana ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini aktivnost GPOX bila je značajno povišena u usporedbi s kontrolom (Slika 26). Nakon kratkotrajnog tretmana s Cu i Cd aktivnost GPOX bila je povišena u tkivu *L. minor* (Razinger i sur., 2007; 2008). Povišena aktivnost GPOX utvrđena je i u tkivu vrste *Pistia stratiotes* tretirane s Cr (Sinha i sur., 2005) te *E. nuttallii* nakon tretmana s Fe (Xing i sur., 2010). Povećane aktivnosti peroksidaza mogu reflektirati promjene u mehaničkim svojstvima staničnih stijenki uslijed sinteze lignina koji može djelovati kao fizička barijera za ulazak teških metala u stanice (Hegedüs i sur., 2001). U ovom istraživanju utvrđena

je značajna pozitivna korelacija između aktivnosti GPOX i koncentracije ukupnih fenolnih spojeva ($r=0,9814$, $P=0,03$).

Aktivnost GPOX pri tretmanu s ionskim koloidnim Ag u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama N i P bila je značajno povećana u odnosu na djelovanje iste koncentracije Ag u potpunoj hranjivoj otopini (*Slika 27*). Aktivnost GPOX u biljkama koje su rasle u hranjivoj otopini s 10% koncentracije N i P te zatim tretirane s 1000 $\mu\text{g/L}$ ionskog koloidnog Ag, slično kao i aktivnost CAT, bila je najmanja u usporedbi s aktivnosti pri istom tretmanu i ostalim razrjeđenjima N i P.

Zbog svoje specifične strukture fenolni spojevi mogu djelovati kao antioksidansi direktnim uklanjanjem ROS, inhibicijom lipoksigenaze i keliranjem teških metala (Tahara, 2007). Značajno povećanje koncentracije fenolnih spojeva, može pridonijeti antioksidacijskom odgovoru stanica pri tretmanu s metalima (Michalak, 2006). Koncentracija PHE u stanicama *L. gibba* tretiranim ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini bila je značajno povišena već nakon 2 h pri dvije veće koncentracije Ag, dok nakon 4 h sve koncentracije Ag uzrokuju značajno povećanje koncentracije PHE (*Slika 34*). Do promjena u koncentraciji fenolnih spojeva u stanicama *L. gibba* dolazi pri tretmanu s Hg, Cd i Cr nakon 24 h (Varga i sur., 2013). Povišene koncentracije PHE utvrđene su i kod vrste *Myriophyllum triphyllum* nakon tretmana s Cd (Sivaci i sur., 2007) te kod *Salvinia auriculata* nakon tretmana s Cu (Bizzo i sur., 2014).

U biljkama uzgajanim u hranjivoj otopini s 25% i 10% koncentracije N i P bez dodatka ionskog koloidnog Ag utvrđena je značajno veća koncentracija ukupnih topljivih fenola u usporedbi s kontrolom. Brojne studije također su pokazale povećanu akumulaciju polifenolnih spojeva u biljkama koje rastu u okolišu sa smanjenom dostupnosti nutrijenata (Lillo i sur., 2008; Urbanczyk-Wochniak, 2005; Le Bot i sur., 2009; Løvdal i sur., 2010; Nguyen i Niemeyer, 2008). Ograničena dostupnost nutrijenata povećava produkciju ugljikom bogatih sekundarnih metabolita (Herms i Mattson, 1992). Jedno od mogućih objašnjenja povećane sinteze flavonoida uslijed nedostatka N je povećanje aktivnosti enzima fenilalanin-amonij-lijaze (PAL) koji katalizira deaminaciju fenilalanina pri čemu nastaje cimetna kiselina i amino-skupina. Cimetna kiselina se usmjerava u biosintezu flavonoida, a amino-skupina ulazi u metabolizam aminokiselina (Stewart i sur., 2001). Akumulacija PHE pri tretmanu s najvećom koncentracijom ionskog koloidnog Ag bila je najveća u biljkama koje su tretirane u potpunoj hranjivoj otopini (*Slika 39*).

Osim navedenih antioksidacijskih enzima, glutation i enzimi uključeni u metabolizam glutationa tvore još jednu važnu liniju obrane biljnih stanica od oksidacijskog stresa (Xing i sur., 2010). Glutation-S-transferaza (GST) ima iznimno važnu ulogu u obrani organizma od brojnih hidrofobnih i elektrofilnih molekula vežući ih u konjugate s glutationom (Maher, 2005). Aktivnost GST u stanicama *L. gibba* koje su rasle na potpunoj hranjivoj otopini bila je značajno inhibirana nakon 8 h pri svim tretmanima ionskog koloidnog Ag. Povišena akumulacija hidroperoksida i drugih ROS-a uslijed akumulacije metala može rezultirati inhibicijom aktivnosti GST (Nagalakshmi i Prasad, 2001). Nakon 48 h aktivnost GST u biljkama tretiranim ionskim koloidnim Ag u hranjivoj otopini sa smanjenim koncentracijama N i P pokazala je dvofazni odgovor s najvećim aktivnostima izmjerenim pri koncentraciji Ag od 100 do 500 µg/L dok je pri najvećoj koncentraciji aktivnost bila niža (Slika 33). Neke izoforme GST enzima pokazuju aktivnost glutation-peroksidaze što ukazuje na njihovu ulogu u održavanju integriteta stanične membrane i sprječavanju akumulacije štetnih produkata reakcije peroksidacije lipida (Marrs, 1996). Peroksidaznom aktivnosti mogu sudjelovati u zaštiti stanica od ROS-a akumuliranih u uvjetima oksidacijskog stresa (Scalla i Roulet, 2002).

Povećanje aktivnosti GR povezano je s uobičajenim odgovorom biljka na stres uzrokovan metalima (Anjum i sur., 2012). Povišena aktivnost GR održava glutation i askorbinsku kiselinu u reduciranom obliku koji mogu doprinijeti zaštiti stanice direktnim vezanjem s metalima ili sintezom fitokelatina uz pomoć fitokelatin-sintaze koja koristi GSH kao prekursor (Anjum i sur., 2012). Srebro je, odmah iza Cd, najučinkovitiji aktivator fitokelatin-sintaze (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Međutim, u ovom istraživanju aktivnost GR bila je značajno smanjena već nakon 2 h tretmana s višim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini i pri svim razrjeđenjima N i P. Smanjenje aktivnosti GR zabilježeno je i u tkivu *L. minor* nakon tretmana s Cu (Teisseire i Guy, 2000) te *Hydrilla verticillata* nakon tretmana sa Zn (Wang i sur., 2009) i Cu (Srivastava i sur., 2006). Mogući mehanizam inhibicije aktivnosti GR srebrom može se objasniti vezanjem metala za tiolne skupine enzima (Creissen i Mullineaux, 1995; Ravindran i sur., 2012). U stanicama *L. gibba* uzgajanim pri smanjenim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini bez dodatka ionskog koloidnog Ag utvrđena je značajno veća aktivnost GR u odnosu na biljke uzgajane u potpunoj hranjivoj otopini. Tewari i sur. (2007) utvrdili su da do porasta aktivnosti GR u biljkama dolazi u uvjetima nedostatka N i P, uz značajno veći utjecaj N.

