

UNIVERZA V LJUBLJANI  
PEDAGOŠKA FAKULTETA  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Program: Biologija in gospodinjstvo

**ODZIV MALE VODNE LEČE (*Lemna minor* L.) NA  
PRISOTNOST KADMIJA**

DIPLOMSKO DELO

Mentorica:

prof. dr. Marina Dermastia

Kandidatka:

Teja Strlič

Somentorica:

dr. Jasna Dolenc Koce

Ljubljana, maj, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije in gospodinjstva. Opravljeno je bilo na katedri za botaniko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze Ljubljana, ter na Inštitutu za fizikalno biologijo v Grosuplju.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela. Za mentorico je potrdila prof. dr. Marino Dermastia in za somentorico dr. Jasno Dolenc Koce.

Komisija za zagovor in oceno:

Predsednica: prof. dr. Alenka GABERŠČIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Barbara BAJD

Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Oddelek za biologijo, kemijo in gospodinjstvo

Članica: prof. dr. Marina DERMASTIA

Nacionalni institut za biologijo

Članica: dr. Jasna DOLENC KOCE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 7.5.2008

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovanja.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Teja Strlič

## **IZVLEČEK**

V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv težke kovine kadmija na malo vodno lečo (*Lemna minor* L.), ki je uveljavljen testni organizem v ekotoksikologiji. Zanimale so nas morfološke spremembe rastlin po sedem dnevni izpostavitvi in odziv izbranih antioksidativnih encimov ter akumulacija te kovine v tkiva rastline po 24 urni izpostavitvi različnim koncentracijam kadmijevega klorida ( $\text{CdCl}_2$ ).

Po napotkih ISO/CD 20079 (2001) testa smo malo vodno lečo za en teden izpostavili različnim koncentracijam  $\text{CdCl}_2$ , pozitivno kontrolo pa je predstavljal diklorofenol. Ugotovili smo, da je efektivna koncentracija,  $\text{EC}_{50}$ , *Lemna minor* za kadmij okrog  $10 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  v rastnem gojišču. Nižje koncentracije kadmija niso imele večjega učinka na rastline, opazili smo le nekaj kloroz in manjši upad rasti, kar je prvi znak stresa, povzročenega s težkimi kovinami. Od  $10 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  dalje pa je bilo prisotnega vedno več klorotičnega tkiva, poleg tega so se pojavile nekroze, močno je upadlo število členkov, razpadle so kolonije in odpadle korenine.

V nadaljevanju smo rastline izpostavili različnim koncentracijam kadmija še za 24 ur in za pozitivno kontrolo izbrali znan prožilec oksidativnega stresa, menadion. V rastlinah smo ugotavljali količino privzema kovine v tkiva in aktivnosti antioksidativnih encimov. Rezultati so pokazali, da mala vodna leča dobro kopiči kadmij in bi jo potencialno lahko uporabili za fitoremediacijo s kadmijem onesnaženih voda. Prisotnost kadmija je povzročila različne odzive antioksidativnih encimov v rastlini. Aktivnost katalaze se je zmanjšala že pri nizkih koncentracijah  $\text{CdCl}_2$ . Aktivnosti askorbat peroksidaze, guaiakol peroksidaze in glutation reduktaze so se pri nizkih koncentracijah kadmija v gojišču povečale, a pri višjih koncentracijah zmanjšale. Najmanj je kadmij vplival na aktivnost glutation reduktaze. Sledenje aktivnosti antioksidacijskih encimov male vodne leče bi lahko uporabili za hitro zaznavo prisotnosti onesnažil v vodi, saj so taki biokemijski testi hitrejši v primerjavi z opazovanjem morfoloških in vitalnostnih sprememb v rastlini.

## **KLJUČNE BESEDE**

mala vodna leča (*Lemna minor*), kadmij, antioksidativni encimi, katalaza, askorbat peroksidaza, guaiakol peroksidaza, glutation reduktaza, akumulacija kovin

## **ABSTRACT**

We investigated the influence of heavy metal cadmium on a very well-known test organism in ecotoxicology, the common duckweed (*Lemna minor* L.).

We evaluated morphological changes in plants after seven days of cadmium exposure. We exposed duckweed to different concentrations of CdCl<sub>2</sub> for a week according to the ISO/CD 20079 (2001) test. For a positive control we used 3,5- dichlorophenol. The results showed that effective concentration EC<sub>50</sub> for *L. minor* exposed to cadmium is around 10 µM of CdCl<sub>2</sub> in growth medium. Lower concentrations did not show significant impact on plants and resulted in few chloroses and a slight growth inhibition. On the other hand, higher concentrations caused more chloroses, necroses, extremely diminished growth, colonies degraded and roots dropped off.

In addition, we treated duckweed with different concentrations of CdCl<sub>2</sub> for 24 hours. As a positive control we used menadion, a well-known inducer of oxidative stress. After the 24 hour exposure we measured the uptake of cadmium in plant tissues and the antioxidant enzyme activity. Our results indicated that *L. minor* accumulates cadmium in relatively high concentrations and thus showing a potential for using it for phytoremediation of waste waters, polluted with low cadmium concentrations. The presence of cadmium in growth medium caused different responses of antioxidant enzymes in plants. Catalase activity was inhibited at all tested cadmium concentrations. While activities of ascorbat peroxidase, guaiacol peroxidase and glutathione reductase were increased after 24 hours of exposure to lower cadmium concentrations, higher concentrations caused decrease in their activity. Cadmium had the least effect on glutathione reductase activity.

## **KEY WORDS**

duckweed (*Lemna minor*), cadmium, antioxidative enzymes, catalase, ascorbat peroxidase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, metal accumulation

## KAZALO VSEBINE

<b>IZVLEČEK</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO TABEL</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 AKUMULACIJA KOVIN V RASTLINAH	3
2.2 OKSIDATIVNI STRES	4
2.2.1 <i>Reaktivne kisikove spojine (ROS)</i>	5
2.3 ANTIOKSIDANTI	6
2.4 KADMIJ	7
2.5 MALA VODNA LEČA ( <i>LEMNA MINOR</i> L.)	9
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>11</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE	11
3.2 SEDEM DNEVNI TEST ISO/CD 20079 (2001)	11
3.2.1 <i>Priprava vzorcev</i>	12
3.2.1.1 Diklorofenol (DKF)	12
3.2.1.2 Kadmij	13
3.2.1.3 Prenos kolonij v kristalizirke in epruvete	14
3.2.2 <i>Rastna komora</i>	14
3.2.3 <i>Štetje in opazovanje členkov</i>	14
3.3 IZPOSTAVITEV RASTLIN RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM KADMIIJA	15
3.4 TKIVNA KONCENTRACIJA KADMIIJA V RASTLINAH IN RASTNEM GOJIŠČU	17
3.4.1 <i>Priprava steklovine za merjenje kovin</i>	17
3.4.2 <i>Priprava rastlinskega materiala</i>	17
3.4.3 <i>Razklop</i>	18
3.4.4 <i>Meritev Cd z atomskim spektrofotometrom</i>	18
3.5 VSEBNOST PROTEINOV V VZORCIH	19
3.6 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI	20
3.6.1 <i>Priprava rastlinskega materiala</i>	21
3.6.2 <i>Priprava kalij-fosfatnega pufra (100 mM)</i>	21
3.6.3 <i>Encimi</i>	22

3.6.3.1	Merjenje encimske aktivnosti katalaze (CAT, EC 1.11.1.6)	22
3.6.3.2	Merjenje encimske aktivnosti askorbat peroksidazne (A-POD, EC 1.11.1.11)	23
3.6.3.3	Merjenje encimske aktivnosti guaiakol peroksidaze (G-POD, EC 1.11.1.7)	25
3.6.3.4	Merjenje encimske aktivnosti glutation reduktaze (GR, EC 1.6.4.2)	27
3.6.4	<i>Menadion</i>	28
3.7	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	29
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	30
4.1	SEDEM DNEVNI TEST RASTI (ISO/CD 20079)	30
4.1.1	<i>Diklorofenol</i>	30
4.1.2	<i>Kadmij</i>	32
4.2	TKIVNA KONCENTRACIJA KADMIIA V RASTLINAH IN RASTNIH GOJIŠČIH	34
4.3	VSEBNOST PROTEINOV	36
4.4	ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI	36
4.4.1	<i>Katalaza</i>	36
4.4.2	<i>Askorbat peroksidaza</i>	38
4.4.3	<i>Guaiakol peroksidaza</i>	39
4.4.4	<i>Glutation reduktaza</i>	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	41
5.1	RAZPRAVA	41
5.1.1	<i>Sedem dnevni test rasti ISO/CD 20079 (2001)</i>	41
5.1.2	<i>Tkivna koncentracija kadmija v rastlinah in gojiščih</i>	43
5.1.3	<i>Vsebnost proteinov</i>	43
5.1.4	<i>Antioksidativni odziv</i>	44
5.2	SKLEPI	46
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	47
<b>7</b>	<b>UPORABA PRI POUKU NARAVOSLOVJA, BIOLOGIJE IN IZBIRNIH PREDMETIH V OSNOVNI ŠOLI</b>	49
7.1	PREGLED UČNIH NAČRTOV ZA DEVETLETNO OSNOVNO ŠOLO V POVEZAVI S TEMO DIPLOMSKEGA DELA	49
7.2	PRIMER UČNE PRIPRAVE	53
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	56
<b>ZAHVALA</b>		60
<b>PRILOGE</b>		61

## KAZALO SLIK

Slika 1. <i>Lemniaceae</i>	9
Slika 2. Mala vodna leča	10
Slika 3. Odvisnost tkivne koncentracije kadmija od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v rastnem gojišču	35
Slika 4. Odvisnost koncentracije proteinov v vzorcu od koncentracije Cd v gojišču	36
Slika 5. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) katalaze (CAT) od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v gojišču	37
Slika 6. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) askorbat peroksidaze (A-POD) od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v gojišču	38
Slika 7. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) guaiakol peroksidaze (G-POD) od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v gojišču	39
Slika 8. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) glutation reduktaze (GR) od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v gojišču	40

## **KAZALO TABEL**

Tabela 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079)	12
Tabela 2: Uporabljena razredčitvena vrsta za DKF	13
Tabela 3: Uporabljena razredčitvena vrsta za CdCl <sub>2</sub>	13
Tabela 4: Izpostavitev <i>L. minor</i> različnim koncentracijam Cd	17
Tabela 5: Temperaturni in časovni režim razklopa rastlinskih vzorcev	18
Tabela 6: Uporabljena razredčitvena vrsta za albumin	20
Tabela 7: Rezultati sedem dnevnega ISO testa – pozitivna kontrola DKF	31
Tabela 8: Rezultati sedem dnevnega ISO testa – izpostavitev CdCl <sub>2</sub>	34

## KAZALO PRILOG

PRILOGA I: Povprečne koncentracije kadmija v tkivih po izpostavitvi	61
PRILOGA II :Povprečne vrednosti SEA posameznega encima po 24h izpostavitvi CdCl <sub>2</sub>	61
PRILOGA III: Odvisnost tkivne koncentracije kadmija od koncentracije CdCl <sub>2</sub> v rastnem gojišču	62
PRILOGA IV: Učni list za učence na dan nastavitev poskusa	63
PRILOGA VI: Učni list za učence na po enem oziroma dveh tednih	64

## **OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

A-POD	askorbat peroksidaza
CAT	katalaza
Cd	kadmij
CdCl <sub>2</sub>	kadmijev klorid
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
DKF	3,5- diklorofenol (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTNB	5,5-dithio-bis (2-nitrobenzojska kislina)
EA	encimska aktivnost
EC <sub>50</sub>	efektivna koncentracija (50 %)
EDTA	etilen-diamin-tetraacetna kislina
FAAS	plamenska atomska absorpcijska spektrofotometrija (ang. flame atomic absorption spectrophotometry)
G-POD	guaiakol peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSSG	oksidirani glutation
HClO <sub>4</sub>	perklorova kislina
HNO <sub>3</sub>	dušikova kislina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
K-PO <sub>4</sub>	kalijev-fosfatni pufer
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dikalijev hidrogen fosfat
NaOCl	natrijev hipoklorit
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	superoksidni anion
OH <sup>·</sup>	hidroksidni radikal
O <sub>2</sub> H <sup>·</sup>	hidroperoksidni radikal
PAR	fotosintezno aktivni spekter sevanja (med 400 in 700 nm)
ROS	reaktivne kisikove spojine (ang. reactive oxygen species)
SEA	specifična encimska aktivnost
TNB	2-nitro-5-thiobenzojska kislina

## 1 UVOD

Človek je že od nekdaj s svojim delovanjem posegal v okolje in s tem v svoj življenjski prostor. Če se ozremo v zgodovino, lahko opazimo, da čim višja je bila stopnja njegove civilizacije, tem večji so bili njegovi posegi v naravo. Nenehni izumi so pomagali človeku do lažjega dela, učinkovitejših orodij in strojev. Eden glavnih mejnikov je bila industrijska revolucija v 18. stoletju. Pospešila je rast mest, kjer sta se razvijali obrt in industrija. Sledila je mehanizacija poljedelstva in močan razvoj medicine. Vse to je vplivalo na hitro rast prebivalstva. Povečale so se potrebe po hrani, energiji in surovinah, s čimer se je povečalo tudi pustošenje okolja. Rast proizvodnje in naraščanje porabe energije je povečevalo onesnaževanje zraka, vode in tal, čemur je sledil upad raznovrstnosti ekosistemov in organizmov, ki se hitrim spremembam niso bili sposobni prilagoditi.

Danes ni onesnaževanje nič manjše. Gospodinjski in industrijski odpadki ter odpadne vode izpuščamo v okolje. V kmetijstvu uporabljamo različne pesticide in umetna gnojila. V okolju se pojavlja vedno več umetnih snovi, ki ne razpadejo. Kopičijo se v zemlji, vodi in zraku, od tu pa jih lahko privzamejo organizmi, kjer se kopičenje nadaljuje. Vendar pa zavedanje o varstvu narave med ljudmi narašča. Ker tako ne bo šlo v nedogled, se vedno več raziskovalcev ukvarja s problemom onesnaževanja. Razvili so različne čistilne naprave za odpadne vode in izpušne pline, recikliranje odpadkov,... Možnosti pa vse bolj iščejo v naravi sami. Tako so ugotovili, da so nekatere rastline s kopičenjem določenih onesnažil v svojih tkivih primerne za čiščenje tal, vode in zraka.

Vse spremembe v okolju seveda niso posledica antropogenega delovanja. Stresno okolje lahko oblikujejo tudi naravne spremembe v življenjskem okolju rastline, na primer pomanjkanje vode, premočno ali prešibko sevanje, pomanjkanje hrani, težke kovine, ipd. Na stres se rastline odzovejo na različne načine. Eden od možnih je nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS – angl. reactive oxygen species), ki poruši normalno celično ravnotesje med oksidanti (ROS) in antioksidanti. To stanje imenujemo oksidativni stres. Če rastlina proizvede dovolj antioksidativnih encimov in drugih antioksidantov, lahko z

njimi pretvori in odstrani ROS. V nasprotnem primeru te lahko poškodujejo DNA, beljakovine in lipide. Če se stanje ne normalizira, se na rastlini pojavijo nepovratne poškodbe in rastlina lahko tudi propade.

V diplomskem delu smo tako raziskovali vpliv različnih koncentracij težke kovine kadmij (Cd) na izbrane antioksidativne encime pri mali vodni leči (*Lemna minor* L.) po 24 urni izpostavitvi kovini. Poleg odziva encimov smo določili količino celotnega kadmija v rastlinah in ugotavljali, ali je mala vodna leča akumulatorska vrsta za kadmij.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 AKUMULACIJA KOVIN V RASTLINAH

Kovine najdemo v zraku, vodi in v tleh. Rastline jih lahko privzamejo iz vseh, odvisno od rastnega okolja. Da lahko rastlina privzame neko kovino, mora biti kovina razpoložljiva v pravem kemičnem stanju. V vodi na razpoložljivost kovin vodnim rastlinam vplivajo različni okoljski dejavniki: kemijske lastnosti kovine, pH, prisotnost drugih kovin in anionov, temperatura, slanost, intenziteta svetlobe, nivo kisika, redoks potencial, organske spojine in drugo (Greger, 1999).

Pojav neke kovine v okolju je lahko posledica naravnih procesov (kovino vsebuje matična kamnina, minerali v kamnih) ali pa antropogenih dejavnosti (avtomobilska, tekstilna, jeklena, vojaška, kemična industrija – npr. izdelovanje baterij, rudarstvo, kmetijstvo z uporabo pesticidov, herbicidov in gnojil) (Saxena in sod., 1999). Čeprav organizmi nekatere kovine v majhnih količinah potrebujejo za normalno delovanje fizioloških procesov, je večja akumulacija kovin v tkivih za večino toksična. Zato je remediacija okolja zelo pomembna.

Ambrožič-Dolinšek (2007) ugotavlja, da so rastline za preživetje v okolju, obremenjenem s strupenimi snovmi, razvile različne strategije in se na njihovo prisotnost odzivajo na več načinov. Nekatere lahko samo prenašajo (tolerirajo) visoke koncentracije toksinov v okolju. Vendar preživijo. Druge pa so sposobne kopiranja velikih količin težkih kovin in jih imenujemo hiperakumulatorji. Te rastline akumulirajo vsaj 100 mg/kg suhe mase (0,01 %) kadmija in kroma, 1000 mg/kg suhe mase (0,1 %) kobalta, bakra, niklja in svinca ter 10.000 mg/kg (1 %) suhe mase magnezija in cinka. Pogosto so zato strupene, lahko tudi spremenjenega okusa, zato se jih rastlinojedci izogibajo, odvračajo pa tudi povzročitelje bolezni. Tako imajo te rastline na onesnaženih območjih selekcijsko prednost pred drugimi vrstami. V praksi te rastline sadijo oziroma sejejo v onesnažena tla ali jih gojijo v odpadnih vodah. Kopiranje kovine lahko poteka v vseh delih rastline, samo v nadzemnih delih ali samo v koreninah.

Hiperakumulatorji so torej rastline, ki so sposobne kopiti težke kovine tudi 100-krat več kot v normalnih razmerah, pri tem pa ne kažejo fitotoksičnih znakov. Predstavnike najdemo v različnih rastlinskih družinah. Pogosti so v družini križnic (*Brassicaceae*), predvsem v rodovih *Alyssum*, *Brasica* in *Thlaspi*. V vodnem okolju pa so dobro znane praprotnica *Salvinia molesta* (vrsta plavčka), med kritosemenkami pa *Eichhornia crassipes* (vodna hijacinta), *Polygonum amphibium* (vodna dresen) in *Lemna minor* (mala vodna leča) (Saxena in sod., 1999, Wang in sod., 2002, Ambrožič-Dolinšek, 2007).

Razstrupljanje okolja s pomočjo rastlin ali fitoremediacija je najbolj obetajoč način reševanja posledic onesnaževanja s toksičnim kovinami. Ambrožič-Dolinšek (2007) meni, da je to energetsko zelo varčna metoda, saj izkorišča sončno energijo in hkrati najmanj obremenjuje okolje. Primerna je za odpravljanje posledic onesnaževanja na mestu onesnaženja, za čiščenje večjih površin in je najcenejša. Nekatere kovinske ione, pridobljene s fitoremediacijo, je mogoče ponovno uporabiti – reciklirati. Ima pa tudi omejitve. Ni primerna za močno onesnažena okolja in poteka razmeroma počasi.

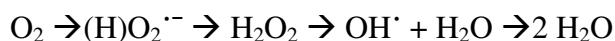
## 2.2 OKSIDATIVNI STRES

Odkar se je v evoluciji organizmov pojavila aerobna presnova, se je pojavila potreba po antioksidantih, ker je prišlo do večje izpostavljenosti prostim radikalom, ki v organizmih nastajajo iz kisika (Scandalios, 2002). Mittler (2002) tako ugotavlja, da so reaktivne kisikove spojine ves čas prisotne v vseh aerobnih celicah, vendar v ravnotežju z antioksidanti. V normalnih razmerah je produkcija ROS v celicah nizka. Stres pa zmoti celično homeostazo, kar povzroči pospešeno nastajanje ROS. Najpogosteje ravno presežek ROS poruši kritično ravnotežje med oksidanti in antioksidanti. Pojavi se oksidativni stres. Povzroči pa ga lahko tudi slabša antioksidativna obramba ali kar oboje.

### **2.2.1 REAKTIVNE KISIKOVE SPOJINE (ROS)**

Reaktivne kisikove spojine so stranski produkti normalnega celičnega metabolizma. Nastajajo v kloroplastih med fotosintezo, v mitohondriih med dihanjem, v mikrotelescih, npr. v peroksisomih med fotorespiracijo. Stresni pogoji, kot so suša, vročina, mraz, visoka intenziteta svetlobe, UV sevanje, zračna onesnažila, težke kovine, pa lahko povzročijo povečano nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (Dat in sod., 2000).

Med redukcijo kisika v vodo se tvori energija, ki omogoča kompleksnost višjih organizmov. Dat in sod. (2000) pa ugotavlja, da ta redukcija žal prinaša tudi pasti. Če je nepopolna, so ROS lahko zelo reaktivni in lahko oksidirajo biološke molekule. Redukcija molekularnega kisika poteka v štirih fazah, med katerimi nastane več različnih reaktivnih kisikovih zvrsti.



Med najpomembnejše kisikove zvrsti sodijo hidroksidni ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) in hidroperoksidni radikal ( $\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$ ), superoksidni anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ozon ( $\text{O}_3$ ),... Njihova značilnost je, da izredno hitro reagirajo z drugimi spojinami, in sicer tako, da poskušajo odvzeti elektron, ki ga potrebujejo za stabilnost. Ko določeni spojini, ki ni radikal, odvzamejo elektron, ta sama postane radikal. Sproži se verižna reakcija. Reagirajo lahko tudi s celičnimi komponentami, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline, beljakovine, nukleinske kisline in ogljikove hidrate. Zato te reakcije lahko vodijo do poškodb celice. Dramatično upade rast in produktivnost rastline. Če njihovega škodljivega vpliva rastlina ne zaustavi, sledi smrt (Hegedüs in sod., 2001).

Vendar pa dandanes vedno več avtorjev poudarja (Scandalios, 2002, Dat in sod., 2000), da ROS v organizmih niso le škodljivi metabolni produkti. Če so dobro nadzorovani, imajo lahko zelo pomembne funkcije v celici. Nekateri so medcelične signalne molekule, imajo vlogo pri strukturi celične stene in vplivajo na scenescenco. Kot signalne molekule lahko aktivirajo obrambne odzive na biotski in abiotiski stres. Pri napadu patogenov lahko omejijo širitev okužbe z ojačanjem celičnih sten in/ali z neposrednim delovanjem na

patogene organizme. Ker imajo torej ROS v celicah dvojno vlogo, je še toliko bolj pomembna natančna regulacija njihovega nivoja v celicah s pomočjo antioksidantov.

## 2.3 ANTIOKSIDANTI

Scandalios (2002) pravi, da se rastline izognejo oksidativnim poškodbam z razvojem kompleksnega antioksidativnega obrambnega sistema, ki je sestavljen iz neencimskih in encimskih antioksidantov:

- A. Neencimski antioksidanti:** askorbat (vitamin C), reducirani glutation (GSH),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), karotenoidi, flavonoidi,...
- B. Encimski antioksidanti:** superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaze (med njimi askorbat peroksidaza (A-POD) in guaiakol peroksidaza (G-POD)), glutation reduktaza (GR),...

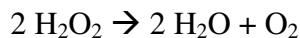
V tej diplomski nalogi smo se osredotočili predvsem na encime, ki sodelujejo v antioksidativni obrambi.

Zaradi reaktivne narave so ROS potencialno škodljivi vsem celičnim komponentam. Kot je razvidno iz enačbe (2.2.1), se molekularni kisik najprej pretvori v superoksidni anion ( $O_2^{\cdot-}$ ). Ker je ta radikal močno reaktiv, ga aerobni organizmi pretvorijo v manj reaktivno obliko, v superokside in  $H_2O_2$ . Tu pa na vrsto pride **superoksid dismutaza**, ki igra pomembno vlogo v antioksidativnem sistemu. Regulira celično koncentracijo  $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O_2$  tako, da prvega pretvori v drugega. Prisotna je v citosolu, peroksisomih in plastidih.



Vodikov peroksid nato odstranijo katalaze in peroksidaze. **Katalaze (CAT)** so v peroksisomih, glikoksisomih in mitohondrijih. Prestrežejo večino  $H_2O_2$ , ki nastane med

respiracijo in fotorespiracijo, še preden ta difundira v druge dele celice, ter ga pretvorijo v vodo in molekularni kisik (Hegedüs in sod., 2001; Scandalios, 2002).



Hou in sod. (2007) **peroksidaze** uvrščajo med encime, ki so ključni za rast, razvoj in senescenco rastline. Vplivajo na sintezo etilena in lignina, razgradnjo hormona avksina in sodelujejo pri odpornosti na patogene organizme ter celjenju ran. Z lignifikacijo celične stene peroksidaze omejijo povečanje celic. Kaže, da je to pomemben mehanizem prilagoditve na stres in je lahko povezan z zmanjšanjem rasti (Smeets in sod., 2005). Peroksidaze tudi odstranjujejo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , le da na bolj specifičnih mestih kot katalaze, saj imajo v nasprotju s katalazami zanj višjo afiniteto in lahko lovijo manjše količine peroksid (Dat in sod., 2000). Za to reakcijo potrebuje encim različne substrate (donorje elektrona). **Askorbat peroksidaza (A-POD)**, ki potrebuje askorbat, je običajno v kloroplastih in citosolu (Hegedüs in sod., 2001); **guaiakol peroksidaza (G-POD)** pa je najpogosteje v celični steni.

Med antioksidativnimi encimi je tudi **glutation reduktaza (GR)**, ki z A-POD sodeluje v askorbat-glutationskem ciklu. Tu se preko serij reakcij odstranjuje  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Smeets in sod., 2005).

Pojav stresa povzroči aktivacijo antioksidativnih encimov, s čimer se rastlina zaščiti. Če pa je stres predolg ali premočan, preobremeniti obrambo, ki začne slabeti. To lahko vodi v smrt rastline (Teisseire in Guy, 2000).

## 2.4 KADMIJ

Rastline za rast in razvoj potrebujejo tudi nekatere kovine, kot so Cu, Fe, Mg, Zn, v obliki esencielnih mikronutrientov. Kljub temu da so te kovine nujno potrebne za nemoteno celično presnovo, so v visokih, nefizioloških koncentracijah povzročitelji stresa. V okolju so poleg esencielnih kovin prisotne tudi neesencielne toksične kovine, ki na rastline

delujejo le stresno. Primer je kadmij, za katerega še ni znana nobena fiziološka vloga v živih organizmih (Hagemeyer, 1999).

Kadmij je zelo nevarno onesnažilo predvsem zaradi njegove visoke strupenosti in topljivosti v vodi. Čeprav vloga Cd v rastlinah še ni dokončno pojasnjena, vemo, da ga rastline privzemajo in transportirajo, čeprav velja za eno najbolj strupenih kovin. S transportom v nadzemne dele postane nevaren tako herbivorom kot ljudem. Pri zelo nizkih koncentracijah nima večjega vpliva na rastlino, pri višjih pa inhibira rast celotne rastline, rast korenin, delitev celic, encimsko aktivnost, ovira celično proliferacijo, respiracijo, povzroči kloroze in nekroze ter s tem zniža fotosintetsko aktivnost (Wusheng in sod., 2001). Med posredne vplive Cd v rastlinskih tkivih štejemo inducirani vodni stres, pomanjkanje Fe, Mg in Ca, zapiranje listnih rež in s tem pomanjkanje CO<sub>2</sub> (Hagemeyer, 1999). Inhibicija rasti je rezultat vpliva Cd tako na celične delitve (vpliv na upočasnjen metabolism, direktna vezava na DNA in lom mikrotubulskega sistema) kot na podaljševanje celic (zmanjšana plastičnost celične stene). Cd naj bi povzročal tudi predčasno senescenco (Smeets in sod., 2005).

Kadmij je v rekah, jezerih in mlakah navadno prisoten v nizkih koncentracijah (Bennet-Chambers in sod., 1999). Vse večjo težavo predstavlja njegovo kopiranje v vodnih ekosistemih, k čemur veliko prispevata industrija (proizvodnja stabilizatorjev, pigmentov, primarnih in sekundarnih baterij) in kmetijstvo (fosfatna gnojila). V Evropski Uniji so najvišjo dovoljeno količino Cd v ekosistemih zakonsko določili (UL ES, L291/1) in je v Sloveniji določena z Uredbo o kemijskem stanju površinskih voda (UL RS 11/2002):

- Celotna koncentracija kadmija (raztopljeni in neraztopljeni kadmij) v celinskih površinskih vodah, na katere vplivajo izpusti, ne sme presegati 5 µg/l.
- V primeru ostalih celinskih površinskih voda (vode, na katere ne vplivajo izpusti), celotna koncentracija kadmija (raztopljeni in neraztopljeni kadmij) ne sme presegati 1 µg/l.

## 2.5 MALA VODNA LEČA (*Lemna minor* L.)

Mala vodna leča je uvrščena v družino vodorečevk (*Lemnaceae*), ki je v Sloveniji zastopana s tremi rodovi: vodna leča (*Lemna*), žabja leča (*Spirodela*) in vodna lečica (*Wolffia*) (slika 1) (Martinčič in sod., 1999). Dobro znan je tudi rod *Wolffiella* z najmanjšo znano kritosemenko.



**Slika 1. *Lemnaceae***

Največje vodorečevke sodijo v rod *Spirodela* (S), srednje v rod *Lemna* (L) in najmanjše v rod *Wolffia* (W). Skala na vrhu slike je v milimetrih.

(<http://www.botany.hawaii.edu/FACULTY/CARR/lemn.htm>)

Mala vodna leča uspeva predvsem na površini stoječih ali počasi tekočih vodah. Je 2 do 4 mm velika enokaličnica. Pravi listi so popolnoma zakrneli. Listom podobne tvorbe so stebelni členki, ki so sploščeni, kroglaste do eliptične oblike, posamični ali sestavljeni iz 2-5 členkov (kolonija) (slika 2B). Vsak členek ima eno ali več enostavnih kratkih koreninic, 3 žile in zmerno razvit aerenhim (z zrakom bogasto gobasto tkivo), ki omogoča plavanje na vodni površini. V naših podnebnih razmerah se mala vodna leča razmnožuje vegetativno z ločitvijo posameznih členkov, na katerih v brstnem mešičku požene nov stebelni členek. Rastlina prezimi v obliki zimskih brstov na zamuljenem dnu stoječih voda. Cveti samo v toplejših območjih. Cvetovi so enospolni, enodomni, brez cvetnega odevala, z enim prašnikom oz. enim pestičem in nameščeni na zgornji strani stebelnega členka v vrečasti vdolbinici (Martinčič in sod., 1999).



## Slika 2. Mala vodna leča

A (levo): pokritost vodne gladine s kolonijami vodne leče. (<http://www.proteus.si/?q=node/50>)

B (desno): tri kolonije vodne leče.

V zadnjih letih so raziskovalci ugotovili, da več potopljenih, plavajočih in prosto plavajočih vodnih makrofitov, vključno z mala vodno lečo, lahko kopiči težke kovine tako iz naravnih kot odpadnih voda (Greger, 1999). Poleg odstranjevanja kadmija bi jo lahko uporabili za odstranjevanje fosfatov in nitratov (Cheng in sod., 2002), bakra, cinka, kroma, selena in svinca (Dirilgen in Inel, 1994, Dirilgen, 1998, Zayed in sod., 1998, Mukherjee in sod., 2004, Horvat in sod., 2007, Hou in sod. 2007, Razinger in sod. 2007).

Nekateri raziskovalci so za odstranjevanje težkih kovin iz vode uporabili tudi odmrl rastlinski material male vodne leče (Saygideger in sod., 2005, Oportoa in sod., 2006). Vendar pa Axtell in sod. (2003) ugotavljajo, da je boljša uporaba žive biomase, saj žive rastline z rastjo generirajo novo biomaso, s čimer se pojavi sekundarni odstranitveni mehanizmi. Žive rastline so lahko odstranile in akumulirale tudi 50- do 1000-krat višje koncentracije kovine iz onesnažene vode v primerjavi z odmrlim rastlinskim materialom.

Zaradi svoje relativno preproste zgradbe, majhnosti, hitre rasti, vegetativnega razmnoževanja in sposobnosti kopičenja kovin, se mala vodna leča pogosto uporablja v različnih terenskih in laboratorijskih ekotoksikoloških raziskavah (Smith, Kwan, 1989).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE**

Poskuse izpostavite male vodne leče (*Lemna minor* L.) kadmiju smo izvedli na Inštitutu za fizikalno biologijo, meritve antioksidantov in privzema kadmija pa na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete na Katedrah za botaniko, za fiziologijo rastlin in za zoologijo.

Malo vodno lečo so predhodno nabrali v lokalnem potoku in gojili v nadzorovanih razmerah, kot je opisano v članku Razingerja in sod. (2007). Rastline so pred prestavitvijo v rastno komoro 30 sekund splakovali z 0,01 M NaOCl, s čimer so preprečili rast alg. Založno kulturo vzdržujejo v 3-litrskih plastičnih posodah s Steinbergovim rastnim gojiščem, pri  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  pod hladno belo fluorescentno svetlobo ( $160 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR), s ciklom svetlobe/teme v razmerju 18h/6h. Rastno gojišče zamenjajo vsakih 7 dni.

#### **3.2 SEDEM DNEVNI TEST ISO/CD 20079 (2001)**

Test ISO/CD 20079 je zasnovan za merjenje odziva male vodne leče na različne, v vodi raztopljene snovi, vključno s kadmijem. S to metodo smo ugotavljali učinek različnih koncentracij kadmija na rastlino, z rezultati pa smo kasneje lahko določili testne koncentracije kadmija. Pri testu smo opazovali inhibicijo rasti, pri čemer je bil glavni meritni parameter število členkov. Po normativih testa smo dodatno opazovali velikost členkov, dolžino in stanje korenin, kloroze in nekroze, stanje kolonij, spremembe v gojišču in prisotnost alg. Za referenčno snov smo po določilih ISO testa uporabili 3,5-diklorofenolno raztopino (DKF). Za določanje vrednosti EC<sub>50</sub> je moral biti vsak vzorec ali razredčitev pripravljena v vsaj treh paralelkah, kontrola pa v šestih paralelkah. Med testnimi posodami se pH ni smel razlikovati za več kot 0,2.

### 3.2.1 PRIPRAVA VZORCEV

Za testne posodice smo uporabili 100 ml kristalizirke, ki smo jih pokrili s plastičnimi petrijevkami premera 9 cm. Najprej smo 10–kratno koncentrirano Steinbergovo gojišče (pripravljen po ISO standardih – tabela 1) razredčili s 45 ml dH<sub>2</sub>O, dodali lečo in na koncu DKF oz. CdCl<sub>2</sub>. Tako smo zagotovili, da so bile vse rastline približno sočasno izpostavljene toksičnim spojinam. Kristalizirke smo nato položili na črn papir v rastno komoro.