Aktivnost APX u stanicama *L. gibba* u potpunoj hranjivoj otopini značajno je povećana nakon 4 h pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag i raste tijekom cijelog perioda izlaganja

(Slika 24) dok je u biljkama koje su rasle pri sniženim koncentracijama N i P u hranjivoj otopini aktivnost APX u biljkama bila značajno povišena već nakon 2 h tretmana (Tablica 10). Povišene aktivnosti APX u biljkama utvrđene su nakon tretmana s Cd (Razinger i sur., 2008; Tkalec i sur., 2008), Cr (Dhir i sur., 2009), Zn i Al (Radić i sur., 2010).

Povećanje aktivnosti APX u ovom istraživanju podudara se s povećanjem koncentracije H₂O₂, glavne signalne molekule u indukciji aktivnosti ovog enzima (Prasad i sur., 1994; Karpinski i sur., 1999). Međutim, u biljkama koje su uzgajane u hranjivoj otopini s 10% N i P te zatim tretirane s 1000 µg/L, aktivnosti APX nakon 48 h nije se razlikovala od kontrole. Neke izoforme APX su vrlo nestabilne u uvjetima nedostatka AA kao elektron donora pa dolazi do gubitka njihove aktivnosti sa smanjenjem koncentracije askorbinske kiseline u stanicama (Shigeoka i sur., 2002).

Aktivnost APX bila je značajno povišena pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini bez dodatka ionskog koloidnog Ag (Slika 25). Povišene aktivnosti GR i APX mogu ukazivati na efikasnu regeneraciju AA putem askorbat-glutationskog ciklusa u uvjetima smanjene dostupnosti nutrijenata. U ovom istraživanju utvrđena je značajno veća koncentracija AA u stanicama *L. gibba* pri svim razrjeđenjima N i P u hranjivoj otopini u usporedbi s biljkama koje su rasle na potpunoj hranjivoj otopini. U uvjetima smanjene dostupnosti i N i P utvrđeno je značajno povećanje koncentracije AA u tkivu vrste *Arabidopsis thaliana*, iako je povećanje pri nedostatku P bilo manje (Kandlbinder i sur., 2004). Osim regeneracije, povećane koncentracije AA utvrđene pri smanjenim koncentracijama N i P mogu biti rezultat i *de novo* sinteze kao odgovor na oksidacijski stres (Kandlbinder i sur., 2004). Askorbinska kiselina može sudjelovati u uklanjanju ROS-a direktno kao elektron donor ili kao supstrat u enzimskoj razgradnji ROS-a (Smirnoff, 2005). U stanicama *L. gibba* je koncentracija AA bila značajno smanjena već nakon 2 h pri svim koncentracijama ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini (Slika 40). S obzirom da je smanjenje koncentracije AA praćeno značajnim povećanjem aktivnosti APX, možemo pretpostaviti da je AA korištena kao elektron donor za APX-om kontroliranu razgradnju H₂O₂. To je potvrđeno i značajnom negativnom korelacijom između aktivnosti APX i koncentracije AA ($r=-0,844$, $P<0,01$). Sudjelujući u enzimskoj razgradnji H₂O₂, AA se oksidira do monodehidroaskorbata i dehidroaskorbata koji je vrlo nestabilan i u fiziološkim uvjetima se razgrađuje u nekoliko minuta (Szarka i sur., 2012). Također, smanjenje koncentracije AA može biti posljedica inhibicije lanca prijenosa elektrona u mitohondrijima jer je put biosinteze AA povezan s mitohondrijskim enzimima L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenazom i citokrom c oksidoreduktaza (kompleks I) (Millar i sur., 2003; Smirnoff i

Wheeler 2000; Wang i sur., 2004). S druge strane, regeneracija AA koristeći GSH kao elektron donor može biti onemogućena zbog smanjenih koncentracije GSH (Semane i sur., 2007), odnosno uslijed inhibicije aktivnosti GR pri tretmanu ionskim koloidnim Ag.

S obzirom da je stanični antioksidacijski sustav razgranata mreža međusobno isprepletenih puteva, mjera ukupne antioksidacijske aktivnosti može dati bolji uvid u fiziološko stanje organizma u usporedbi s mjerenjem individualnih komponenti antioksidacijskog sustava (Razinger i sur., 2008). Ukupna antioksidacijska aktivnost u stanicama *L. gibba* nakon 4 h tretmana ionskim koloidnim Ag u potpunoj hranjivoj otopini bila je značajno veća od kontrole. Pri kraćem izlaganju biljaka ionskom koloidnom Ag utvrđen je veći porast vrijednost UAA, dok je pri dužem izlaganju taj porast bio manji. U kratkotrajnim tretmanima ionskim koloidnim Ag vrijednost UAA u stanicama *L. gibba* bila je značajno pozitivno korelirana s koncentracijom PHE ($r=0,909$, $P<0,01$).

U biljkama koje su s ionskim koloidnim Ag koncentracije 200, 500 i 1000 $\mu\text{g/L}$ tretirane u hranjivoj otopini s 50% i 25% koncentracije N i P vrijednosti UAA bile su značajno veće od vrijednosti pri tretmanu istom koncentracijom ionskog koloidnog Ag u potpunoj hranjivoj otopini i otopini s 10% N i P. Ukupna antioksidacijska aktivnost bila je značajno pozitivno korelirana s koncentracijom ukupnih topljivih fenola u biljkama koje su tretirane u hranjivoj otopini s 50% ($r=0,969$, $P=0,007$) i 25% ($r=0,955$, $P=0,01$) koncentracije N i P. U biljkama koje su ionskim koloidnim Ag tretirane pri 10% koncentracije N i P nije utvrđena značajna promjena UAA. Brojne studije utvrdile su pozitivnu korelaciju koncentracije fenolnih spojeva u biljkama i ukupne antioksidacijske aktivnosti (Sagar i Singh, 2011; Liu i sur., 2009).