**Tabela 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079)**

<i>Mikroelementi</i>	<i>mg/l</i>
KNO <sub>3</sub>	350,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	295,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	90,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12,60
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	100,00
<i>Makroelementi</i>	<i>µg/l</i>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120,00
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	180,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	44,00
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	180,00
FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	760,00
EDTA	1500,00

#### 3.2.1.1 DIKLOROFENOL (DKF)

Za DKF smo izbrali koncentracije 0,75, 1,5, 3 in 6 mg/l. Po ISO standardu mora biti EC<sub>50</sub> med 1,8 in 3,6 mg/l. Potrebovali smo 12 kristalizirk. 5 ml Steinbergovega gojišča smo razredčili s 45 ml dH<sub>2</sub>O, dodali 7 členkov *L. minor* in nazadnje še DKF (tabela 2). V vsaki kristalizirki je bil končni volumen približno 50 ml. Vse mešanice smo dobro premešali.

**Tabela 2: Uporabljen razredčitvena vrsta za DKF**

<b>DKF (mg/l)</b>	<b>dH<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>Steinbergovo gojišče (ml)</b>	<b>DKF 1g/l (µl)</b>	<b>število členkov <i>L. minor</i></b>
0,75	45	5	37,5	7
1,5	45	5	75	7
3	45	5	150	7
6	45	5	300	7

Za vsako koncentracijo smo pripravili 3 ponovitve.

### 3.2.1.2 KADMIJ

Za testne koncentracije Cd smo izbrali 0,1, 1, 10, 100, 1000 µM CdCl<sub>2</sub>. Pripravili smo založno raztopino 10 mM CdCl<sub>2</sub> x dH<sub>2</sub>O, tako da smo morali izračunati količino, ki smo jo ustrezno redčili do končnega volumna 50 ml. Pri pripravi 1000 µM CdCl<sub>2</sub> smo Steinbergovo gojišče razredčili s 40 ml dH<sub>2</sub>O, saj smo dodali 5 ml 10 mM CdCl<sub>2</sub> x dH<sub>2</sub>O. Pri ostalih pa smo dodano količino CdCl<sub>2</sub> x dH<sub>2</sub>O zanemarili in 5 ml Steinbergovega gojišča razredčili s 45 ml dH<sub>2</sub>O. V kristalizirke smo nato dodali sedem členkov in čisto nazadnje še CdCl<sub>2</sub>. Za vsako koncentracijo smo pripravili tri ponovitve (tabela 3).

Pripravili smo tudi 6 kontrolnih ponovitev brez CdCl<sub>2</sub> oziroma DKF. 5 ml Steinbergovega gojišča smo razredčili s 45 ml dH<sub>2</sub>O in dodali sedem členkov.

**Tabela 3: Uporabljen razredčitvena vrsta za CdCl<sub>2</sub>**

<b>Cd (µM)</b>	<b>dH<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>Steinbergovo gojišče (ml)</b>	<b>10 mM CdCl<sub>2</sub> (µl)</b>	<b>število členkov <i>L. minor</i></b>
0,1	45	5	0,5	7
1	45	5	5	7
10	45	5	50	7
100	45	5	500	7
1000	40	5	5000	7

### **3.2.1.3 PRENOS KOLONIJ V KRISTALIZIRKE IN EPRUVETE**

Kolonije smo najprej prenesli iz založne kulture v plastično posodo napolnjeno z vodovodno vodo. Od tu smo jih prenesli v kristalizirke s pinceto z gladko prijemalno površino, da nismo poškodovali rastlin. Pomembno je bilo, da smo kolonije prenašali še pred dodatkom toksičnih substanc, da se pinceta pri prenašanju ni kontaminirala.

Da smo zagotovili primerljivo kakovost členkov v vseh 33 posodicah, smo v vsako najprej dali po eno kolonijo (dva, tri, štiri ali pet členkov), nato pa dodali le še toliko členkov, da smo dobili število sedem. Če bi vsako kristalizirko takoj zapolnili s sedmimi členki, bi imele prve posode morfološko boljše členke, zadnje pa slabše.

Založna kultura je bila v dobrem stanju. Barva členkov je bila temnozelena, velikost večine členkov 5 - 6 mm in dolžina korenin med 3 in 6 cm. Opaznih je bilo le okrog 2 % kloroz in nekroz, ki so se verjetno pojavile zaradi starosti členkov. Prisotnih je bilo tudi nekaj alg.

### **3.2.2 RASTNA KOMORA**

Rastline smo gojili v rastni komori, sedem dni pod hladno fluorescentno svetlobo ( $160 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR) pri  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , s ciklom svetlobe/teme v razmerju 18h/6h. Vzorce smo na črno podlago naključno porazdelili v tri vrste, saj svetloba ni bila na vseh delih komore enaka.

### **3.2.3 ŠTETJE IN OPAZOVANJE ČLENKOV**

Po sedmih dneh (168 ur) smo prešteli vse s prostim očesom vidne členke in si zapisali morfološke lastnosti malih vodnih leč v posamezni testni posodi. Opazovali smo (po ISO/CD 20079):

- a) členke (barva, velikost),
- b) kolonije (število členkov na kolonijo),
- c) kloroze ali nekroze (lokalno ali v celi koloniji),

- d) korenine (prisotnost, dolžina),
- e) izguba plovnosti, razdelitev kolonije,
- f) spremembe v testnem gojišču, okužbe z bakterijami in algami.

Za opazovanje smo postavili vzorčne posodice na belo podlago. Če je več kot 50 % členkov spremenilo barvo, jih je bilo potrebno šteti posebej.

### **3.3 IZPOSTAVITEV RASTLIN RAZLIČNIM KONCENTRACIJAM KADMIJA**

Malo vodno lečo smo za 24 ur izpostavili šestim koncentracijam kadmija (0,1, 1, 10, 50, 100 in 500  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ) v rastnem gojišču. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili menadion, kot negativno pa gojišče brez kadmija. V izpostavljenih rastlinah smo izmerili specifično aktivnost izbranih antioksidativnih encimov in količino privzetega kadmija.

Založno raztopino 10 mM  $\text{CdCl}_2$  smo pripravili z raztopljanjem 201 mg  $\text{CdCl}_2$  v 100 ml ddH<sub>2</sub>O.

3 l rastnega gojišča z raztopino EDTA smo pripravili kot je opisano v tabeli 1:

1 l ddH <sub>2</sub> O	+ 1 ml EDTA
	+ 1 ml $\text{FeCl}_3$
	+ 1 ml mikronutrienti
	+ 3 x 3 x 20 ml makronutrienti (3 različne mešanice, 20 ml vsake na 1 l, torej 3 x 60 ml)
	+ 1 l ddH <sub>2</sub> O
	<u>+ 810 ml ddH<sub>2</sub>O</u>
	≈ 3 l gojišča

Vsako od testnih raztopin smo pripravili v štirih paralelkah. Tako smo potrebovali predhodno ustrezno označenih 32 kristalizirk. V vsako smo najprej dali 100 ml rastnega

gojišča, dodali izračunan volumen 10 mM CdCl<sub>2</sub> in s pipeto dobro premešali. Na koncu smo dodali 400 mg predhodno na papirnati brisači osušenih svežih členkov *Lemna minor*, saj smo potrebovali 100 mg rastlinskega materiala za merjenje encimske aktivnosti in 300 mg za merjenje tkivne koncentracije Cd. Pri pozitivni kontroli menadionu smo uporabili manjše, 50 ml kristalizirke, saj smo izpostavljen rastlinski material potrebovali le za merjenje encimov. Zato smo tu dodali le 50 ml gojišča na vzorec in 250 mg rastlinskega materiala. Priprava posameznih serij je opisana v tabeli 4.

Preden smo dodali rastlinski material, smo iz 5. in 7. serije (50 in 500 µM CdCl<sub>2</sub>) odvzeli 5 ml gojišča. V teh vzorcih smo kasneje izmerili in preverili koncentracije Cd v gojišču. Enako smo naredili za kontrolo rastnega gojišča kulture, iz katere smo dobili testne rastline.

Posamezno serijo (4 kristalizirke) smo pripravili v 30 minutnem razmaku in jih v enakem časovnem zamiku postavili v rastno komoro. To je bilo pomembno predvsem zaradi nadaljnje priprave materiala za encimske teste. Kristalizirke so bile v rastni komori razporejene zaporedno v štirih vrstah, vsaka serija je imela svojo vrsto. Za tako postavitev smo se odločili predvsem zaradi razporeditve svetlobe. Ta ni bila povsod enaka in če bi vzorce naključno porazdelili, bi lahko bila ena od serij bolje ali slabše osvetljena. Ker so bile žarnice bolj na sredini, sta bili tako najbolje osvetljeni druga in tretja vrsta, prva in četrta pa malce slabše. Vendar je to veljalo pri vseh serijah. Izpostavitev je trajala 24 ur.

Založna kultura *L. minor*, iz katere smo uporabili testne rastline, je imela kar nekaj alg, malo je bilo tudi temnozelenih členkov. Kultura je bila v dobrem fiziološkem stanju, večina rastlin je bilo zelenih in zdravih, posamezne kolonije so sestavljali 3 – 4 členki, ki so bili veliki vsaj 4 mm. Prisotnih je bilo nekaj kloroz (5 %), ter nekroz (3 % - verjetno končan življenjski cikel), dolžina korenin pa je dosegala tudi 5 cm.

Poskus smo naredili v treh neodvisnih ponovitvah, zato smo tudi vsa nadaljnja merjenja opravili trikrat (trije različni kompleti vzorcev).

**Tabela 4: Izpostavitev *L. minor* različnim koncentracijam Cd**

Vsako od testnih raztopin smo pripravili v štirih paralelkah. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili menadion, kot negativno pa gojišče brez kadmija.

	Koncentracija CdCl <sub>2</sub> (µM)							50 µM menadion
	0	0,1	1	10	50	100	500	
Cd (mg/l)	0	0,0048	0,048	0,48	2,4	4,8	24	/
10 mM CdCl <sub>2</sub> (µl)	0	1	10	100	500	1000	5000	50*
gojišče (ml)	100	100	100	100	100	100	100	50
<i>L. minor</i> (mg)	400	400	400	400	400	400	400	250

\* = µl 50 µM menadiona

## 3.4 TKIVNA KONCENTRACIJA KADMIJA V RASTLINAH IN RASTNEM GOJIŠČU

### 3.4.1 PRIPRAVA STEKLOVINE ZA MERJENJE KOVIN

Vso steklovino, ki smo jo uporabljali za merjenje kovin, smo temeljito oprali in posušili. Suho smo nato namočili v 0,2 % HNO<sub>3</sub> za 48 ur. Po tem smo steklovino dvakrat sprali z dH<sub>2</sub>O in dvakrat z ddH<sub>2</sub>O, ter jo posušili. To smo storili tudi po poskusu, saj lahko nekaj kovine ostane na steklovini.

### 3.4.2 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

Po 24 urni izpostavitvi kadmiju smo vsakih 30 minut iz rastne komore vzeli eno serijo. Najprej smo stehtali 100 mg na papirnati brisači osušenega materiala za merjenje encimov, preostanek (250 – 300 mg) pa smo pripravili za merjenje tkivne koncentracije kadmija. Pri tem smo uporabljali zaščitne rokavice in pinceto. Material za tkivne koncentracije kadmija smo najprej sprali z destilirano vodo, osušili na papirnati brisači, nato pa ga zavili v alufolijo, primerno označeno z zaporednimi številkami. Shranili smo ga v hladilniku.

Rastlinski material smo nato posušili v liofilizerju, sledilo pa je natančno tehtanje suhe mase posameznega vzorca. Po tehtanju smo vsak testni vzorec suhih rastlin pretresli v označene epruvete.

V vsako epruveto z znano količino rastlinskega materiala smo odpipetirali po 1 ml 65 %  $\text{HNO}_3$  in koncentrirane  $\text{HClO}_4$  (obe ultračisti) v volumskem razmerju 7:1. Tako pripravljene epruvete smo postavili v digestorij za 24 ur, da se je rastlinski material pri sobni temperaturi dodobra prepojil z mešanicu kislin.

### 3.4.3 RAZKLOP

Po 24 urah predrazklopa smo epruvete dali v termoblok v digestoriju. Občasno smo jih premešali, da smo rastlinski material, ki se je prilepil na steno epruvete, sprali v raztopino. Segrevali smo po postopku, prikazanem v tabeli 5.

**Tabela 5: Temperaturni in časovni režim razklopa rastlinskih vzorcev**

<b>Čas (min)</b>	<b><math>T</math> (°C)</b>
30	40
30	65
60	85
60	105
60	125
60	145
60	165
60	185
do suhega	225

### 3.4.4 MERITEV Cd Z ATOMSKIM SPEKTROFOTOMETROM

Po razklopu smo v vsako epruveto dodali 2 ml 5 %  $\text{HNO}_3$  in dobro premešali. Vsebnosti smo določili s plamenskim atomskim absorpcijskim spektrofotometrom (AAnalyst 100 Atomic Absorption Spectrophotometer, Perkin Elmer Instruments). Najprej smo izmerili umeritveno krivuljo s pomočjo že pripravljenih standardnih koncentracij  $\text{CdCl}_2$ . Nato smo

v program vpisali suho maso vsakega vzorca in izmerili koncentracije kadmija v teh vzorcih. Med posameznimi meritvami smo merilne cevke spirali s  $\text{HNO}_3$  in  $\text{dH}_2\text{O}$ . Program je nato sam preračunal vsebnost kovine v rastlinskem materialu vzorca (mg/g suhe mase).

Za kontrolo rastnih gojišč, smo izmerili tudi koncentracijo Cd v rastnih gojiščih s  $50 \mu\text{M}$  in  $500 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , ter v osnovnem rastnem gojišču.

### **3.5 VSEBNOST PROTEINOV V VZORCIH**

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določili z BCA kompletom za določanje koncentracije proteinov (BCA Protein Assay Kit, Pierce, ZDA).

- a) Za pripravo umeritvene standardne krivulje smo uporabili albumin govejega seruma v koncentracijah 0,5, 1, 1,5, 2 mg/ml, vsako v treh ponovitvah, kar pomeni skupaj s kontrolo 15 pripravljenih kivet. V razmerju 1:50 smo zamešali reagenta A in B. V kiveto smo nato odpipetirali 1 ml reagenta, dodali  $\text{dH}_2\text{O}$  in goveji serumski albumin, v količinah zapisanih v tabeli 6. Tako smo dobili želene koncentracije standarda. Pripravljene raztopine smo dobro premešali in jih inkubirali 30 min pri  $37^\circ\text{C}$ . Nato smo s spektrofotometrom (Hewlett-Packard 8452A diode array) pri valovni dolžini 562 nm izmerili absorpcijo testne mešanice. S pomočjo teh meritev smo lahko oblikovali umeritveno krivuljo. Paziti smo morali na čas, saj je moralo biti merjenje s spektrofotometrom opravljeno v 10 minutah po inkubaciji.

Poskus smo opravili dvakrat. Prvo dobljeno krivuljo smo uporabili za izračun vsebnosti proteinov v rastlinskih vzorcih iz prvega poskusa izpostavitve, drugo krivuljo pa pri vzorcih drugega in tretjega poskusa izpostavitve.

- b) Sledilo je merjenje vsebnosti proteinov v rastlinskih vzorcih. Mešanico reagentov smo imeli že pripravljeno. V vsako kiveto smo dali 1 ml reagenta (mešanica reagentov A:B = 1:50) in 50  $\mu\text{l}$  vzorca. Vsebino kivet smo dobro premešali in jih inkubirali 30 min pri  $37^\circ\text{C}$ . Nato smo s spektrofotometrom

izmerili absorpcijo pri valovni dolžini 562 nm. Tudi tu smo morali inkubirane vzorčke pomeriti v 10 minutah po inkubaciji.

S pomočjo umeritvene krivulje (a) smo iz dobljene absorpcije vzorca (b) izračunali količino proteinov v tem vzorcu. Ta podatek smo potrebovali pri izračunu specifične encimske aktivnosti posameznega encima, ki je definirana kot količina encima glede na količino vseh proteinov v vzorcu. (Tako smo dobljeno EA CAT za vsak vzorek, izračunano po formuli, zapisani v 3.6.3.1, delili s količino proteinov v tem vzorcu in dobili specifično encimsko aktivnost (SEA) CAT tega vzorca. Enako smo izračunali tudi SEA drugih encimov.)

**Tabela 6: Uporabljen razredčitvena vrsta za albumin**

<i>konz. standarda (mg/ml)</i>	<i>reagent A+B (ml)</i>	<i>albumin (µl)</i>	<i>dH<sub>2</sub>O (µl)</i>
0	1	0	50
0,5	1	6,25	43,75
1	1	12,5	37,5
1,5	1	25	25
2	1	50	0

### 3.6 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

Za vsak encim smo opravili tri neodvisne meritve. Med vsakim merjenjem smo merili tudi encimsko aktivnost testne mešanice brez vzorca in s tem kontrolirali kvaliteto meritev. (Namesto vzorca smo dodali toliko več pufra. Tako smo zagotovo vedeli, da se brez vzorca v mešanici nič ne dogaja.)

### **3.6.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA**

Po 24 urni izpostavitevi  $\text{CdCl}_2$  smo na vsake 30 minut iz rastne komore vzeli eno serijo rastlinskih vzorcev. Za merjenje encimov smo potrebovali 100 mg sveže mase rastlinskega materiala. Členke leče smo osušili na papirnati brisači, jih nato v terilnici zalili s tekočim dušikom in strli. Sledila je homogenizacija v 1500  $\mu\text{l}$  K-PO<sub>4</sub> pufra pH 7,0 (c=100 mM, priprava glej 3.6.2). Homogeniziran vzorec smo takoj dali v epice in na led. Po centrifugiraju 10 min, 4 °C, 10 000 r.p.m. smo supernatant smo odpipetirali v nove primerno označene epice in jih do merjenja shranili v zamrzovalniku pri -80 °C (Razinger in sod., 2007).

### **3.6.2 PRIPRAVA KALIJ-FOSFATNEGA PUFRA (100 mM)**

Pufer smo pripravili iz predhodno pripravljenih raztopin A in B:

- **Raztopina A:** Zatehtali smo 8,71 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (M=174,2 g/mol) in sol raztopili v 500 ml bidestilirane vode.
- **Raztopina B:** Zatehtali smo 2,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (M=136 g/mol) in sol raztopili v 200 ml bidestilirane vode. (Te raztopine se porabi veliko manj, zato je tudi količina manjša.)

Raztopino **B** smo dodajali raztopini **A** do želenega pH. Merjenje pH je potekalo na pH-metru (inoLab pH 720).

Pufer smo po pripravi in vsakokratni uporabi avtoklavirali, hranili pa smo ga v hladilniku pri temperaturi do 4 °C.

### **3.6.3 ENCIMI**

#### **3.6.3.1 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI KATALAZE (CAT, EC 1.11.1.6)**

Encimsko aktivnost (EA) katalaze smo določili spektrofotometrično z merjenjem porabe  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri 240 nm. Uporabili smo tako UV-PVC za enkratno uporabo kot kvarčne kivete, ki morajo prepuščati UV svetlobo. Pred meritvami EA smo vse reagenčne raztopine segreli na 25 °C.

##### **a) Priprava reagenčnih raztopin**

###### **• 9 mM $\text{H}_2\text{O}_2$**

Raztopino smo pripravili dnevno svežo, vedno tik pred meritvami za 50 vzorcev. Odpipetirali smo 102 µl 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ga razredčili v 99,9 ml 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufru s pH 7,0 ter dobro premešali.

##### **b) Testna raztopina**

V kiveti, ki prepušča UV sevanje pri 240 nm, smo zmešali raztopine po naslednjem vrstnem redu:

1. 500 µl 100 mM K-PO<sub>4</sub>-EDTA pufra pH 7,0
2. 500 µl 9 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$
3. 50 µl vzorca

Tako je sledilo merjenje. Te količine smo potrebovali pri merjenju z UV-PVC kivetami. Pri merjenju s kvarčnimi kivetami pa smo količine podvojili zaradi večje prostornine kivet. Tako pufer kot  $\text{H}_2\text{O}_2$  je bilo potrebno segreti na 25 °C. Ker je  $\text{H}_2\text{O}_2$  občutljiv na svetlobo, smo stekleničko zavili v folijo. Zato je bila vsaka testna mešanica pripravljena posebej.

**c) Postopek meritve**

Test je temeljil na upadu absorpcije pri 240 nm, ki je bila posledica katalazne aktivnosti. Katalaza katalizira razpad  $2 \text{ H}_2\text{O}_2$  v  $2 \text{ H}_2\text{O}$  in  $\text{O}_2$ . Merjenje s spektrofotometrom se je začelo takoj po temeljitem mešanju testne raztopine. Aktivnost smo merili pri 240 nm dve minuti z odčitkom na 5 do 10 sekund. Nato smo določili najbolj linearni del dobljene krivulje in izračunali spremembo absorpcije v minuti. Žal ni bilo mogoče izbrati vedno istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno, saj aktivnost CAT v istem časovnem obdobju ni bila linearna pri vseh vzorcih. Iz dobljene vrednosti smo nato izračunali aktivnost CAT.

**d) Izračun encimske aktivnosti**

$$\Delta c = \frac{\Delta A/\text{min}}{\varepsilon * l}$$

$\Delta A$  = spremembra absorpcije

$l$  = debelina kivete = 1 cm

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficient  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri 240 nm =  $40/\text{mM}^*\text{cm}$

**3.6.3.2 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI ASKORBAT PEROKSIDAZNE (A-POD, EC 1.11.1.11)**

EA A-POD smo določili spektrofotometrično z merjenjem zmanjšanja absorpcije pri 290 nm, ki je bila posledica oksidacije askorbata. Uporabili smo UV-PVC kivete za enkratno uporabo. Pred meritvami encimske aktivnosti smo vse reagenčne raztopine segreli na 25 °C.

**a) Priprava reagenčnih raztopin**

**• 90 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Reagenčno mešanico peroksida smo pripravili tako, da smo zmešali 9,9 ml dd $\text{H}_2\text{O}$  in 102 µl 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 100 µl te raztopine smo dodali v kiveto, da je bila končna koncentracija

peroksida 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (za 100 vzorcev). Za vsako merjenje smo pripravili dnevno svežo raztopino.

- **10 mM askorbat**

198 mg Na–askorbata smo raztopili v 100 ml dH<sub>2</sub>O. Ker je občutljiv na svetlobo, smo stekleničko zavili v folijo in jo hranili v hladilniku. V kiveto smo dodali 50 µl te raztopine, tako da je bila končna koncentracija askorbata v testni raztopini 0,5 mM.

**b) Testna raztopina**

V kiveti, ki prepušča UV sevanje pri 240 nm smo zmešali raztopine po naslednjem vrstnem redu:

1. 800 µl 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufra pH 7,0
2. 50 µl 10 mM askorbata
3. 100 µl 90 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. 50 µl vzorca

S pipeto smo testno raztopino temeljito premešali. Pred meritvami je bilo pufer, askorbat in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> potrebno segreti na 25 °C. Ker je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> občutljiv na svetlobo, smo stekleničko zavili v folijo.

**c) Postopek meritev**

Test je temeljil na zmanjšanju absorpcije pri 290 nm, kot posledici oksidacije askorbata. Po enominutni inkubaciji je sledilo merjenje absorpcije s spektrofotometrom. Aktivnost smo merili pri 290 nm dve minuti z odčitkom na 5 do 10 sekund. Nato smo določili najbolj linearni del dobljene krivulje in izračunali spremembo absorpcije v minutih. Žal ni bilo mogoče izbrati vedno istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno, saj aktivnost A-POD v istem časovnem obdobju ni bila linearna pri vseh vzorcih. Iz dobljene vrednosti smo nato izračunali EA A-POD.

**d) Izračun encimske aktivnosti**

$$\Delta c = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon * l}$$

$\Delta A$  = sprememba absorpcije

$l$  = debelina kivete = 1 cm

$\epsilon$  = ekstinkcijski koeficient askorbata pri 290 nm = 2,8/mM\*cm

**3.6.3.3 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI GUAIAKOL PEROKSIDAZE (G-POD, EC 1.11.1.7)**

EA G-POD smo določili spektrofotometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 470 nm, kot posledice polimerizacije guaiakola v tetraguaiakol. Uporabili smo PVC kivete za enkratno uporabo. Pred meritvami encimske aktivnosti smo vse reagenčne raztopine segreli na 25 °C.

**a) Priprava reagenčnih raztopin**

• **90 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Reagenčno mešanico peroksida smo pripravili tako, da smo zmešali 9,9 ml ddH<sub>2</sub>O in 102 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. V kiveto smo dodali 100 µl te raztopine in tako je bila končna koncentracija 9 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (za 100 vzorcev). Za vsako merjenje smo pripravili dnevno svežo raztopino.

• **90 mM raztopina guaiakola**

100 ml guaiakola smo raztopili v 9,9 ml 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufra, pH 5,0. V kiveto smo dodali 100 µl reagenčne raztopine, tako da je bila končna koncentracija guaiakola v testni raztopini 9 mM (za 100 vzorcev).

**b) Testna raztopina**

V navadno PVC kiveto smo zamešali raztopine v naslednjem vrstnem redu:

1. 100 µl 90 mM raztopine guaiakola
2. 100 µl 90 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. 750 µl 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufra pH 5,0
4. 50 µl vzorca

Pri drugem in tretjem merjenju smo se odločili za manjšo količino vzorca: namesto 750 µl 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufra pH 5,0 smo dodali v testno raztopino 760 µl pufra in namesto 50 µl le 40 µl vzorca. S pipeto smo testno raztopino temeljito premešali. Pred merjenjem smo pufer in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> segreli na 25 °C. Ker je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> občutljiv na svetlobo, smo stekleničko zavili v folijo.

**c) Postopek meritev**

Test je temeljal na naraščanju absorpcije pri 470 nm, ki je bila posledica polimerizacije guaiakola v tetraguaiakol. Po enominutni inkubaciji smo spektrofotometrično izmerili absorpcijo. Aktivnost smo merili dve minutih z odčitavanjem na 5 do 10 sekund. Nato smo določili najbolj linearni del dobljene krivulje in izračunali spremembo absorpcije v minutih. Žal ni bilo mogoče izbrati vedno istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno, saj aktivnost G-POD v istem časovnem obdobju ni bila linearna pri vseh vzorcih. Iz dobljene vrednosti smo nato izračunali EA G-POD.

**d) Izračun aktivnosti**

$$\Delta c = \frac{\Delta A/min}{\epsilon * l}$$

ΔA = sprememba absorpcije

l = debelina kivete = 1 cm

ε = ekstinkcijski koeficient tetraguaiakola pri 470 nm = 26,6/mM\*cm

### **3.6.3.4 MERJENJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI GLUTATION REDUKTAZE (GR, EC 1.6.4.2)**

Encimsko aktivnost GR smo določili spektrofometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 412 nm, kot posledice redukcije DTNB (5,5-dithio-bis (2-nitrobenzojska kislina)) v TNB (2-nitro-5-thiobenzojsko kislino). Uporabili smo PVC kivete. Pred meritvami encimske aktivnosti smo vse reagenčne raztopine segreli na 25 °C.

#### **a) Priprava reagenčnih raztopin**

- **Založni pufer:** V 80 ml 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufra (pH 7,5) smo zamešali 151 mg Na-EDTA. Tako smo dobili 6,3 mM raztopino Na-EDTA.

**Dnevni pufer:** V 50 ml založnega pufra smo zamešali 12,5 mg NADPH in dobili 0,3 mM NADPH.

- **15 mM DTNB (5,5-dithio-bis (2-nitrobenzojska kislina)):** Zatehtali smo 0,060 g DTNB (M = 396,35 g/mol) in ga raztopili v 10 ml 100 mM K-PO<sub>4</sub> pufru (pH 7,5). Raztopino smo do merjenja hranili v hladilniku pri temperaturi do 4 °.

- **20 mM GSSG (oksidirani glutation):** Zatehtali smo 0,131 g GSSG (M = 656,6 g/mol) in ga raztopili v 10 ml bidestilirane H<sub>2</sub>O. To raztopino smo hranili v zamrzovalniku pri temperaturi – 20 °C.

#### **b) Testna raztopina**

V PVC kiveti smo zmešali raztopine po naslednjem vrstnem redu:

1. 850 µl dnevnega pufra
2. 50 µl 15 mM DTNB

Temu je sledila 10 do 15 minutna inkubacija pri 30 °C. Nato smo v testno raztopino dodali še:

3. 50 µl 20 mM GSSG
4. 50 µl vzorca

Reakcija se je začela takoj, ko smo dodali 50 µl vzorca. Testno raztopino smo temeljito premešali.

#### c) Postopek meritev

Test je temeljil na naraščanju absorpcije pri 412 nm zaradi redukcije DTNB v TNB. Takoj je sledilo merjenje absorpcije s spektrofotometrom. Aktivnost smo merili pri 412 nm 2 minuti z odčitkom na 5 do 10 sekund. Nato smo določili najbolj linearni del dobljene krivulje in izračunali spremembo absorpcije v minuti. Žal ni bilo mogoče izbrati vedno istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno, saj aktivnost GR v istem časovnem obdobju ni bila linearna pri vseh vzorcih. Iz dobljene vrednosti smo nato izračunali EA GR.

#### d) Izračun encimske aktivnosti

$$\Delta c = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon^* l}$$

$\Delta A$  = sprememba absorpcije

$l$  = debelina kivete = 1 cm

$\epsilon$  = ekstinkcijski koeficient TNB pri 412 nm = 13,6/mM\*cm

#### 3.6.4 MENADION

Za pozitivno kontrolo smo izbrali znani prožilec oksidativnega stresa, menadion. V 50 ml rastnega gojišča smo dodali 50 µl 50 µM menadiona in dodali le 250 g rastlinskega materiala. Rastlinski material, izpostavljen menadionu, smo uporabili le za merjenje encimov.

### **3.7 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV**

Vse eksperimente smo neodvisno ponovili trikrat. Število ponovitev je zapisano pri vsakem opisu grafa ali tabele. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost neodvisnih serij poskusov  $\pm$  standardna napaka (SN). Za statistično analizo podatkov smo uporabili računalniški program Microsoft Excel 2003.

## 4 REZULTATI

### 4.1 SEDEM DNEVNI TEST RASTI (ISO/CD 20079)

Po sedmih dneh izpostavitve *L. minor* različnim koncentracijam CdCl<sub>2</sub> smo ocenili stanje kulture (tabela 7). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili DKF.

#### 4.1.1 DIKLOROFENOL

Iz tabele 7 lahko vidimo, da je bila EC<sub>50</sub> pri 3 mg/l DKF, ker je bilo pri tej koncentraciji DKF število členkov pol manjše kot pri kontrolni raztopini brez DKF. Izmerjena EC<sub>50</sub> je bila torej med koncentracijama 1,8 in 3,6 mg/l DKF, kot jih določa ISO/CD 20079.

##### a) členki (barva, velikost)

Nizka koncentracija DKF (0,75 mg/l) je vzpodbudila rast male vodne leče za skoraj 13 % v primerjavi s kontrolo. Povprečno smo našteli 79 členkov, od tega jih je bilo 90 % zelene barve, torej zdravih. Opazili smo le 10 % rumenega tkiva. Izmerili smo tudi daljše dolžine členkov. Dvakrat višja koncentracija (1,5 mg/l DKF) pa je že povzročila zmanjšanje rasti in to se je z višanjem koncentracije DKF v rastnem gojišču le še stopnjevalo. Pri najvišji koncentraciji (6 mg/l) DKF smo prešteli povprečno le dvanajst členkov, kar v primerjavi s kontrolo pomeni 83 % upad rasti. Nekroze so se pojavile pri 3 mg/l DKF v rastnem gojišču, vendar pa je bila večina rastlin še zelene barve. To pa se popolnoma spremeni pri 6 mg/l DKF, kjer je bila večina členkov bela.

##### b) kolonije (število členkov na kolonijo)

V kontrolnih kristalizirkah smo lahko opazili kar velike kolonije, sestavljene iz vsaj štirih členkov. Do koncentracije 6 mg/l DKF so prevladovale kolonije s tremi členki, pri tej koncentraciji pa smo opazili le še posamezne členke. Kolonije so razpadle.

c) kloroze ali nekroze (lokalno ali v celi koloniji)

Prisotnost kloroz je bila podobna do koncentracije 1,5 mg/l DKF, okrog 10 %. Pri naslednji koncentraciji (3 mg/l DKF) pa smo že opazili nekaj več kloroz (15 %) in nekroze (5%), prisotnost nekroz pa se je močno povečalo pri 6 mg/l DKF.

d) korenine (prisotnost, dolžina)

Korenine so bile pri kontrolnih rastlinah *L. minor* dolge tudi do 6 cm. Krajše so bile le pri mladih rastlinah. Rast korenin se je opazneje zmanjšala pri 3 mg/l DKF, med tem ko so pri najvišji koncentraciji vse korenine odpadle.

e) izguba plovnosti, razdelitev kolonije

Izgubo plovnosti in razpad kolonij smo zaznali le pri 6 mg/l DKF.

f) spremembe v testnem gojišču, okužbe z bakterijami in algami

Alge so se precej razmnožile v kontrolnih posodah in pri 0,75 mg/l DKF. Že pri koncentraciji 1,5 mg/l DKF jih je opazno manj. Z višanjem koncentracije DKF v testnem gojišču se je številčnost alg zmanjševala in pri 6 mg/g DKF jih nismo več opazili.

**Tabela 7: Rezultati sedem dnevnega ISO testa – pozitivna kontrola DKF**

Za vsako koncentracijo smo pripravili tri paralelke, razen pri kontroli s šestimi paralelkami. Število členkov je prikazano kot povprečje treh paralelek. Pri dolžini korenin smo zapisali razpon vrednosti. Rezultate ostalih opazovanih značilnostih pa smo opisali s prevladujočimi vrednostmi.