Budući da zbog široke upotrebe proizvoda koji sadrže nanočestice srebra dolazi do njegove akumulacije u okolišu, neophodno je razumjevanje toksičnog djelovanja srebra na biljke. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je ionsko koloidno srebro toksično za vodene leće pri čemu toksičan učinak srebra ovisi o koncentracijama N i P koje su dostupne biljkama. Stoga se specifične okolišne koncentracije makronutrijenata trebaju uzimati u obzir prilikom procjene akumulacije i štetnog utjecaja srebra na biljke u vodenim ekosustavima. Ovaj rad pomoći će u daljnjim istraživanjima štetnog djelovanja metala na biljke u uvjetima različitih koncentracija dostupnih nutrijenata pri čemu *L. gibba* može poslužiti kao eksperimentalni model.

5. Zaključci

5. Zaključci

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

- U potpunoj hranjivoj otopini pri tretmanu ionskim koloidnim srebrom:
 - inhibiran je prirast broja biljaka vrste *L. gibba* i svježe mase; inducirano je preuranjeno otpuštanje mladih biljaka iz kolonije; i narušena je ravnoteža nutrijenata smanjenjem koncentracije magnezija i željeza u stanicama.
 - aktivnosti antioksidacijskih enzima bile su povećane, međutim antioksidacijski odgovor vrste *L. gibba* nije bio učinkovit u sprječavanju oksidacijskih oštećenja.
 - došlo je do pojave oksidacijskog stresa u stanicama *L. gibba* koji se očitovao značajnom akumulacijom vodikovog peroksida i produkata peroksidacije lipida ovisno o trajanju izlaganja i koncentraciji srebra.
- U hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora:
 - na 50% i 25% nije došlo do značajnih promjena pokazatelja oksidacijskog stresa u stanicama *L. gibba*.
 - na 10% došlo je do pojave oksidacijskog stresa u stanicama *L. gibba* koji se očitovao akumulacijom vodikovog peroksida i produkata lipidne peroksidacije te značajnim smanjenjem koncentracije fotosintetskih pigmenata.
- Pri tretmanu ionskim koloidnim srebrom u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora:
 - biljke *L. gibba* akumulirale su manje koncentracije srebra.
 - na 50% došlo je do smanjenja prirasta broja biljaka i svježe mase što je posljedica toksičnog djelovanjem srebra.
 - na 25% i 10% došlo je do smanjenja prirasta broja biljaka što je rezultat smanjenih koncentracija nutrijenata, dok je smanjenje prirasta svježe mase biljaka posljedica sinergističkog djelovanja nedostatka nutrijenata i povišenih koncentracija srebra.

- aktivnosti antioksidacijskih enzima bile su povećane i došlo je do akumulacije fenola, no antioksidacijski odgovor vrste *L. gibba* nije bio učinkovit budući da je došlo do akumulacije vodikovog peroksida i produkata peroksidacije lipida.
- na 10% došlo je do pojave najintenzivnijeg oksidacijskog stresa koji je posljedica sinergističkog djelovanja smanjenih koncentracija nutrijenata i dodatka srebra.
- Vrsta *Lemna gibba* može poslužiti kao eksperimentalni model za proučavanje štetnog djelovanja metala u uvjetima različitih koncentracije nutrijenata te uloge nutrijenata u odgovoru biljaka na stres izazvan metalima.

6. Literatura

6. Literatura

Adams NWH, Kramer JR (1998) Reactivity of Ag⁺ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide. *Environ Toxicol Chem* 17: 625-629

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

Alameda D, Anten NPR, Villar R (2012) Soil compaction effects on growth and root traits of tobacco depend on light, water regime and mechanical stress. *Soil Till Res* 120: 121–129

Alcantara E, Romera FJ, Canete M (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe deficient cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *J Exp Bot* 45: 1893–1898.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331–1341

Anandacoomaraswamy A, DeCosta WAJM, Tennakoon, PLK, VanDerWerf A (2002) The physiological basis of increased biomass partitioning to roots upon nitrogen deprivation in young clonal tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz). *Plant Soil* 238: 1-9

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M, Prasad MNV (2012) Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids-A review. *Environ Exp Bot* 75: 307-324

Anuradha M, Narayanan A (1991) Promotion of root elongation by phosphorus deficiency. *Plant Soil* 136: 273-275

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399

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

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

Asada K (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1419–1431

Assuero SG, Mollier A, Pellerin S (2004) The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Cell Environ* 27: 887-895

Atkinson NJ, Lilley CJ, Urwin PE (2013) Identification of genes involved in the response of Arabidopsis to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 162: 2028–2041

Atkinson NJ, Urwin PE (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* 63: 3523–3543

Bafana A, Dutt S, Kumar A, Kumar S, Ahuja PS (2011) The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *J Mol Catal B-Enzym* 68:129-138

Bian J, Berninger JP, Fulton BA, Brooks BW (2013) Nutrient stoichiometry and concentrations influence silver toxicity in the aquatic macrophyte *Lemna gibba*. *Sci Total Environ* 449: 229-236

Bielski BH, Arudi RI, Sutherland MW (1983) A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 258: 4759-4761

Bizzo ALT, Intorne AC, Gomes AH, Suzuki MS, dos Santos Esteves B (2014) Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl.. *Acta Limnol Bras* 26: 268-277

Borisova (Mubarakshina) MM, Kozuleva MA, Rudenko NN, Naydov IA, Klenina IB, Ivanov BN (2012) Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *BBA-Bioenergetics* 1817: 1314-1321

Boxall A, Chaudhry Q, Sinclair C, Jones A, Jefferson B, Watts C (2007) Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles. CSL, York, UK

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

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmit Wissen Tech* 28: 25-30

Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant J* 45: 113-122

Britto DT, Krozucker HJ (2006) Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark to low-affinity nutrient transport. *Trends Plant Sci* 11: 529-534

Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Planta* 83: 463-468

Caldelas C, Iglesia-Turiño, Araus JL, Bort J, Febrero (2009) Physiological responses of *Eichhornia crassipes* [Mart.] Solms to the combined exposure to excess nutrients and Hg. *Braz J Plant Physiol* 21: 1-12

Campbell PG, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133: 189-206

Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol* 35(4): 1011-1019

Chapin FS, Bielecki RL (1982) Mild phosphorus stress in barley and a related low-phosphorus-adapted barley grass: Phosphorus fractions and phosphate adsorption in relation to growth. *Physiol Plantarum* 54: 309-317

Chudobova D, Dobes J, Nejdil L, Maskova D, Rodrigo MAM, Neddecky B-R, Krystofova O, Kynicky J, Konecna M, Pohanka M, Hubalek J, Zehnalek J, Klejdus B, Kizek R, Adam V (2013) Oxidative stress in *Staphylococcus aureus* treated with silver(I) ions revealed by spectrometric and voltammetric assays. *Int J Electrochem Sci* 8: 4422 - 4440

Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182

Colombo ML (2010) An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol- Perspectives. *Molecules* 15: 2103-2113