Konc. DKF (mg/l)	Št. členkov	Prevladujoče št. členkov na kolonijo	Dolžina členkov (mm)	Barva členkov (TZ, Z, RZ, R, B)*	Kloroze, nekroze (K %, N %)**	Dolžina korenin (cm)	Alge (0, 1, 2, 3)***
0	70	3 – 4	3 – 5	30 % TZ 60 % Z 10 % RZ	10 % K	1 – 7	3
0,75	79	3 – 4	4 – 6	30 % TZ 60 % Z 10 % R 40 % TZ	10 % K	1 – 6	3
1,5	64	3	3 – 5	55 % Z 5 % R 80 % Z	10 % K	1 – 6	1 – 2
3	35	3	3 – 4	10 % RZ 10 % B	15 % K 5% N	1 – 4	1
6	12	1	3 – 4	10 % R 90 % B	5 % K 95 % N	/	0

\*TZ – temnozelena (zelo zdrava rastlina); Z – zelena; RZ – rumeno zelena; R – rumena ; B – bela (mrtava rastlina) barva členka. Z→R→B; členki, ki prehajajo iz zelene v rumeno in nato v belo

\*\* K – kloroze; N – nekroze

\*\*\* 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko

DKF – diklorofenol

#### **4.1.2 KADMIJ**

##### **a) členki (barva, velikost)**

Število stebelnih členkov se je s povečanjem koncentracije CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču manjšalo (tabela 8). V kontrolnih kristalizirkah so bili členki zdravi. Prevladovala je predvsem zelena barva (90 %). Iz prvotnih sedmih je povprečno zraslo 69 členkov. Velikost členkov (merjena je njihova dolžina) je bila tudi 6 mm, najpogosteje meritve pa so bile med 3 in 5 mm. Pri koncentraciji 0,1 µM CdCl<sub>2</sub> so rastline rasle bolje od kontrole. Zraslo je 72 členkov, kar kaže na malce hitrejšo rast. Povprečna dolžina je bila daljša (4-5 mm) in 40 % členkov je bilo temnozelenih.

Pri koncentraciji 10 µM CdCl<sub>2</sub> smo opazili negativen vpliv kadmija na rast. Zraslo je skoraj polovico manj členkov v primerjavi s kontrolo. Tudi velikost je bila povprečno med 2 in 3 mm. Prvič so se pojavili belo obarvani stebelni členki, ki so predstavljali okrog 5 % rastlin. 25 % členkov je imelo rumene odtenke in njihovo pojavljanje se je povečevalo s povečevanjem koncentracije CdCl<sub>2</sub> v gojišču. Pri 100 µM CdCl<sub>2</sub> ni bil noben členek več popolnoma zelen. Opazno se je zmanjšala tudi njihova velikost. Pri 1000 µM CdCl<sub>2</sub> so bili vsi členki popolnoma beli. Pri tej koncentraciji smo prešteli povprečno le 8 členkov, kar je v primerjavi s kontrolo predstavljal 11,5 % rast.

##### **b) kolonije (število členkov na kolonijo)**

V kontrolnih kristalizirkah smo lahko opazovali kar velike kolonije, sestavljene iz sedmih ali osmih členkov. Najpogosteje pa so bile s tremi ali štirimi. Podobno je bilo pri najnižji, 0,1 µM koncentraciji CdCl<sub>2</sub>. Pri 10 µM CdCl<sub>2</sub> so bile najpogosteje kolonije s tremi členki, vendar nismo opazili večjih kolonij. Pri obeh najvišjih koncentracijah CdCl<sub>2</sub> pa so kolonije razpadle. Opazili smo le še posamezne členke.

##### **c) kloroze ali nekroze (lokalno ali v celi koloniji)**

Pri kontroli in najnižjih koncentracijah CdCl<sub>2</sub> je bilo prisotnih le približno 10 %. Pojavile so se bolj lokalno, na posameznih členkih. Večjo spremembo smo najprej zaznali pri 10 µM CdCl<sub>2</sub>. Poleg ocenjenih 25 % kloroz, se je pojavilo tudi nekrotično tkivo (5 %). S povečevanjem koncentracije kadmijevega klorida v gojišču se je prisotnost kloroz in

nekroz povečevala. Pri 100 µM CdCl<sub>2</sub> je bila prisotnost nekroz že 60 %, pri najvišji koncentraciji CdCl<sub>2</sub> pa so bili vsi členki nekrotični.

d) korenine (prisotnost, dolžina)

Korenine so bile pri kontrolnih rastlinah dolge tudi do 7 cm. Krajše so bile le pri mladih rastlinah. Rast korenin je bila intenzivna do koncentracije 1 µM CdCl<sub>2</sub>. Pri tej koncentraciji je bilo le še nekaj koreninic, dolgih 7 cm. Pri višjih koncentracijah pa je Cd postopoma zaustavil njihovo rast.

Pri 0,1 µM CdCl<sub>2</sub> smo v primerjavi s kontrolami lahko opazili celo daljše, tudi 9 cm dolge korenine. Zelo opazno pa so se skrajšale pri 10 µM, ko so najdaljše merile okrog 4 cm. Nekaj jih je že odpadlo. Te so bile, tako kot pri višjih koncentracijah, bele. Pri 100 µM je bila več kot polovica koreninic na dnu. Ostale so merile manj kot 5 cm. Skoraj vse korenine pa so odpadle pri največji koncentraciji. V posamezni testni posodi sta bili ena do dve korenini, še pritrjeni na listič, vendar sta bili že odmrli in bi verjetno v kratkem času tudi odpadli. Dolgi sta bili od 3 do 4 cm, kar kaže, da se njuna dolžina tekom poskusa ni bistveno spremenila.

e) izguba plovnosti, razdelitev kolonije

Izgubo plovnosti in razpad kolonij smo zaznali le pri obeh najvišjih koncentracijah.

f) spremembe v testnem gojišču, okužbe z bakterijami in algami

Alge so se precej razmnožile v kontrolnih posodah in pri najnižji koncentraciji, kjer je bila njihova količina približno enaka. S povečevanjem koncentracije CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču, se je količina alg zmanjševala in pri najvišji koncentracijih jih v gojišču ni bilo več.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je EC<sub>50</sub> *L. minor* za kadmij blizu koncentracije 10 µM CdCl<sub>2</sub>. Tako smo za nadaljnje poskuse s kadmijem izbrali naslednje koncentracije: 0, 0,1, 1, 10, 100 in 500 µM CdCl<sub>2</sub>. V skladu s temi poskusi smo za nadaljnje delo kot najvišjo koncentracijo CdCl<sub>2</sub> izbrali 500 µM.

**Tabela 8: Rezultati sedem dnevnega ISO testa – izpostavitev CdCl<sub>2</sub>**

Za vsako izbrano koncentracijo CdCl<sub>2</sub> smo pripravili tri paralelke, razen pri kontroli s šestimi ponovitvami. Število členkov je prikazano kot povprečje treh paralelk. Pri koncentraciji 10 µM CdCl<sub>2</sub> smo uporabili le 2 meritve, saj je ena precej izstopala (rezultati teh treh paralelk: 46, 30, 9). Pri dolžini korenin smo zapisali razpon vrednosti. Rezultate ostalih opazovanih značilnostih pa smo opisali s prevladajočimi vrednostmi.

Konc. CdCl <sub>2</sub> (µM)	Št. členkov	Prevladajoče št. členkov na kolonijo	Dolžina členkov (mm)	Barva členkov (TZ, Z, RZ, R, B)*	Kloroze, nekroze (K %, N %)**	Dolžina korenin (cm)	Alge (0, 1, 2, 3)***
0	70	3	3 – 5	30 % TZ 60 % Z 10 % RZ 40 % TZ	10 % K	1 – 7	3
0,1	72	3	4 – 5	50 % Z 10 % RZ 30 % TZ	10 % K	2 – 6	3
1	63	3	3 – 5	60 % Z 10 % RZ 70 % Z	10 % K	1 – 6	2
10	38	3	2 – 3	20 % RZ 5 % R 5 % B 60 %	25 % K 5 % N	0 – 4	1
100	12	1	2 – 4	Z→R→B 40 % B	60 % N 40% K	0 – 5	0 – 1
1000	8	1	3	100 % B	100 % N	0 – 4	0

\*TZ – temnozelena (zelo zdrava rastlina); Z – zelena; RZ – rumeno zelena; R – rumena; B – bela (mrtava rastlina) barva členka. Z→R→B; členki, ki prehajajo iz zelene v rumeno in nato v belo

\*\* K – kloroze; N – nekroze

\*\*\* 0 – ni alg; 1 – malo; 2 – srednje; 3 – veliko

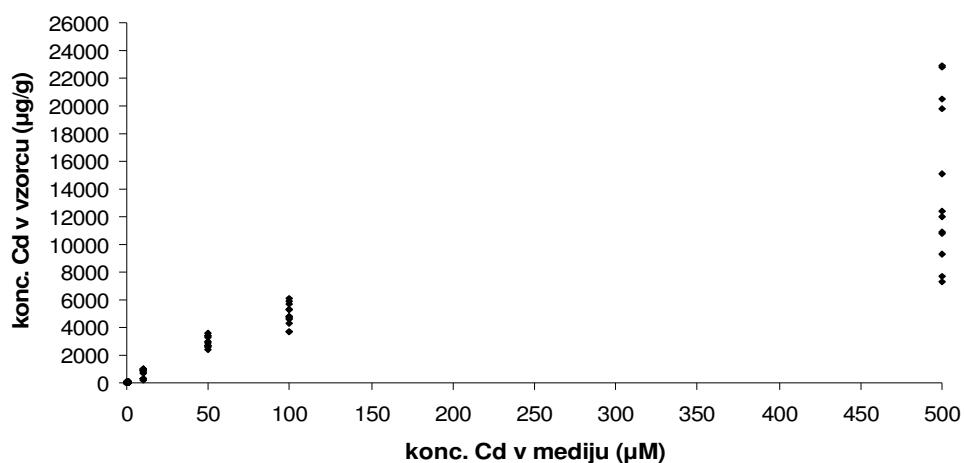
## 4.2 TKIVNA KONCENTRACIJA KADMIJA V RASTLINAH IN RASTNIH GOJIŠČIH

Koncentracijo kadmija v gojišču smo preverili z atomskim spektrofotometrom. Izbrali smo le dve gojišči s koncentracijama 50 in 500 µM CdCl<sub>2</sub>. Vzorčili smo vse tri ponovitve. Meritve so pokazale, da je bila koncentracija kadmija v teh gojiščih prava. Vrednosti so bile naslednje: 50 µM ± 2,7 % in 500 µM ± 1,1 %. Napake so bile zelo majhne in zato zanemarljive.

Rezultati merjenja količine kadmija v rastlinah vodne leče, ki smo jih za 24 ur izpostavili različnim koncentracijam CdCl<sub>2</sub> so prikazani sliki 3. Vsebnost kadmija v rastlinskem tkivu se je povečevala sorazmerno s povečevanjem koncentracije kadmijevega klorida v gojiščih. Rastline so v tkivo kopičile relativno visoke količine kadmija. Pri izpostavitvi 500 µM CdCl<sub>2</sub> je bil povprečen privzem kar  $14268,7 \pm 3598,6$  µg/g suhe mase (priloga I). Rastline, ki niso bile izpostavljene CdCl<sub>2</sub> so vsebovale  $14,4 \pm 8,1$  µg/g kadmija, pri izpostavitvi 10 µM CdCl<sub>2</sub> je suha masa vsebovala  $690,4 \pm 203,0$  µg/g kadmija in pri 50 µM CdCl<sub>2</sub>  $2935,3 \pm 134,9$  µg/g kadmija (slika 3).

Izračunali smo tudi odvisnost akumulacije kadmija v rastlini od njegove koncentracije v gojišču. Ta je skoraj 2,4 – krat večja med 0 in 50 µM CdCl<sub>2</sub> ( $y = 58,39x + 30,35$ ,  $R^2 = 0,999$ ) kot med 50 in 500 µM ( $y = 24,55x + 2057,70$ ,  $R^2 = 0,996$ ) (slika 3).

Meritve med posameznimi poskusi se kar precej razlikujejo (priloga III). Drugi poskus je pokazal precej višje vrednosti od ostalih dveh. Zato je tudi pri zadnji koncentraciji opazen velik raztros podatkov (slika 3). Kljub vsemu pa je opazen enak trend povečevanja količine privzetega kadmija.

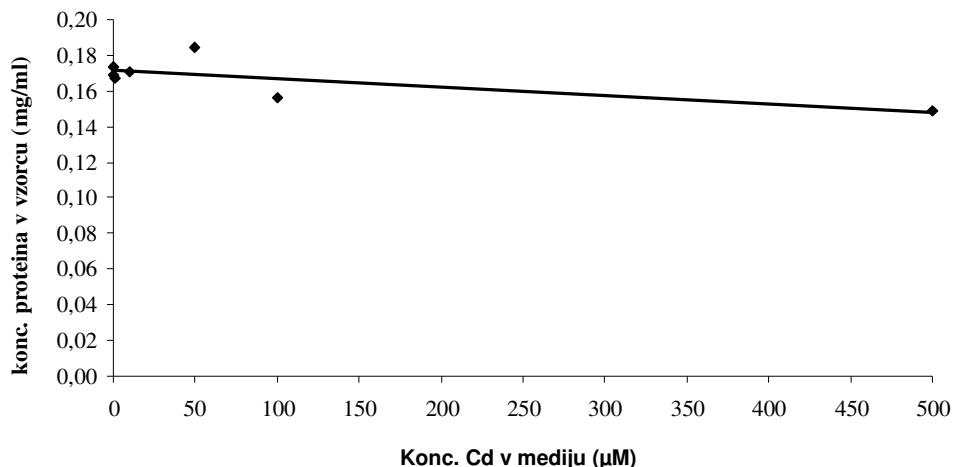


**Slika 3. Odvisnost tkivne koncentracije kadmija od koncentracije CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču**

*L. minor* smo za 24 ur izpostavili 0, 0,1, 1, 10, 50, 100 in 500 µM CdCl<sub>2</sub>. Prikazani rezultati so posamezne meritve treh neodvisnih ponovitev, za vsako koncentracijo po štiri paralelke (n = 12).

### 4.3 VSEBNOST PROTEINOV

Z umeritveno krivuljo smo lahko iz izmerjene absorpcije vzorca izračunali količino proteinov v vzorcih. Ugotovili smo, da se je pri vseh treh neodvisnih ponovitvah poskusa vsebnost proteinov zmanjševala s povečevanjem koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču (slika 4).



**Slika 4. Odvisnost koncentracije proteinov v vzorcu od koncentracije Cd v gojišču**

Slika prikazuje povprečne vrednosti treh neodvisnih ponovitev, s 4 paralelkami ( $n=12$ ). Črta prikazuje trend upadanja koncentracije proteinov v vzorcih

### 4.4 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

Rezultati, prikazani s slikami 5, 6, 7 in 8, so povprečne vrednosti relativne specifične encimske aktivnosti SEA. V prilogi II pa so v tabeli zapisane povprečne absolutne vrednosti SEA za vsak encim in za vse tri neodvisne ponovitve poskusa.

#### 4.4.1 KATALAZA

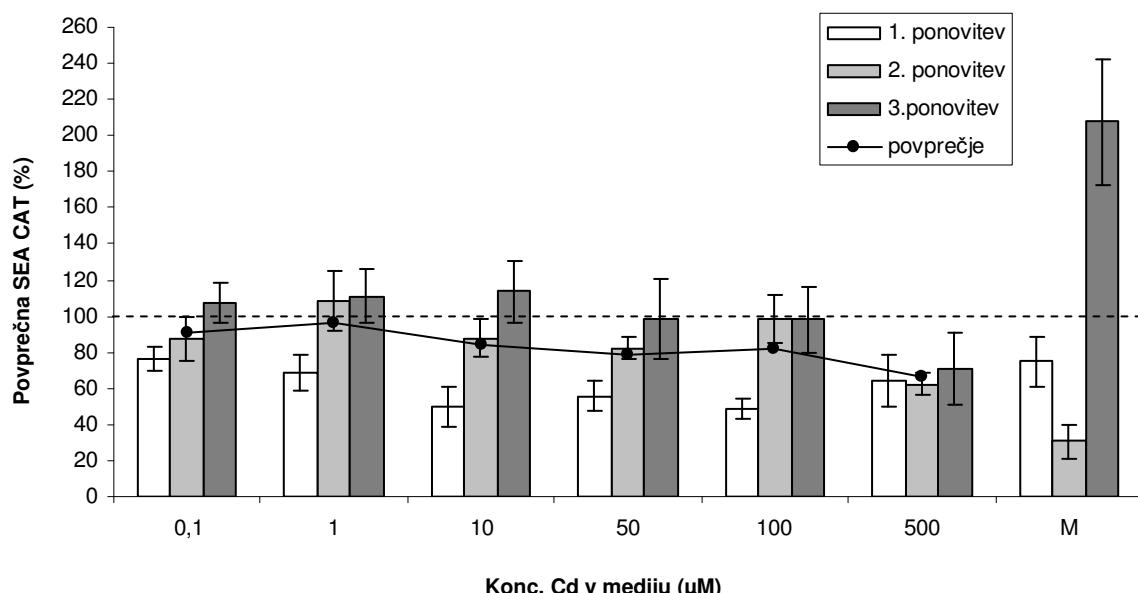
EA katalaze smo določili z merjenjem porabe  $\text{H}_2\text{O}_2$  pri 240 nm.

Če primerjamo povprečje treh ponovitev s kontrolo opazimo, da se je po 24 urni izpostavitvi kovini povprečna SEA katalaze v primerjavi s kontrolo zmanjšala pri skoraj vseh koncentracijah dodanega  $\text{CdCl}_2$ . Le pri 1 in 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  smo opazili manjši,

nesignifikantni dvig SEA katalaze. Največji padec EA smo izmerili pri  $500 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , kjer se je SEA zmanjšala na  $65,9 \pm 2,3\%$  v primerjavi s kontrolo (slika 5).

Za pozitivno kontrolo smo izbrali menadijon, zato tudi ni vključen v krivuljo, ki ponazarja povprečne SEA katalaze z naraščajočo koncentracijo  $\text{CdCl}_2$  (slika 5)

Iz slike 5 je razvidno, da so bile razlike v SEA med posameznimi ponovitvami velike tako pri obdelavi s kadmijem, kot tudi z menadijom.



**Slika 5. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) katalaze (CAT) od koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču**

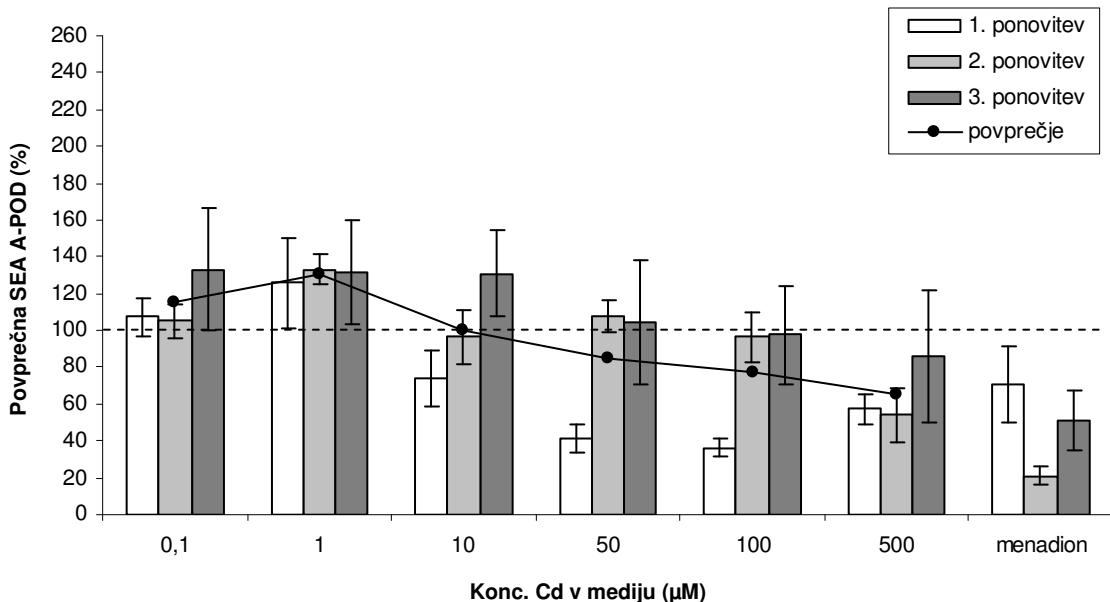
*L. minor* je bila za 24 ur izpostavljena različnim koncentracijam  $\text{CdCl}_2$ . Vsak stolpec predstavlja povprečno SEA  $\pm$  standardna napaka, izmerjeno za posamezno ponovitev poskusa. Pri vsaki ponovitvi smo pripravili 4 parallelke za vsako koncentracijo ( $n=12$ ). Enako velja za menadijon (M) – pozitivno kontrolo. Črtkana črta predstavlja 100 odstotkov (negativna kontrola, brez  $\text{CdCl}_2$  v rastnem gojišču).

#### 4.4.2 ASKORBAT PEROKSIDAZA

Encimsko aktivnost A-POD smo določili z merjenjem absorpcije pri 290 nm, ki se je zaradi oksidacije askorbata zmanjševala.

Iz povprečja vseh treh ponovitev, ki ga ponazarja krivulja na sliki 6, lahko opazimo, da je povprečna SEA askorbat peroksidaze pri nizkih koncentracijah narasla. Vrh je dosegla pri  $1 \mu\text{M CdCl}_2$ , kjer je bila povprečna SEA  $130,3 \pm 2,2 \%$  v primerjavi s kontrolo. Povečevanje koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču je povzročilo postopen padec EA. Najnižjo povprečno SEA A-POD smo izmerili pri  $500 \mu\text{M CdCl}_2$ , kjer je znašala  $65,8 \pm 10,0 \%$  od kontrole.

Čeprav se posamezne meritve SEA A-POD pri menadionu razlikujejo, pa povprečje vseh treh  $47,5 \pm 14,4 \%$  pokaže, da ta bolj vpliva na zmanjšanje SEA kot visoke koncentracije kadmija (slika 6).



**Slika 6. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) askorbat peroksidaze (A-POD) od koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču**

*L. minor* je bila za 24 ur izpostavljena različnim koncentracijam  $\text{CdCl}_2$ . Vsak stolpec predstavlja povprečno SEA  $\pm$  standardna napaka, izmerjeno za posamezno ponovitev poskusa. Pri vsaki ponovitvi smo pripravili 4 paralelke za vsako koncentracijo ( $n=12$ ). Enako velja za menadion (M) – pozitivno kontrola. Črtkana črta predstavlja 100 odstotkov (negativna kontrola, brez  $\text{CdCl}_2$  v rastnem gojišču).

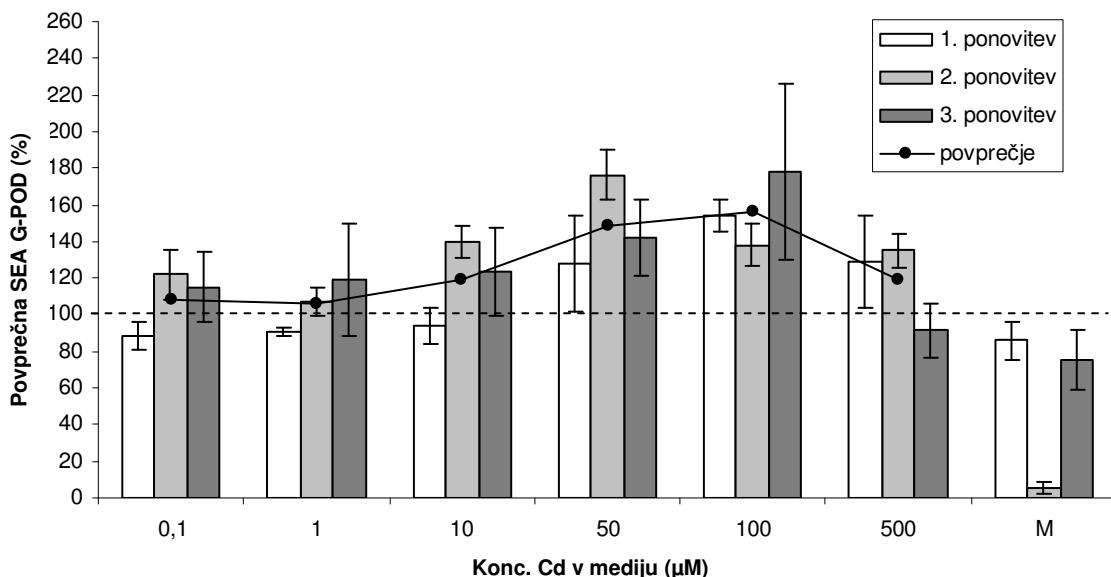
#### 4.4.3 GUAIAKOL PEROKSIDAZA

Encimsko aktivnost G-POD smo določili z merjenjem naraščanja absorpcije pri 470 nm, kot posledice polimerizacije guaiakola v tetraguaiakol.

Na sliki 7 lahko iz krivulje, ki prikazuje povprečje vse treh meritev povprečne SEA G-POD, opazimo, da se je guaiakol peroksidaza odzvala podobno kot askorbat peroksidaza. Encim se je aktiviral že pri najnižji koncentraciji (pri  $0,1 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  je SEA znašala:  $115,0 \pm 10,4 \%$ ), in SEA se je povečevala do koncentracije  $100 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , kjer je dosegla vrh ( $156,43 \pm 11,6 \%$ ). S povečevanjem koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču se je SEA G-POD zmanjševala in pri  $500 \mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  predstavlja  $91,5 \pm 13,6 \%$  kontrolne aktivnosti.

Menadion je delovanje G-POD močno inhibiral in povprečna SEA je bila  $75,4 \pm 25,1 \%$  kontrolne aktivnosti (slika 7).

Posamezne ponovitve poskusa se ponovno precej razlikujejo (slika 7).



**Slika 7. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) guaiakol peroksidaze (G-POD) od koncentracije  $\text{CdCl}_2$  v gojišču**

*L. minor* je bila za 24 ur izpostavljena različnim koncentracijam  $\text{CdCl}_2$ . Vsak stolpec predstavlja povprečno SEA  $\pm$  standardna napaka, izmerjeno za posamezno ponovitev poskusa. Pri vsaki ponovitvi smo pripravili 4 paralelke za vsako koncentracijo ( $n=12$ ). Enako velja za menadion (M) – pozitivno kontrola. Črtkana črta predstavlja 100 odstotkov (negativna kontrola, brez  $\text{CdCl}_2$  v rastnem gojišču).

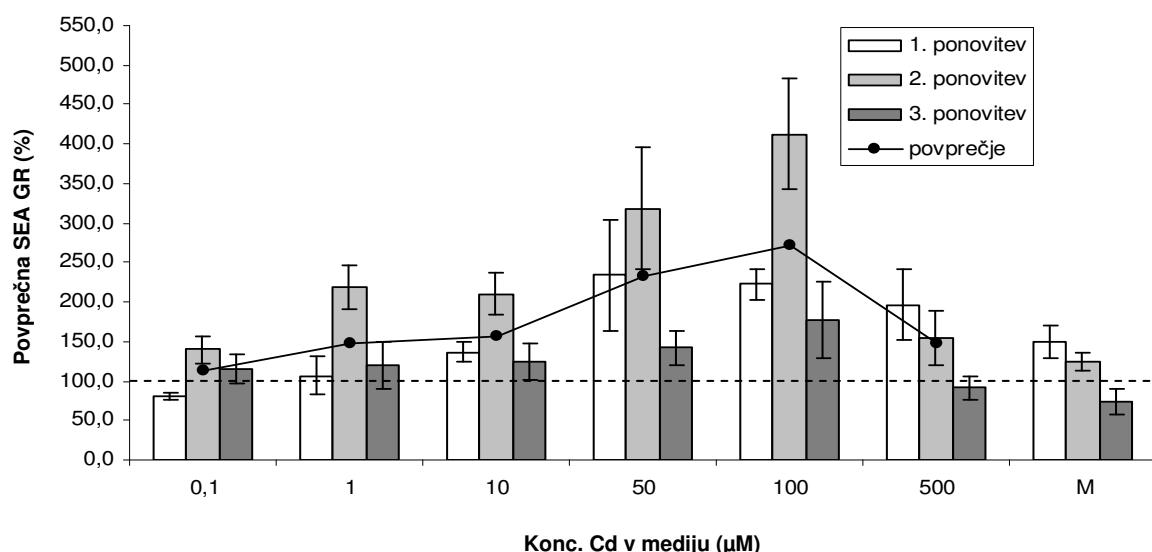
#### 4.4.4 GLUTATION REDUKTAZA

Encimska aktivnost GR smo določili z merjenjem naraščanja absorpcije pri 412 nm, ki je bila posledica redukcije DTNB v TNB (2-nitro-5-thiobenzojsko kislino).

Glutation reduktaza se je na kadmijev stres odzvala podobno kot obe peroksidazi. Pri najnižji testni koncentraciji CdCl<sub>2</sub> je bila povprečna SEA GR malo višja od kontrole (111,7 ± 17,0 %), dosegla vrh pri 100 µM CdCl<sub>2</sub> (271,0 ± 72,1 % od kontrole), se s povečevanjem koncentracije ponovno znižala, a še vedno presegala kontrolne vrednosti (147,3 ± 30,4) (slika 8).

Najnižje vrednosti SEA smo izmerili pri menadionu, ki pa so bile še vedno nad kontrolo (115,4 ± 22,1 %).

Rezultati posameznih ponovitev se tako kot pri ostalih encimih razlikujejo, a so bile razlike tu največje (slika 8).



**Slika 8. Odvisnost povprečne specifične encimske aktivnosti (SEA) glutation reduktaze (GR) od koncentracije CdCl<sub>2</sub> v gojišču**

*L. minor* je bila za 24 ur izpostavljena različnim koncentracijam CdCl<sub>2</sub>. Vsak stolpec predstavlja povprečno SEA ± standardna napaka, izmerjeno za posamezno ponovitev poskusa. Pri vsaki ponovitvi smo pripravili 4 paralelke za vsako koncentracijo (n=12). Enako velja za menadion (M) – pozitivno kontrola. Črtkana črta predstavlja 100 odstotkov (negativna kontrola, brez CdCl<sub>2</sub> rastnem gojišču).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 SEDEM DNEVNI TEST RASTI ISO/CD 20079 (2001)

Po standardih testa ISO smo malo vodno lečo (*L. minor*) izpostavili različnim koncentracijam kadmijevega klorida, kot pozitivno kontrolo pa uporabili DKF. Rezultati so pokazali, da je odziv rastlin na DKF znotraj določil ISO testa. EC<sub>50</sub> *L. minor* je bil po izpostavitvi DKF 3,5 mg/l, torej med mejnima vrednostima 1,8 mg/l in 3,6 mg/l (tabela 7). Po izpostavitvi različnim koncentracijam kadmijevega klorida pa smo EC<sub>50</sub> izmerili pri 10 µM CdCl<sub>2</sub> (tabela 8). Glede na rezultate smo določili koncentracije CdCl<sub>2</sub>, katerim smo kasneje izpostavili zdrave rastline ter izmerili aktivnost antioksidativnih encimov in tkivne koncentracije privzetega kadmija.

Po sedmih dneh izpostavitve rastlin različnim koncentracijam CdCl<sub>2</sub>, smo opazili povezavo med koncentracijo CdCl<sub>2</sub> in morfološkimi spremembami rastlin. Pri najnižji, 0,1 µM koncentraciji CdCl<sub>2</sub> je zraslo 2 % več členkov kot pri kontroli. Kolonije so bile velike, tudi s sedmimi členki. Ti so bili večinoma temno zelene barve, v dolžino pa so merili tudi 6 mm. Koreninice niso odpadle in njihova dolžina je bila primerljiva s kontrolami. Opaznih je bilo nekaj kloroz, ki pa so verjetno povezane z normalnim zaključevanjem življenskega cikla členka. Iz tega sklepamo, da lahko kadmij v zelo nizkih koncentracijah pozitivno vpliva na rast male vodne leče. Negativen vpliv kadmija smo zaznali že pri 1 µM CdCl<sub>2</sub>. Kljub temu da so bili členki morfološko podobni kontrolnim (veliki do 6 mm, večinoma temno zeleni, kloroze komaj opazne, koreninice niso odpadle in bile dolge do 6 cm, prisotnih veliko alg), pa je bilo členkov do 10 % manj kot v kontrolnem gojišču. Upočasnjena rast je bila prvi znak stresa. Prelomnico je predstavljala koncentracija 10 µM CdCl<sub>2</sub>, saj so bili od te koncentracije dalje znaki stresa očitni. Veliko več je bilo kloroz, prvič so se pojavile nekroze, močno se je zmanjšalo število členkov in odpadle so nekatere koreninice. Pri najvišji testni koncentraciji 1000 µM CdCl<sub>2</sub> je bilo 89,5 % manj členkov kot pri kontroli; vsi so bili beli, razpadle so kolonije in odpadle so vse koreninice.

Hagemeyer (1999) pravi, da je sprememba v rasti pogosto prva in najbolj očitna reakcija rastlin na težke kovine. Podoben odziv na kadmij kot v naših poskusih, sta opazila pri mali vodni leči tudi Uysual in Taner (2007) in Lu s sod. (2004) pri vodni hijacinti (*Eichhornia crassipes*). Vsi so opazili, da čeprav je kadmij znan kot neesencialna kovina in ima predvsem inhibitorne učinke na rastlino, lahko pri zelo nizkih koncentracijah pri opazovanih vodnih rastlinah spodbudi rast. Na drugi strani je bila rast inhibirana že ob prisotnosti zelo nizkih koncentracij kadmija pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*) (Chaoui in sod., 1997, Smeets in sod. 2005), pri koruzi (*Zea mays*) (Rellán-Álvarez in sod., 2006) in pri mali debelolistki (*Bacopa monnieri*) (Mishra in sod., 2006). Zmanjšano rast male vodne leče so različni raziskovalci opazili ob prisotnosti bakra (Teisseire in Guy, 2000, Zayed in sod., 1998), kroma (Dirilgen, 1998), niklja in svinca (Zayed in sod., 1998).

Pri mali vodni leči smo poleg inhibicije rasti opazili tudi spremembe barve posameznih stebelnih členkov. Ti so se obarvali rumeno, pri višjih koncentracijah kadmijevega klorida pa belo. O pojavu kloroz in nekroz kot posledicah izpostavitve težkim kovinam, tudi kadmiju, je pisalo že več avtorjev (Balsberg-Pålsson, 1989, Sanitá di Toppi in Gabbielli, 1999, Hagemeyer, 1999, Zayed in sod., 1998). Kloroze je kadmij povzročil tudi pri ječmenu (Hegedüs in sod., 2001), fižolu (Smeets in sod., 2005), mali debelolistki (Mishra in sod., 2006) in čebuli (Barazani in sod., 2004). Ker so kloroze povezane z razgradnjo klorofila, lahko sklepamo, da je kadmij posredno inhibitorno vplival tudi na fotosintezo. Da kadmij res inhibira fotosintezo in tudi respiracijo, sta objavila Prasad in Stržačka (1999).