Crafts-Brandner SJ (1992) Phosphorus nutrition influence on leaf senescence in soybean. *Plant Physiol* 98: 1128-1132

Creissen GP, Mullineaux PM (1995) Cloning and characterization of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta* 197: 422-425

Creissen CP, Edwards EA, Mullineaux PM (1994) Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. U: Foyer CH, Mullineaux PM (ur.) Cause of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, str. 344-364. CRC Press, Boca Raton

Cuypers A, Smeets K, Ruytinx J, Opdenakker K, Keunen E, Remans T, Horemans N, Vanhoudt N, Van Sanden S, Van Belleghem F, Yvese G, Jana C, Jaco V (2011) The cellular redox state as a

modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J Plant Physiol* 168: 309–316

Dankov K, Busheva M, Stefanov D, Apostolova EL (2009) Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of photosynthetic apparatus. *J Photochem Photobiol B Biol* 96: 49-56

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

del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255-1272

del Rio LA, Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Pastori GM, Bueno P, Lopez-Huertas E (1996) Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem Soc Trans* 24: 434-438

Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* 109: 212-228

Dhir B, Sharmila P, Saradhi PP, Nasim SA (2009) Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 1790-1797

Ding B, Shi G, Xu Y, Hu J, Xu Q (2007) Physiological responses of *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb leaves to cadmium stress. *Environ Pollut* 147: 800-803

Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2170-2175

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles of glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71(4): 338-350

Doerner P (2008) Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic P_i homeostasis. *Curr Opin Plant Biol* 11: 536-540

Doganlar ZB, Atmaca M (2011) Influence of Airborne Pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water Air Soil Pollut* 214: 509-523

Dolphin D, Avramovic O, Poulson R (1989) Glutathion: Chemical, biochemical and metabolic aspect. New York, USA: John Wiley & Sons Inc.

Dong B, Ryan PR, Rengel Z, Delhaize E (1999) Phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*: dependence of uptake on the expression of transporter genes and internal phosphate concentrations. *Plant Cell Environ* 22: 1455-1461

Emamverdian A, Ding Y, Mokhberdoran F, Xie Y (2015) Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J* 2015: 1-18

Fang Z, Bouwkamp J, Solomos T (1998) Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 49: 503-510

Farmer EF, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64: 429-450

Fatima RA, Ahmad M (2005) Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci Total Environ* 346: 256-273

- Fisher NS, Bohe M, Teyssie JL (1984) Accumulation and toxicity of Cd, Zn, Ag, and Hg in 4 marine phytoplankters. *Mar Ecol Prog Ser* 18: 201-213
- Forde BG (2002a) Local and long-range signaling pathways regulating plant response to nitrate. *Annu Rev Plant Biol* 53: 203-224
- Forde BG (2002b) Nitrate transporters in plants, structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 219-235
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422: 442-446
- Fortin C, Campbell PGC (2001) Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. *Environ Sci Technol* 35: 2214-2218
- Foyer CH, Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal* 11(4): 861-905
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plantarum* 119: 355-364
- Fredeen AL, Rao IM, Terry N (1989) Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant Physiol* 89: 225-230
- Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16: 2176-2191
- Frova C (2003) Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol Engg* 23: 149-169
- Garczarska M, Ratajczak L (2000) Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions: Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes. *Acta Physiol Plantarum* 22(4): 423-427
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul* 37: 263-285
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher-plants. *Plant Physiol* 59: 309-314
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930
- Göthberg A, Greger M, Holm K, Bengtsson B (2004) Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium, and lead in water spinach. *J Environ Qual* 33: 1247-1255
- Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ Pollut* 159: 1551-1559
- Gupta M, Chandra P (1998) Bioaccumulation and toxicity of mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. *Environ Pollut* 103: 327-332
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathion S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139
- Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci* 3: 147-151
- Heber U, Viil J, Neimanis S, Mimura T, Diets K-J (1989) Photoinhibitory damage to chloroplasts under phosphate deficiency and alleviation of deficiency and damage of photorespiratory reactions. *Z Naturforsch* 44c: 524-536

- Hegedüs A, Erdei S, Horváth G (2001) Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci* 160: 1085-1093
- Heldt HW, Flügge U-I, Borchert S (1991) Diversity of specificity and function of phosphate translocators in various plastids. *Plant Physiol* 95: 341-343
- Heldt HW, Chon CJ, Maronde D, Herold A, Stankovic ZS, Walker DA, Kraminer A, Kirk MR, Heber U (1977) Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol* 49: 1146-1155
- Henke R, Eberius M, Appenroth K-J (2011) Induction of frond abscission by metals and other toxic compounds in *Lemna minor*. *Aquatic Toxicol* 101: 261-265
- Henzler T, Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot* 51: 2053-2066
- Hermans C, Hammond JP, White PJ, Verbruggen N (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends Plant Sci* 11: 610-617
- Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67: 283-335
- Hernandez M, Fernandez-Garciaa N, Garcia-Garmaa J, Rubio-Asensioa JS, Rubio F, Olmos E (2012) Potassium starvation induces oxidative stress in *Solanum lycopersicum* L. roots. *J Plant Physiol* 169: 1366-1374
- Hillman WS (1961) The *Lemnaceae*, or duckweeds. *Bot Rev* 27: 221-287
- Ho CH, Tsay YF (2010) Nitrate, ammonium, and potassium sensing and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 13(5): 604-610
- Hollander-Czytko H, Grabowski J, Sandorf I, Weckermann K, Weiler EW (2005) Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in *Arabidopsis* under stress conditions. *J Plant Physiol* 162: 767-770
- Holmstrup M, Bindesbøl A-M, Oostinhh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler H-R, Loureiro S, Soares AMVM, Ferreira ALG, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C, Spurgeon DJ (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci Total Environ* 408: 3746-3762
- Hortensteiner S, Feller U (2002) Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot* 53: 927-937
- Hou W, Chen X, Song G, Wang Q, Chang CC (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol Biochem* 45: 62-69
- Iyer NJ, Tang Y, Mahalingam R (2013) Physiological, biochemical and molecular responses to a combination of drought and ozone in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ* 36: 706-720
- Jeanne N, Dazy AC, Moreau A (1993) Cadmium interactions with ATPase activity in the euryhaline alga *Dunaliella bioculata*. *Hydrobiologia* 252: 245-256
- Jiang H-S, Li M, Chang F-Y, Li W, Yin L-Y (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 31: 1880-1886
- John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S (2007) Antioxidative response of *Lemna polyrrhiza* L. to cadmium stress. *J Environ Bot* 28(3): 583-589
- Joy KW (1988) Ammonium, glutamine, and asparagine – a carbon nitrogen interface. *Can J Bot* 66: 2103-2109