### **5.1.2 TKIVNA KONCENTRACIJA KADMIJA V RASTLINAH IN GOJIŠČIH**

Rezultati so pokazali, da mala vodna leča privzema velike količine kadmija. Pri najvišji izpostavitveni koncentraciji CdCl<sub>2</sub> smo povprečno namerili  $14286,7 \pm 3,60 \mu\text{g}$  kadmija na gram suhe teže (priloga I), kar je skoraj 1000 x več v primerjavi s kontrolo. Wang in sod. (2002) so malo vodno lečo izpostavili 8 mg/l Cd in izmerili 14200 mg Cd/kg suhe teže; Zayed in sod. (1998) pa so rastlino gojili v gojišču z 10 mg/l Cd in izmerili 13,3 g Cd/kg suhe teže. Koncentracija kadmija v rastlini se je povečala z zviševanjem koncentracije v gojišču. To razmerje pa ni bilo linearno; kadmij se je v tkivu kopičil od 2,4 – krat bolj v koncentracijskem razponu med 0 in 50  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> kot med 50 in 500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Greger (1999). Nelineraen privzem kadmija iz vode ali tak razloži z manjšo koncentracijo kovine na absorpcijsko površino, s čimer se zmanjša kompeticija med ioni za privzem manjša. Obratno pa je pri višjih koncentracijah kovine v rastnem gojišču.

Na sliki 3 in v prilogi III so prikazani rezultati vseh treh neodvisnih poskusov in meritve posameznega poskusa. Vidimo lahko, da so bile meritve v posameznem poskusu podobne, se pa razlikujejo meritve med poskusi. Na sam potek privzema kovine lahko vplivajo različni dejavniki, kot na primer fiziološko stanje rastlin, rastna sezona, ne moremo pa povsem izključiti tudi metodoloških napak.

Zaradi sposobnosti kopičenja kadmija v tkivih, bi bila mala vodna leča primerna za odstranjevanje kadmija iz onesnaženih voda.

### **5.1.3 VSEBNOST PROTEINOV**

Vsebnost proteinov v rastlinskem materjalu se je zmanjševala s povečevanjem koncentracije kadmijevega klorida v gojišču (slika 4). Kadmij lahko povzroči različne poškodbe DNA, kar lahko vodi do sprememb v sintezi proteinov. Kopičenje kadmija v rastlini lahko tudi inhibira privzem Mg in K, ki sta pomembna dejavnika pri sintezi proteinov. So pa mehanizmi inhibicije vsebnosti proteinov kadmija kompleksni in jih je potrebno še raziskati (Hou in sod., 2007).

### **5.1.4 ANTIOKSIDATIVNI ODZIV**

Antioksidativni encimi so se na izpostavitev CdCl<sub>2</sub> odzvali na dva načina (slike 5, 6, 7, 8). Povprečna specifična encimska aktivnost CAT se je po 24 urni izpostavitvi CdCl<sub>2</sub> v primerjavi s kontrolo pri vseh dodanih koncentracijah rahlo zmanjšala, največ pri najvišji koncentraciji 500 µM CdCl<sub>2</sub> na 65,9 ± 2,3 % (slika 5). Glede odziva katalaze na kadmij so si podatki v literaturi nasprotujoči. Nekateri avtorji (Hou in sod., 2007, Iannelli in sod., 2002) so po izpostavitvi opazili aktivacijo tega encima, med tem ko so drugi, kot v našem primeru, opazili inhibicijo (Hegedüs in sod. 2001, Mishra in sod. 2006, Chaoui in sod., 1997). Mishra in sod. (2006) menijo, da je katalaza občutljiva na O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Zaradi kadmijevega stresa je verjetno količina teh radikalov narasla in povzročila inaktivacijo encima. Iz povečane aktivnosti askorbat peroksidaze, guaikol peroksidaze in glutation reduktaze lahko sklepamo, da so rastline pomanjkanje katalazne aktivnosti pri odstranjevanju vodikovega peroksida nadomestile z veliko aktivnostjo drugih encimov.

Aktivnosti ostalih merjenih encimov so pokazale bifazni odziv na povečevanje koncentracije kadmijevega klorida v rastnem gojišču (slike 6, 7 in 8). Teisseire in Guy (2000) pravita, da so bifazne krivulje značilne za odziv na stres. Pri rastlinah, izpostavljenih nizkim koncentracijam težkih kovin, sta se aktivirali askorbat in guaikol peroksidaza ter glutation reduktazo, kar je vodilo k okrepitevi rastline. Pri večji ali dolgotrajnejši izpostavitvi bi lahko prišlo do obremenitve obrambe, ki se počasi zmanjšuje. Hou in sod. (2007) menijo, da je zmanjšanje encimskih aktivnosti lahko povezano tudi z nastankom proteinskih kompleksov s kovinami, ki spremenijo strukturno integriteto proteinov.

Največje povečanje SEA smo izmerili pri glutation reduktazi (GR) (slika 8). Pri 100 µM CdCl<sub>2</sub> smo izmerili vrh encimske aktivnosti za GR in G-POD, med tem ko ga je A-POD doseglja že pri 1 µM CdCl<sub>2</sub>. Pri vseh je encimih je bilo povečevanje koncentracije CdCl<sub>2</sub> v gojišču povezano s padcem aktivnosti, a je bila SEA GR pri najvišji izpostavitveni koncentraciji še vedno višja od kontrole (slika 8), med tem ko je pri peroksidazah padla pod vrednost kontrole (sliki 6 in 7). Podobno so se na kadmijev stres ti encimi odzvali pri

fižolu (Chaoi in sod., 1997), ter pri vrstah *Phragmites australis* (Iannelli in sod., 2002) in *Bacopa monnieri* (Mishra in sod., 2006).

Ker so že nizke koncentracije kadmijevega klorida povzročile aktivacijo različnih antioksidativnih encimov, bi take teste lahko uporabili kot pokazatelje zgodnje toksičnosti kovine. Z biokemijskimi raziskavami bi lahko vpliv onesnažil na rastline odkrili hitreje v primerjavi z morfološkimi spremembami, kot so vidne poškodbe, zmanjšana rast in vitalnost rastlin (Teisseire in Guy, 2000).

## 5.2 SKLEPI

Kadmij, še posebej pri višjih koncentracijah, stresno vpliva na malo vodno lečo (*Lemna minor*). Spremembe so bile po sedemdnevni izpostavitvi očitne. Z ISO/CD 20079 testom smo ugotovili, da je EC<sub>50</sub> *L. minor* za kadmij približno pri 10 µM CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču. Nižje koncentracije niso imele večjega učinka na rastline. Opazna je bila le rahlo zmanjšana rast, kar je prvi znak stresa, povzročenega s težkimi kovinami, in nekaj kloroz. Od 10 µM CdCl<sub>2</sub> dalje so se poleg povečanega števila kloroz pojavile tudi nekroze, zmanjšalo se je število členkov, razpadle so kolonije in odpadle korenine.

Koncentracija kadmija v rastlini se je povečevala s povečevanjem koncentracije v gojišču, a razmerje ni bilo linearne. Kopičenje kadmija je bilo največje pri njegovih nizkih koncentracijah v gojišču. Iz rezultatov sklepamo, da je mala vodna leča dober akumulator kadmija in bi jo potencialno lahko uporabili pri fitoremediaciji odpadnih voda, ki so onesnažene z nizkimi koncentracijami te kovine.

S povečevanjem koncentracije kadmijevega klorida v gojišču se je zmanjševala vsebnost proteinov v rastlini.

Ob prisotnosti kadmija je bila aktivnost katalaze manjša v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Ker je ta encim zelo pomemben za odstranjevanje vodikovega peroksida, so celice odsotnost njene aktivnosti nadomestile s povečano aktivnostjo drugih antioksidativnih encimov. Tako so nizke koncentracije CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču povzročile povečanje encimske aktivnosti askorbat peroksidaze, guaiakol peroksidaze in glutation reduktaze. Pri velikih koncentracijah CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču bi verjetno lahko prišlo do preobremenitve obrambnih mehanizmov, ki je bila povezana s postopnim zmanjševanjem encimske aktivnosti. Najvišjo aktivnost sta imeli GR in G-POD pri 10 µM CdCl<sub>2</sub>, A-POD pa že pri 1 µM. Ob povečani koncentraciji CdCl<sub>2</sub> so začele rastline odmirati.

Spremembe v encimski aktivnosti antioksidativnih encimov so hiter pokazatelj toksičnosti kovine. Z njim bi lahko vpliv onesnažil na biokemične poti odkrili hitreje v primerjavi z vidnimi poškodbami ali z zmanjševanjem rasti in vitalnosti rastlin.

## 6 POVZETEK

Raziskovali smo vpliv različnih koncentracij neesencielne težke kovine kadmij (Cd) na izbrane antioksidativne encime (GR - glutation reduktaza, G-POD – guaiakol peroksidaza, A-POD – askorbat peroksidaza, CAT- katalaza) pri mali vodni leči (*Lemna minor* L.) po 24 urni izpostavitvi kovini. Poleg odziva encimov smo določali tudi količino celotnega kadmija v rastlinah in ugotavljeni, ali mala vodna leča sodi med akumulatorske vrste. Ob teh poskusih smo opazovali s prostim očesom vidne spremembe na rastlinah po sedem dnevni izpostavitvi kadmijevemu kloridu.

Pred in med našimi poskusi so rastline rasle v Steinbergovem rastnem gojišču v rastni komori pri  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  pod hladno belo fluorescentno svetlobo ( $160 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$  PAR), s ciklom svetlobe/teme v razmerju 18h/6h. Rastno gojišče smo zamenjali vsakih 7 dni.

Najprej smo določili EC<sub>50</sub> za *L. minor*, ki je izpostavljena kadmiju. Zato smo rastline za sedem dni izpostavili 0,1, 1, 10, 100 in 1000  $\mu\text{M}$  kadmijevega klorida (CdCl<sub>2</sub>), kot referenčno snov pa smo po navodilih testa ISO/CD 20079 (2001) uporabili 3,5-diklorofenolno raztopino (DKF) (0,75, 1,5, 3 in 6 mg/l). Za vsako koncentracijo smo pripravili tri ponovitve. Po sedmih dneh smo prešeli število členkov, izmerili in opazovali njihovo velikost in barvo, dolžino in stanje korenin, kloroze in nekroze, stanje kolonij, spremembe v gojišču in prisotnost alg. Po ISO standardu je morala biti EC<sub>50</sub> *L. minor* za DKF med 1.8 in 3.6 mg/l. Število členkov se je med temo dvema koncentracijama res prepolovilo pri 3 mg/l. EC<sub>50</sub> *L. minor* za kadmij pa smo določili pri 10  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču. Nižje koncentracije niso imele večjega učinka na rastline. Opazili smo nekaj kloroz in rahlo zmanjšanje rasti. Od 10  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> dalje pa so se poleg vedno več kloroz pojavile tudi nekroze, močno se je zmanjšalo število členkov, razpadle so kolonije in odpadle korenine.

Rastline smo izpostavili še za 24 ur različnim koncentracijam kadmija (0, 0,1, 1, 10, 50, 100 in 500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>). Za vsako koncentracijo smo pripravili štiri vzorce. Vzorci, ki so rasli v rastnem gojišču, ki ni vsebovalo kadmija, so predstavljali negativno kontrolo. Za

pozitivno kontrolo pa smo lečo izpostavili znanemu prožilcu oksidativnega stresa, menadijonu.

En del rastlin smo uporabili za določanje količine privzetega kadmija v mali vodni leči po 24-urni izpostavitvi različnim količinam kovine. Cele rastline smo zamrznili, liofilizirali in vzorce pripravili za razklop v mešanici dušikove in perklorove kisline. Količino kadmija v vzorcih smo izmerili s plamensko atomsko spektroskopijo (FAAS). Poskus smo ponovili trikrat in podatke statistično obdelali. Rezultati so pokazali, da mala vodna leča dobro akumulira kadmij in bi jo lahko uporabili za fitoremediacijo s kadmijem onesnaženih voda. Pri najvišji izpostavitveni koncentraciji smo povprečno namerili kar  $14286,7 \pm 3,60 \mu\text{g Cd}$  na g suhe teže. Koncentracija kadmija v rastlini je naraščala skupaj s koncentracijo v gojišču. Vendar to razmerje ni bilo linearno, saj je akumulacija najhitreje potekala pri nizkih zunanjih koncentracijah kadmija in obratno.

Drugi del rastlin pa smo uporabili za določanje odziva antioksidativnih encimov, katalaze, askorbat in guaiakol peroksidaze ter glutation peroksidaze. Rastline male vodne leče smo homogenizirali v kalijevem-fosfatnem pufru (pH 7,0), centrifugirali (10 minut, 4 °C, 10000 RPM) in supernatant shranili pri -80 °C. Količino beljakovin v vzorcu in aktivnost antioksidativnih encimov smo izmerili spektrofotometrično pri ustreznih valovnih dolžinah, specifičnih za posamezen encimski substrat. Poskus smo trikrat neodvisno ponovili in podatke statistično obdelali. Rezultati so pokazali, da je prisotnost kadmija povzročila različne odzive antioksidativnih encimov v rastlini. Inaktivacijo katalaze je povzročila že najnižja izpostavitvena koncentracija CdCl<sub>2</sub>. Zato pa so se močno aktivirale askorbat peroksidaza, guaiakol peroksidaza in glutation reduktaza, ki so se na stres odzvale bifazno. Pri nizkih koncentracijah so se njihove aktivnosti močno povečale in tako varovale celice pred poškodbami ROS. Ko pa so rastline dosegle maksimum adaptacije, je premočna izpostavitev kovini povzročila preobremenitev obrambnih mehanizmov in sledil je postopen upad aktivnosti teh treh encimov. Če se stresna situacija še nadaljuje, sledi smrt celice in kasneje rastline.

## **7 UPORABA PRI POUKU NARAVOSLOVJA, BIOLOGIJE IN IZBIRNIH PREDMETIH V OSNOVNI ŠOLI**

### **7.1 PREGLED UČNIH NAČRTOV ZA DEVETLETNO OSNOVNO ŠOLO V POVEZAVI S TEMO DIPLOMSKEGA DELA**

Pouk naravoslovja in biologije da učencem znanje, ki jim omogoča temeljno razumevanje narave in življenja in s tem odgovoren odnos do narave in živih bitij. Pomembno je, da se teoretični temelji prepletajo z metodami neposrednega opazovanja in laboratorijskega ter terenskega dela. Tako imajo učenci možnost aktivnega pridobivanja znanja, saj s tem, da lahko vzpostavljajo neposreden stik z živimi bitji oziroma z naravo, prihajajo do določenih spoznanj prek lastnih izkušenj.

Pri pouk naravoslovja in biologije učenci:

- oblikujejo odgovoren odnos do okolice, narave in njenega varovanja,
- razvijejo spoštovanje do vseh oblik življenja in razumejo medsebojne povezanosti žive in nežive narave,
- se zavedajo, da je človek sestavni del narave in tako od nje odvisen,
- razvijajo sposobnosti za zaznavanje in razumevanje ekoloških problemov,
- razvijejo zavest o potrebi obzirnega in varčnega ravnanja z omejenimi naravnimi viri zaradi odgovornosti do prihodnjih generacij,
- razumejo različne, popravljive in nepopravljive spremembe ob človekovem posegu v naravo in okolje, probleme, ki pri tem nastajajo, ter naravne načine njihovega reševanja.

Učitelji naravoslovnih in bioloških vsebin imajo tako pomembno vlogo pri ohranjanju narave za prihodnje generacije, saj predvsem zavest mladih rodov omogoča boljšo prihodnost našega planeta.

Vsebina diplomske naloge je obširna in določene uporabljene metode, kot sta kopiranje kovine v tkivu rastline in antioksidativni odziv encimov, niso primerne za uporabo v osnovni šoli, saj zahtevajo veliko časa, natančnosti in šolam težko dostopen material (spektrofotometer, različne kemikalije).

V osnovni šoli bi lahko izvedli izpostavitev male vodne leče kovini, kjer bi učenci po določenem času opazovali spremembe na rastlinah in jih zapisali. Poskus bi predlagala za višje razrede (osmi ali deveti razred). Pomembna je tudi izbira kovine. Kadmijski smeti ga uporabili v tem diplomskem delu, ni primeren za šolo, saj je toksičen že pri nizkih koncentracijah. Boljša izbira bi bil baker v obliki modre galice ali cink. Obe sta esencielni kovini, ki ju organizmi pri nizkih koncentracijah nujno potrebujejo, višje koncentracije pa so hitro toksične.

Mala vodna leča (*Lemna minor*) je rastlina, ki jo lahko gojimo tudi v šoli. Potrebujemo le dovolj veliko, najbolje kvadratno stekleno posodo. Vanjo damo nekaj mulja, ki smo ga dobili v bližnjem potoku, vodo (lahko je vodovodna) in rastlino. Po navodilih proizvajalca dodajamo tudi gnojilo za vodne rastline (npr. TetraPlant PlantaMin), ki ga lahko kupimo v trgovinah za male živali. Ker se ta rastlina hitro razrašča, je potrebno populacijo redčiti. Mala vodna leča je tudi del prehrane mnogim ribjim vrstam, na primer zlatim ribicam, zato jo lahko dodamo v akvarij. Potrebno pa je biti pozoren, da ni preveč rib, saj lahko uničijo rastlinsko populacijo. V akvarij lahko dodamo tudi druge vodne rastline iz lokalnega potoka ali mlake, kot je npr. vodna kuga (*Elodea canadensis*). Tako oblikujemo umetni ekosistem, ki ga lahko pri učnem procesu uporabljam že od prvega razreda dalje, ko se z učenci pogovarjam o ekosistemu, ali prehranjevalni verigi, o posameznih značilnostih rib ali vodnih rastlin, o gojenju organizmov, itd.

Namesto rib lahko v akvarij z malo vodno lečo vključimo vodne bolhe (*Daphnia s.p.*). Hranimo jih s kvasovkami, tudi mlekom, v posodo pa dodamo le toliko kvasa, da je voda zelo rahlo motna, sicer lahko vodne bolhe poginejo. Raje dodajamo premalo kot preveč hrani.