- Kandlbinder A, Finkemeier I, Wormuth D, Hanitzsch M, Dietz KJ (2004) The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 120: 63-73
- Kanoun-Boule' M, Vicente JAF, Nabais C, Prasad MNV, Freitas H (2009) Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper. *Aquat Toxicol* 91: 1-9
- Kant S, Bi Y-M, Rothstein SJ (2011) Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *J Exp Bot* 62: 1499-1509
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284: 654-657
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC, Raghothama KG (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* 225: 907-918
- Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manohran K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5(6): 709-725
- Kasurinen A, Biasi C, Holopainen T, Rousi M, Maenpaa M, Oksanen E (2012) Interactive effects of elevated ozone and temperature on carbon allocation of silver birch (*Betula pendula*) genotypes in an open-air field exposure. *Tree Physiol* 32: 737-751
- Kennedy AI, Hull MS, Bednar AJ, Goss JD, Gunter JC, Bouldin JL, Vikesland PJ, Steevens JA (2010) Fractionin Nanosilver: Importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environ Sci Technol* 44: 9571-9577
- Kim MJ, Ciani S, Schachtaman DP (2010) A peroxidase contributes to ROS production during *Arabidopsis* root response to potassium deficiency. *Mol Plant* 3: 420-427
- Koelmans AA, van der Heijde A, Knijff LM, Aalderink RH (2001) Integrated modelling of eutrophication and organic contaminant fate and effects in aquatic ecosystems. A review. *Wat Res* 35: 3517-3536
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem* 283: 34197-34203
- Lambers H, Brundrett MC, Raven JA, Hopper SD (2010) Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity for nutritional strategies. *Plant Soil* 334: 11-31
- Landolt E (1986) The Family of *Lemnaceae* – a monograph study. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*). Vol 1. Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung ruebel, Zurich, Switzerland
- Lauer MJ, Blevins DG, Sierzputowska-Gracz H (1989a) ³¹P-Nuclear Magnetic Resonance determination of phosphate compartmentation in leaves of reproductive soybean (*Glycine max* L.). *Plant Physiol* 89: 1311-1336
- Lauer MJ, Pallardy SG, Blevins DG, Randall DD (1989b) Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Physiol* 91: 848-854
- Le Bot J, Benard C, Robin C, Bourgaud F, Adamowicz S (2009) The “trade-off” between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency. *J Exp Bot* 60: 4301-4314
- Lemon GD, Posluszny U (2000) Comparative shoot development and evolution in the *Lemnaceae*. *Int J Plant Sci* 161: 733-748

- Lemon GD, Posluszny U, Husband BC (2001) Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. *Aquat Bot* 70: 79-87
- Li T, Xiong Z (2004a) Cadmium-induced colony disintegration of duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) as biomarker of phytotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 59: 174-179
- Li T, Xiong Z (2004b) A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals. *Environ Toxicol* 19: 95-102
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 350-382
- Lillo C (2008) Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochem J* 415: 11-19
- Lillo C, Lea US, Ruoff P (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ* 31: 587-601
- Lisjak M, Špoljarević M, Agić D, Andrić L (2009) Praktikum iz fiziologije bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, on-line priručnik:
http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/praktikum_fiziologije_bilja.pdf
- Liu J, Hurt RH (2010) Iron release kinetics and particle persistence in aqueous nanosilver colloids. *Environ Sci Technol* 44: 2169-2175
- Liu SC, Lin JT, Wang CK, Chen HY, Yang DJ (2009) Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. *Food Chem* 114: 577-581
- Lowry GV, Espinasse BP, Appala RB, Richardson CJ, Reinsch BC, Bryant LC (2012) Long term transformation and fate of manufactured Ag nanoparticles in a simulated large scale freshwater emergent wetland. *Environ Sci Technol* 46: 7027-7036
- Løvdaal T, Olsen KM, Slimestor R, Verhuel M, Lillo C, (2010) Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochem* 71: 605-613
- Löw M, Herbinger K, Nunn AJ, Häberle KH, Leuchner M, Heerdt C, Werner H, Wipfler P, Pretzsch H, Tausz M (2006) Extraordinary drought of 2003 overrules ozone impact on adult beech trees (*Fagus sylvatica*). *Trees* 20: 539-548
- Lynch J, Läushil A, Epstein E (1991) Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci* 31: 380-387
- Maher P (2005) The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4: 288-314
- Malusà E, Laurenti E, Juszczuk I, Ferrari RP, Rychter AM (2002) Free radical production in roots of *Phaseolus vulgaris* subjected to phosphate deficiency stress. *Plant Physiol Biochem* 40: 963-967
- Marrs KA (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158
- Marschner P (2012) Marschner's mineral nutrition of higher plants, 3rd edition. Academic Press, London
- Mathé C, Barre A, Jourda C, Dunand C (2010) Evolution and expression of class III peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 500: 58-65

- Mengel K, Kirkby EA (2001) Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers.
- Miao AJ, Schwehr KA, Xu C, Zhang SJ, Luo Z, Quigg A, Santschi PH (2009) The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ Pollut* 157: 3034-3041
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J Environ Stud* 15: 523-530
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133: 443-447
- Mittler R, Blumwald E (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol* 61: 443-462
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11: 15-19
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410
- Mkandawire M, Vogel K, Taubert B, Dudel EG (2007) Phosphate regulates uranium (VI) toxicity to *Lemna gibba* L. G3. *Environ Toxicol* 22(1): 9-16
- Mkandawire M, Dudel EG (2007) Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents, *Biorem Biodiv Bioavail* 1(1): 56-71
- Munné-Bosch S (2005) The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol* 162: 743-748
- Murkherjee SP, Choudhuri MA (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plantarum* 58: 166-170
- Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001) Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160: 291-299
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Naumann B, Eberius M, Appenroth K-J (2007) Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St.. *J Plant Physiol* 164: 1656-1664
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Curr Opin Plant Biol* 5: 388-395
- Newman MC, Unger MA (2003) Fundamentals of ecotoxicology. Second Edition. Boca Raton: Lewis Publishers
- Nguyen PM, Niemeyer ED (2008) Effects of nitrogen fertilization on the phenolic composition and antioxidant properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *J Agric Food Chem* 56: 8685-8691
- Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH (2011) Glutathione. U: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD
- Noctor G, Gomez LA, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304

Noctor G, Foyer CH (1998) A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C₃ photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J Exp Bot* 49: 1895-1908

Ogilby PR (2010) Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 39: 3181-3209

Ohkama-Ohtsu N, Wasaki J (2010) Recent progress in plant nutrition research: Cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms. *Plant Cell Physiol* 51(8): 1255-1264

Organization of Economic Cooperation and Development (2002) Guidelines for testing of chemicals, *Lemna* sp. Growth Inhibition test. Draft guideline 221, Paris, France

Oukarroum A, Gaudreault M-H, Pirastru L, Popovic R (2013) Alleviation of silver toxicity by calcium chloride (CaCl₂) in *Lemna gibba* L. *Plant Physiol Biochem* 71: 235-239

Ouzounidou G, Constantinidou HA (1999) Changes in growth and physiology of tobacco and cotton under Ag exposure and recovery: are they of direct or indirect nature? *Arch Environ Contam Toxicol* 37: 480-419

Owen AG, Jones DL (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biol Biochem* 33: 651-657

Peng CI, Ou ZY, Liu N, Lin GZ (2005) Response to high temperature in flag leaves of super-high yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci* 12: 179-186

Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Zylkiewicz B, Zambrzycka E (2010) Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (*Lemnaceae*) exposed to Cadmium and Lead. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 594-604

Pirson A, Seidel F (1950) Cell metabolism and physiology in *Lemna minor* root deprived of potassium and calcium (Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* unter besonderer Berücksichtigung von Kalium und Calciummangel). *Planta* 38: 431-437

Poleskaya OG, Kashirina EI, Alekhina ND (2004) Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply. *Russ J Plant Physiol* 51(5): 615-620

Portis Jr. AR (1982) Effects of the relative extra-chloroplastic concentrations of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxy-acetone phosphate on the rate of starch synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 70: 393-396

Prasad MNV, Malec P, Waloszek A, Bojko M, Strzalka K (2001) Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Sci* 161: 881-889

Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74

Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT (2001) Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *J Exp Bot* 52: 113-121

Purcell TW, Peters JJ (1998) Sources of silver in the environment. *Environ Toxicol Chem* 17: 539-46

- Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li H-Y, (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J Integrat Plant Biol* 50: 2-18
- Radić S, Stipančev D, Cvjetko P, Lovrenčić Mikelić I, Marijanović Rajčić M, Širac S, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M (2010) Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology* 19(1): 216-222
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693
- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC, Bressendorff S, Friis P, Costantino P, Bones AM, Nielsen HB, Mundy J (2013) Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 161: 1783-1794
- Rausch T, Wachter A (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci* 10: 503-509
- Ravindran A, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2012) Studies on differential behavior of silver nanoparticles towards thiol containing amino acids. *Current Nanoscience* 8: 141-149
- Razinger J, Dermastia M, Dolenc Koce J, Zrimec A (2008) Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ Pollut* 153: 687-694
- Razinger J, Dermastia M, Drinovec L, Drobne D, Zrimec A, Dolenc Koce J (2007) Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. *Environ Sci Pollut Res Int* 14: 194-201
- Reuveny Z, Dougall DK, Trinity PM (1980) Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6670-6672
- Richard-Molard C, Krapp A, Brun F, Ney B, Daniel-Vedele F, Chaillou S (2008) Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *J Exp Bot* 59: 779-791
- Rivero RM, Mestre TC, Mittler R, Rubio F, Garcia-Sanchez F, Martinez V (2013) The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environment*. 37(5): 1059-1073
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* 130: 1143-1151
- Robinson D (1994) The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127: 635-674
- Robinson SP, Giersch C (1987) Inorganic phosphate concentration in the stroma of isolated chloroplasts and its influence on photosynthesis. *Aust J Plant Physiol* 14: 451-462
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122-1134
- Sagar BK, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 48: 412-422
- Scalla R, Roulet A (2002) Cloning and characterisation of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol* 116: 336-344
- Scheible WR, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol* 136: 2483-2499

- Schjoerring JK, Husted S, Mäck G, Mattsson M (2002) The regulation of ammonium translocation in plants. *J Esp Bot* 53: 883-890
- Semane B, Cuyppers A, Smeets K, Van Belleghem F, Horemans N, Schat H, Vangronsveld J (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiol Plant* 129: 519-528
- Severi A (2001) Toxicity of selenium to *Lemna minor* in relation to sulfate concentration. *Physiol Plant* 113: 523-532
- Shane MW, McCully ME, Lambers H (2004) Tissue and cellular phosphorus toxicity in *Hakea prostrata* (*Proteaceae*). *J Exp Bot* 55: 1033-1044
- Sharma SS, Dietz KJ (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43-50
- Sharma P, Dubey RS (2005) Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol* 162: 854-864
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications in classification on non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16
- 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
- Shin R, Berg RH, Schachtman DP (2005) Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiol* 46: 1350-1357
- Shin R, Schachtman DP (2004) Hydrogen peroxide mediates plant root response to nutrient deprivation. *Pro Natl Acad Sci USA* 101: 8827-8832
- Siedlecka A, Krupa Z (1999) Cd/Fe interactions in higher plants - Its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 36: 321-331
- Siegel BZ, Galston W (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 42: 221-226
- Sinha S, Saxena R, Singh (2005) Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. *Chemosphere* 58: 595-604
- Sinha S, Gupta M, Chandra P (1996) Bioaccumulation and biochemical effects of mercury in the plant *Bacopa monnieri* (L). *Environ Toxic Water Qual* 11: 105-112
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phospho-molybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158
- Sivaci A, Sivaci ER, Sökmen M (2007) Changes in antioxidant activity, total phenolic and abscisic acid constituents in the aquatic plants *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* Orchard exposed to cadmium. *Exotoxicology* 16(5): 423-428
- Smirnoff N (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. U: Smirnoff N (ur.) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*, str. 53-86. Oxford: Blackwell Publishing
- Smirnoff N (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3: 229-235

Smirnoff N (1995) Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK

Smirnoff N, Wheeler GL (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Crit Rev Biochem Mol Biol 35: 291-314

Smith FW, Jackson WA, Van den Berg PJ (1990) Internal phosphorus flows during development of phosphorus stress in *Stylosanthes hamata*. Austr J Plant Physiol 17: 451-454

Smith S, Kwan KH (1989) Use of aquatic macrophytes as a bioassay method to assess relative toxicity, uptake kinetics and accumulated forms of trace metals. Hydrobiologia 188/189: 345-351

Srivastava G, Kumar S, Dubey G, Mishra V, Prasad SM (2012) Nickel and ultraviolet-B stresses induce differential growth and photosynthetic responses in *Pisum sativum* L. seedlings. Biol Trace Elem Res 149: 86-96

Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedo S, Gupta DK (2006) Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Aquat Toxicol 80: 405-415

Srivastava AK, Bhargava P, Rai LC (2005) Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*, W J Microb Biotechnol 22: 1291-1298

Stewart AJ, Chapman W, Jenkins GI, Graham I, Martin T, Crozier A (2001) The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. Plant Cell Environ 1189-1197

Sunda WG, Huntsman SA (1998) Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. Sci Total Environ 219: 165-181

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014) Abiotic and biotic stress combinations. New Phytologist 203: 32-43

Suzuki Y, Tsukamoto T, Inoue H, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2001) Deoxymugineic acid increases Zn translocation in Zn-deficient rice plants. Plant Mol Biol 66: 609-617

Szarka A, Tomasskovics B, Bánhegyi (2012) The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. Int J Mol Sci 13: 4458-4483

Tahara S (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. Biosci Biotechnol Biochem 71: 1387-1404

Teisseire H, Guy V (2000) Copper induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). Plant Sci 153: 65-72

Tewari RK, Kumar P, Sharma PN (2007) Oxidative stress and antioxidant responses of young leaves of mulberry plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium deficiency. J Integr Plant Biol 49: 313-322

Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN (2004) Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. Plant Sci 166: 687-694

Tkalec M, Prebeg T, Roje V (2008) Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. Acta Physiol Plant 30: 881-890

Topp C, Henke R, Keresztes A, Fischer W, Eberius M, Appenroth K-J (2011) A novel mechanism of abscission in fronds of *Lemna minor* L. and the effect of silver ions. *Plant Biol* 13: 517-523

Usha Kumari J, Reddy KJ (2000) Effect of Phosphorus and Zinc on growth and fruit yield of Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Bull Pure Appl Sci* 19 B(1): 17-19

Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR (2005) Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *J Exp Bot* 56: 309-321

Uruç Parlak K, Yilmaz D (2012) Response of antioxidant defence to Zn stress in three duckweed species. *Ecotoxicol Environ Saf* 85: 52-58

Varga M, Horvatić J, Čelić A (2013) Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. *Cent Eur J Biol* 8(11): 1083-1093

Vellosillo T, Vicente J, Kulasekaran S, Hamberg M, Catresana C (2010) Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiol* 154: 444-448

Verma S, Dubey RS (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164: 645-655

Vranova E, Atichartpongkul S, Villarroel MV, Inze D., Camp WV (2002) Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 870-875

Wang C, Zhang SH, Wang PF, Qian J, Hou J, Zhang WJ, Lu J (2009) Excess Zn alters the nutrient uptake and induces the antioxidative responses in submerged plant *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle. *Chemosphere* 76: 938-945

Wang Y, Fang J, Leonard SS, Murali Krishna Rao K (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 1434-1443

Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14

Wang R, Guegler K, LaBrie ST, Crawford NM (2000) Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 12(8): 1491-1510

Wang W (1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ Re* 52: 7-22

Wasaki J, Yonetani R, Kuroda S, Shinano T, Yazaki J, Fujii F (2003) Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant Cell Envir* 26: 1515-1523

White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182: 49-84

Witzum A (1979) Morphogenesis of asymmetry and symmetry in *Lemna perpusilla* Torr. *Ann Bot* 43: 432-430

Xing W, Li D, Liu G (2010) Antioxidative response of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiol Biochem* 48: 873-878

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

Yadav SK (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *S Afr J Bot* 76: 167-179

Yeum KJ, Ferreira ALD, Smith D, Krinsky NI, Russell RM (2000) The effect of α -tocopherol on the oxidative cleavage of β -carotene. *Free Radic Biol Med* 29: 105-114

Yilmaz DD, Parlak KU (2011) Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecol Indicators* 11: 417-423

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

Zhao CM, Wang WX (2011) Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 30: 885-892

7. Sažetak

7. Sažetak

Vodene leće su široko rasprostranjene u vodenim ekosustavima i jednostavno se uzgajaju u laboratorijskim uvjetima. Zbog svoje važnosti često se koriste za ispitivanje štetnog djelovanja različitih okolišnih čimbenika i njihovih kombinacija u vodenim ekosustavima. *Lemna gibba* L. izložena je djelovanju različitih koncentracija ionskog koloidnog srebra u potpunoj hranjivoj otopini te u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora. Praćen je utjecaj tretmana na rast biljka, koncentraciju fotosintetskih pigmenata, ravnotežu nutrijenata u stanicama, pokazatelje oksidacijskog stresa te antioksidacijski odgovor biljaka. Ionsko koloidno srebro u potpunoj hranjivoj otopini inhibiralo je rast vodene leće, uzrokovalo preuranjeno otpuštanje mladih biljka iz kolonije te značajno smanjenje koncentracije ukupnih proteina u stanicama. Uslijed akumulacije srebra u stanicama *L. gibba* dolazi do narušavanja ravnoteže nutrijenata smanjenjem koncentracije magnezija i željeza. Toksični utjecaj srebra vidljiv je i kroz oštećenje fotosintetskog sustava u stanicama *L. gibba* koje se očituje značajnim smanjenjem koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida. Antioksidacijski odgovor *L. gibba* na tretman ionskim koloidnim srebrom uključivao je povećanje aktivnosti superoksid-dismutaze, katalaze, askorbat-peroksidaze i gvajakol-peroksidaze te povećanu akumulaciju fenola, dok je aktivnost glutation-reduktaze bila inhibirana. Oksidacijski stres u stanicama *L. gibba* ukazuje na neučinkovitost antioksidacijskog odgovora na toksičnost ionskog koloidnog srebra. Intenzitet oksidacijskog stresa ovisio je o trajanju izlaganja i koncentraciji srebra, a očitovao se značajnom akumulacijom vodikovog peroksida i produkata peroksidacije lipida. Koncentracije dušika i fosfora u hranjivoj otopini imale su značajan utjecaj na akumulaciju srebra u tkivu *L. gibba* pri čemu je manja akumulacija utvrđena u biljkama tretiranim pri smanjenim koncentracijama dušika i fosfora u hranjivoj otopini. Smanjenje prirasta svježe mase biljaka pri smanjenim koncentracijama dušika i fosfora u hranjivoj otopini posljedica je sinergističkog djelovanja nedostatka nutrijenata i povišenih koncentracija srebra. Antioksidacijski odgovor biljaka pri tretmanu ionskim koloidnim srebrom u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora nije bio učinkovit u sprječavanju oksidacijskog stresa uslijed štetnog djelovanja srebra. Iako je akumulacija srebra u biljkama tretiranim u hranjivim otopinama sa smanjenim koncentracijama dušika i fosfora bila smanjena, srebro je imalo toksičan utjecaj na biljke. Budući da koncentracije od 50% i 25% dušika i fosfora u hranjivoj otopini bez dodatka srebra nisu uzrokovale značajne promjene pokazatelja oksidacijskog stresa, utvrđene fiziološke promjene u *L. gibba* isključivo su rezultat toksičnosti srebra. Manja akumulacija srebra u biljkama tretiranim ionskim koloidnim srebrom u hranjivoj

otopini s 10% koncentracije dušika i fosfora uzrokuje najintenzivniji oksidacijski stres koji je posljedica sinergističkog djelovanja smanjenih koncentracija nutrijenata i dodatka srebra. *L. gibba* bila je najosjetljivija na djelovanje ionskog koloidnog srebra pri 10% dušika i fosfora u hranjivoj otopini. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na mogućnost korištenja vrste *Lemna gibba* kao eksperimentalnog modela za proučavanje štetnog djelovanja metala u uvjetima različitih koncentracije nutrijenata.

8. Summary

8. Summary

Duckweeds are widely distributed in aquatic ecosystems and are easily cultured in laboratory conditions. Due to their importance, duckweeds are often used in evaluating harmful effects of environmental factors and their combinations in aquatic ecosystems. Different concentrations of ionic colloidal silver were applied to duckweed *Lemna gibba* L. in full strength nutrient solution and nutrient solution with decreased nitrogen and phosphorus concentrations to investigate induced physiological changes in plants. The effects of ionic colloidal silver on growth, photosynthetic pigment concentration, nutrient balance in cells, markers of oxidative stress as well as an antioxidative response of the plants was investigated. The results obtained in this study demonstrated that ionic colloidal silver applied to plants in full strength nutrient solution inhibited growth rate and caused premature frond abscission alongside with significant decrease in protein concentration. Reduced concentrations of magnesium and iron in duckweed cells indicated a disruption of nutrient balance due to silver accumulation. The toxicity of ionic colloidal silver was also evident through damage to photosynthetic apparatus, decreased concentrations of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids. Treatment with ionic colloidal silver induced an antioxidative response in *L. gibba* cells by increasing the activities of ascorbate peroxidase, catalase and superoxide dismutase and increasing the accumulation of phenolic compounds. Inhibited activity of glutathione reductase may indicate inefficient regeneration of reduced glutathione. Oxidative stress, evident from significant accumulation of hydrogen peroxide and lipid peroxidation end-products, indicated insufficient antioxidative response of *L. gibba* plants. The intensity of oxidative stress depended on the concentration of ionic colloidal silver as well as the duration of exposure. Nitrogen and phosphorus concentrations in nutrient solution had a significant influence on the accumulation of silver in *L. gibba* with lower accumulation in plants treated with decreased concentrations of nutrients. Fresh weight growth rate was inhibited due to the synergistic interaction of decreased nutrient concentrations and added silver. The antioxidative response of *L. gibba* plants in nutrient solution with reduced nitrogen and phosphorus concentrations was inefficient in preventing oxidative stress due to harmful effects of silver. Although the accumulated silver concentrations were lower, silver was toxic to *L. gibba* plants in nutrient solutions with decreased nitrogen and phosphorus concentrations. Observed physiological changes in *L. gibba* plants were the result of silver toxicity, since decreasing nutrient concentrations to 50% and 25% in the medium did not cause significant changes in the concentration of oxidative stress markers. Lower concentrations of accumulated silver in plants treated with ionic colloidal silver in the nutrient

solution with 10% of nitrogen and phosphorus caused the most pronounced oxidative stress as a result of synergistic effect of decreased nutrient concentrations and added silver. *L. gibba* plants were the most sensitive to silver toxicity when silver was added to nutrient solution with 10% of nitrogen and phosphorus concentrations. *Lemna gibba* can be used as a model for further study of harmful metal effects on plants in varying nutrients concentrations.

9. Životopis

9. Životopis

Rođena sam u Osijeku 25. studenog 1983. godine. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja upisala sam studij biologije i kemije. Diplomirala sam 2007. godine te stekla zvanje profesora biologije i kemije na Odjelu za biologiju i Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Od ožujka do prosinca 2008. godine bila sam zaposlena u Osnovnoj školi „Vladimir Nazor“ Trenkovo, a od prosinca 2008. zaposlena sam kao asistent na Odjelu za biologiju, Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Laboratoriju za ekofiziologiju biljaka. Sudjelujem u izvođenju praktičnog dijela nastave u sklopu kolegija: Fiziologija bilja 1, Molekularna ekofiziologija biljaka i Fiziologija stresa biljaka. Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilišta u Dubrovniku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu upisala sam 2008. godine.

Kao istraživač sudjelovala sam u znanstvenim istraživanjima u okviru projekta „Nutrienti i razvoj plutajućih makrofita i alga u Istočnoj Hrvatskoj“ (285-0000000-3175) izv. prof. dr. sc. Janje Horvatić.

Sudjelovala sam na četiri međunarodna skupa, a u koautorstvu sam objavila tri znanstvena rada.

Popis publikacija:

Znanstveni rad objavljen u CC časopisu:

Varga M, Horvatić J, Čelić A (2013) Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium. Cent Eur J Biol 8(11): 1083-1093

Znanstveni radovi objavljeni u drugim časopisima:

Horvatić J, Kočić A, Bučanac D, Peršić V, **Varga M** (2013) Preliminarna istraživanja sezonskih promjena slobodno-plivajućih i submerznih makrofita u kanalu Barbara (Baranja). Hrvatske vode: časopis za vodno gospodarstvo. 21(85): 215-224

Štolfa I, Marić S, Marić S, Stanisavljević A, Vuković R, Špoljarić D, **Varga M** (2014) The impact of environmentally friendly postharvest treatments on the antioxidant activity of strawberry fruits during storage. *Poljoprivreda (Osijek)* 20(2): 23-28

Sažetci u zbornicima skupova:

Jelošek M, Peršić V, Horvatić J (2009) Phytotoxicity of nickel on the aquatic duckweeds, *Lemna minor* L. and *Lemna gibba* L. 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, 121-122

Jelošek M, Horvatić J, Šarec T (2012) Effects of Mercury, Cobalt and Manganese on Pea Seedlings. International Conference Plant Abiotic Stress Tolerance; Touraev A, Zhu JK, Hirt H (ur.). Beč, 84-84

Vuković R, Blažetić S, Vuković A, Vuković K, **Varga M**, Balog M, Krivošikova Z, Heffer M, Has-Schon E (2014) Selenized onion biscuits in attenuating oxidative stress induced by high fat diet, in the liver of ovariectomised rats. Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "The interplay of Biomolecules", HDBMB2014; Katalinić M and Kovarik Z (ur.). Zadar: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 67-67

Varga M, Štolfa I, Horvatić J (2015) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on antioxidative response of *Lemna gibba* plants to silver toxicity. Book of abstracts of the 2nd Conference on Plant Biology and 21st Symposium of the Serbian Plant Physiology Society and COST Action FA1106 Quality Fruit Workshop; Uzelac B (ur.). Belgrade: Serbian Plant Physiology Society; Institute for Biological Research „Siniša Stanković“; University of Belgrade, 186-186