Pregledala sem učne načrte za naravoslovje in tehniko (četrti in peti razred), naravoslovje (šesti in sedmi razred), biologijo (osmi in deveti razred) ter za izbirne predmete (sedmi, osmi in deveti razred).

- Naravoslovje in tehnika 5. razred. Pri vsebini Voda – Onesnažena voda in čiščenje voda pripravimo poskus, v katerem malo vodno lečo gojimo v vodovodni vodi, vodi z detergentom in morda vodi iz okoliškega potoka, reke. Po tednu ali dveh bi že lahko opazili spremembe na rastlinah, ki so rasle v različnih vodah.
- Isti poskus bi lahko vključili tudi v predmet Naravoslovje za sedmi razred, ko se učitelj z učenci pogovarja o virih onesnaževanja celinskih voda in morja. Malo vodno lečo bi lahko izpostavili različnim koncentracijam kovine. Že prej sem omenila, da kadmij ni primeren, lahko pa uporabimo baker ali cink.
- Pri Biologiji v osmem razredu učenci spoznavajo ekologijo in ob tem tudi nekatere škodljive vplive na okolje. Čeprav tej temi ni namenjenega veliko časa, pa bi lahko poskus izvedli na podoben način, kot je opisan v naslednjem odstavku.
- Pri izbirnem predmetu Rastline in človek učenci spoznavajo pomen rastlin za človeka, v katerega lahko vključimo pogovor o pomembnosti fitoremediacije za okolje.
- O negativnih posledicah človekovih posegov v okolje in njihov vpliv na organizme učenci spoznavajo tudi pri izbirnem predmetu Organizmi v naravnem in umetnem okolju. Te skupine so heterogene, saj so sestavljeni iz sedmošolcev, osmošolcev in devetošolcev. Tako lahko starejši učenci pomagajo mlajšim pri pripravi poskusa. Starejši lahko pripravijo posode z vodo, kovino in gnojilom, mlajši učenci pa pripravijo določeno število členkov in gojilne posodice pokrijejo s preluknjano prozorno živilsko folijo. Pri tem rešijo delovni list (primer priloga IV). Pomembno je, da jim razložimo pojem stebelni členek. Posode naj bodo dovolj velike (npr. čaše s prostornino vsaj 200 ml), saj med poskusom tekočina izhlapeva. Gojilne posodice nato učenci postavijo na okensko polico, tako da imajo rastline dovolj svetlobe. Tudi tu je razlog, da ne uporabimo kadmija, saj v stik s poskusom pridejo tudi drugi

učenci, nesreče pa ponavadi niso daleč. Tu jih lahko pustimo vsaj en teden. V vmesnem času učenci dodajajo vodo, da nadomestijo izgube, nastale zaradi izhlapevanja. Po zaključenem poskusu si učenci ogledajo rastline in rezultate opazovanj vpišejo v tabelo (priloga V) ter jih analizirajo. Vpliv kovin lahko nato navežemo tudi na druge onesnaževalce vode. Za pripravo poskusa in pregled rezultatov bi zagotovo potrebovali dve šolski uri.

V vodi, ki je namenjena za prehrano ljudi, je vsebnost bakra omejila EU, in sicer na 2 mg/l (UL L 330/32). Zato je to lahko ena izmed izbranih koncentracij.

## 7.2 PRIMER UČNE PRIPRAVE

Predmet: Organizmi v naravnem in umetnem okolju.

Tematski sklop: Organizmi v naravnem okolju

CILJI:

- spozna vpliv težkih kovin na rastline
- spozna vpliv drugih onesnažil v okolju na organizme
- spozna negativne posledice človekovih posegov in njihov vpliv na organizme
- oblikuje odgovoren odnos do narave in okolja

NOVI POJMI:

stebelni členek

OBLIKE DELA:

Frontalna in individualna oblika, delo v skupinah

METODE DELA:

opazovanje, merjenje, pogovor, razлага, demonstracija, praktično delo

### PRIPOMOČKI

- mala vodna leča (*L. minor*)
- steklene posode (vsaj 200 ml)
- modra galica (vir Cu)
- voda
- gnojilo za vodne rastline (npr. TetraPlant PlantaMin)
- prozorna živilska folija

- pincete
- papirnate brisače
- ravnilo
- rokavice
- vodoodporni flomaster
- učni list 1 (priloga IV)
- učni list 2 (priloga V)

## UČITELJEVA UČNA STRATEGIJA

### 1. ura

<b>UČITELJ</b>	<b>UČENCI</b>
<b>UVOD</b>  Učence razdeli na skupine (štiri skupine (štiri koncentracije) in naj bodo heterogene v starosti).  Učitelj učencem predstavi malo vodno lečo in razloži pojem stebelni členek.  Pred začetkom praktičnega dela razloži in demonstrira celoten potek dela.  Učencem pove, da se morajo pri delu zaščititi in upoštevati varnostne ukrepe.  Učitelj razdeli učni list 1 in material.	Učenci se razdelijo po skupinah.  Poslušajo učitelja, kako bo delo potekalo in kako se morajo pri delu zaščititi.  Pregledajo učni list 1.
<b>IZPOSTAVITEV RASTLINE</b>  Učitelj nadzoruje delo v razredu in po potrebi pomaga učencem.	Vsi opazujejo in merijo rastline ter izpolnijo prvo točko učnega lista 1.  Starejši učenci v skupini pripravijo posode z vodo, kovino in gnojilom, ter jih ustrezno označijo.  Mlajši učenci pripravijo določeno število členkov, izmerijo dolžino koreninic in gojilne posodice pokrijejo s preluknjano prozorno živilsko folijo.  Gojilne posodice postavijo na okensko polico.  Z učiteljem se pogovorijo o svojih opažanjih.
Z učenci se pogovori o njihovih opažanjih.	

**2. ura (čez teden ali dva)**

<b>UČITELJ</b>	<b>UČENCI</b>
<b>REZULTATI</b>	
Z učenci na kratko ponovi dosedanje delo s pomočjo vprašanj.	Učenci odgovarjajo na vprašanja in obnovijo potek izpostavitve rastlin bakru.
Učencem razdeli UL 2.	Pregledajo UL 2.
Razloži potek nadaljnega dela.	Poslušajo nadaljna učiteljeva navodila.
Opozori jih na varnost in uporabo rokavic!	
	Na mizo prinesejo svoje gojilne posode.
Na tablo nariše tabelo, enako tabeli v UL 2 (lahko na prosojnici).	Štejejo število členkov, opazujejo barvo, izmerijo dolžino korenin in členkov rastline.
Z učenci se pogovori o rezultatih.	Opažanja in meritve vpišejo v tabelo (točka 3).
	Vsaka skupina v tabelo na tabli vpiše svoje rezultate. Te rezultate vpišejo tudi v tabelo na UL 2.
	Z učiteljem se pogovorijo o rezultatih
	Odgovorijo na 4. in 5. vprašanje UL2.

## 8 VIRI

- Ambrožič – Dolinšek, J., 2007. Rastline in razstrupljanje okolja, onesnaženega s težkimi kovinami. *Proteus* 70/2: 57-63
- Axtell, N. R., Sternberg, S.P.K., Claussen, K., 2003. Lead and nickel removal using Microspora and *Lemna minor*. *Bioresource Technol.* 89: 41–48
- Balsberg-Påhlsson, A. M., 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut.* 47: 287-319.
- Barazani, O., Dubai, N., Khadka, U.R., Golan-Goldhirsh, A., 2004. Cadmium accumulation in *Allium schoenoprasum* L. grown in an aqueous medium. *Chemosphere* 57: 1213-1218
- Bennet-Chambers, M., Davies, P. and Knott, B., 1999. Cadmium in aquatic ecosystems in Western Australia: A legacy of nutrient-deficient soils. *J. Environ. Manage.* 57: 283–295
- Cheng, J., Landesman, L., Bergmann, B.A., Classen, J.J., Howard, J.W., Yamamoto, Y. T., 2002. Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. *Trans. Amer. Soc. Agric. Eng.* 45(4): 1003-1010
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Habib Ghorbal, M., El Ferjani, E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Sci.* 127: 139-147
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2000. Review: Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 779-795
- Direktiva Sveta z dne 26. septembra 1983 o mejnih vrednostih in ciljih kakovosti v zvezi z izpustom kadmija. Ur. I. ES L 291/1 (83/513/EGS)
- Direktiva Sveta z dne 3. novembra 1998 o kakovosti vode, namenjene za prehrano ljudi Ur. I. ES L 330/32 (98/83/ES)
- Dirilgen, N., 1998. Effects of pH and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. *Chemosphere*, 37/4: 771-783
- Dirilgen, N., Inel, Y., 1994. Effects of Zinc and Copper on Growth and Metal Accumulation in Duckweed, *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 442-449

- Greger, M., 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. V: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds.) – Heavy metal stress in plants – From molecules to ecosystems. Springer, Berlin , 1–28
- Hagemeyer, J., 1999. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. V: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds.) – Heavy metal stress in plants – From molecules to ecosystems, Springer, Berlin , 157–181
- Hegedüs, A., Erdei, S., Horváth, G., 2001. Comparative studies of  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Sci. 160: 1085–1093
- Horvat, T., Vidaković-Cifrek, Ž., Oreščanin, Tkalec, V.M., Pevalek-Kozlina, B., 2007. Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L. Sci. Total Environ. 384: 229–238
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C., 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiol. Biochem. 45/1: 62-69
- Iannelli, M.A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. Plant Physiol. Biochem. 40: 977-982
- ISO, 2001. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. V: International Organization for Standardization, International Standard ISO, 20079
- Lu, X., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Hompok, K., 2004. Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*. Sci. Asia 30: 93-103
- Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, J., Ravnik, V., Podobnik, A., Turk, B., Vreš, B., (1999). Mala flora Slovenije, ključ za določanje praprotnic in semenk. 3. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije
- Mishra, S. , Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.v., Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.. Plant Physiol. Bioshem. 44: 25-37
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci. 7/9: 405-410

- Mukherjee, S., Mukherjee, S., Bhattacharyya, P., Duttagupta, A.K., 2004. Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies. Environ. Int. 30: 811 – 814
- Oporto, C., Arcea, O., Van den Broeck, E., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C. 2006. Experimental study and modelling of Cr (VI) removal from wastewater using *Lemna minor*. Water Res. 40: 1458 – 1464
- Prasad, M.N.V., Strzałka, K., 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. V: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds.) – Heavy metal stress in plants – From molecules to ecosystems, Springer, Berlin, 117–138
- 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. R. Int., 14/3:194-201
- Rellán-Álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández A., del Campo, F., Hernández, L. 2006. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. Plant Soil 279: 41–50
- Sanitá di Toppi, L., Gabbielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp. Bot. 41: 105–130
- Saxena, P.K., KrishnaRaj, S., Dan, T., Perras, M.R., Vettakkorumakankav, N.N., 1999. Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soils. V: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds.) – Heavy metal stress in plants – From molecules to ecosystems. Springer, Berlin, 1–28
- Saygideger, S., Gulnaz, O., Istifli, E.S., Yucel, N., 2005. Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: Effect of physicochemical environment. J. Hazard. Mater. B126: 96–104
- Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. Trends Biochem. Sci., 27/9: 483-486
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, A., Vangronsveld, J., 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. Plant Physiol. Biochem. 43: 437–444
- Smith, S., Kwan, M.K.H., 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

- Teisseire, H., Guy, V. 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Sci.* 153: 65–72
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. Ur. I. RS št. 11/2002
- Uysual, Y., Taner, F. 2007. Effect of cadmium ions on the growth rate of the freshwater macrophyte duckweed *Lemna minor*. *Ekoloji* 62: 9-15
- Wang, Q., Cui, Y., Dong, Y., 2002. Phytoremediation of Polluted Waters Potentials and Prospects of Wetland Plants. *Acta Biotechnol.* 22 ,1—2;199-208
- Wusheng, J., Donghua, L., Wenqiang, H., 2001. Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.). *Bioresource Technol.* 76: 9-13
- Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N., 1998. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants : I. Duckweed. *J. Environ. Qual.* 27/3: 715-721

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Marini Dermastia za mentorstvo in prijaznost.

Najlepša hvala tudi somentorici dr. Jasni Dolenc Koce za naklonjen čas, prijaznost, vso pomoč pri praktični in teoretični izvedbi, nasvete, spodbudo, podporo in potrpežljivost, ki sem jo potrebovala med nastanjem diplomskega dela.

Za koristne nasvete in pomoč pri praktični izvedbi poskusa se zahvaljujem tudi Jaku Razinger.

Hvala prof. dr. Alenki Gaberščik in prof. dr. Barbari Bajd za recenzijo diplomske naloge.

Hvala tudi prijateljicam, ki so in so še vedno ob meni v vzponih in padcih, brez vas bi bilo moje življenje pusto, ter sošolkam in sošolcem, ki so mi popestrili študijske dni.

Najbolj pa bi se zahvalila mami in očetu, ki sta mi omogočila študij, pri tem pa me vzpodbjala in podpirala. Za podporo se zahvaljujem tudi sestri in fantu.

## PRILOGE

### PRILOGA I: Povprečne koncentracije kadmija v tkivih po izpostavitvi

*Lemna minor* je bila za 24 ur izpostavljena navedenim koncentracijam CdCl<sub>2</sub>. Prikazani rezultati so povprečja treh neodvisnih ponovitev ± standardna napaka, za vsako koncentracijo so bile izmerjene po štiri paralelke (n= 12).

konz. CdCl <sub>2</sub> v gojišču (µM)	Povp. konc. Cd v tkivu (µg/g suhe teže)
0	14,4 ± 8,1
0,1	26,0 ± 10,4
1	53,3 ± 15,6
10	690,4 ± 203,0
50	2935,3 ± 134,9
100	4905,6 ± 346,8
500	14286,7 ± 3598,6

### PRILOGA II :Povprečne vrednosti SEA posameznega encima po 24h izpostavitvi

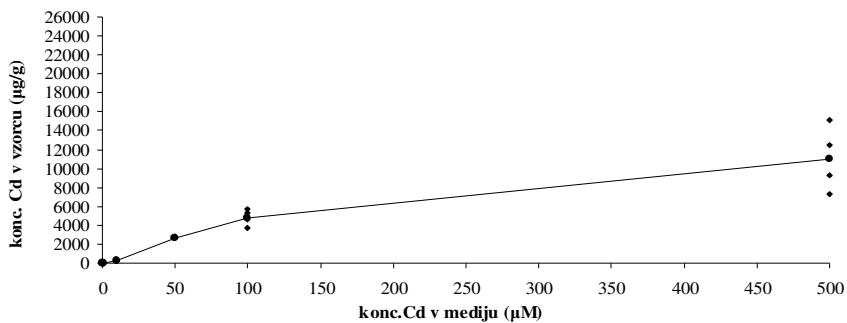
#### CdCl<sub>2</sub>

V tabeli so prikazane povprečne vrednosti SEA (specifična encimska aktivnost) ± standardna napaka za tri neodvisne ponovitve pri posameznih koncentracijah CdCl<sub>2</sub> v gojišču in za vse merjene encime (glutation reduktaza (GR), askorbat peroksidaza (A-POD), guaiakol peroksidaza (G-POD) in katalaza (CAT)). Pri vsaki ponovitvi smo izmerili po štiri paralelke za vsako koncentracijo (n=4). Povdarjeno so prikazana tudi povprečja vseh treh ponovitev za posamezno koncentracijo CdCl<sub>2</sub> in za antioksidativni encim, (n=3).

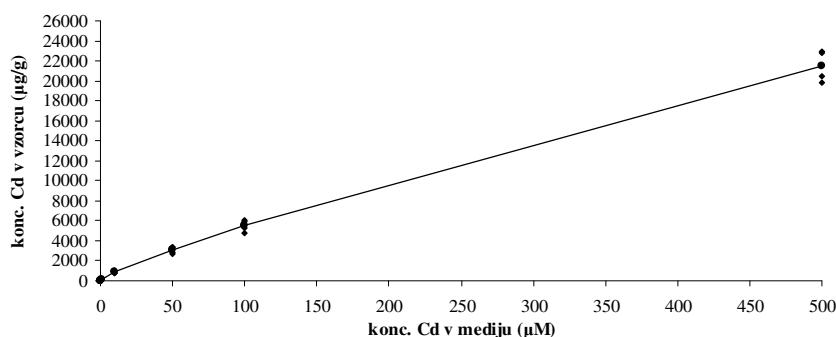
		Konz. Cd gojišču (µM)							
		0	0,1	1	10	50	100	500	menadion
SEA GR (µmol/min *mg)	1.	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
	2.	12,83	17,48	27,35	26,27	40,08	51,99	19,61	15,59
	3.	296,27	315,02	307,96	331,64	391,80	462,05	249,06	194,84
	povprečje	<b>103,04</b>	<b>110,83</b>	<b>111,77</b>	<b>119,31</b>	<b>143,97</b>	<b>171,35</b>	<b>89,56</b>	<b>70,15</b>
SEA APOD (µmol/min *mg)	1.	193,37	205,16	237,52	141,13	80,28	69,66	109,25	138,60
	2.	273,98	288,08	364,26	261,67	296,58	265,44	146,33	56,61
	3.	143,16	167,30	167,93	170,69	124,82	120,17	98,43	82,13
	povprečje	<b>203,50</b>	<b>220,18</b>	<b>256,57</b>	<b>191,16</b>	<b>167,23</b>	<b>151,76</b>	<b>118,00</b>	<b>92,44</b>
SEA G- POD (µmol/min *mg)	1.	340,21	301,15	307,61	324,76	420,57	518,29	422,03	289,98
	2.	339,11	410,94	365,00	476,60	593,92	464,06	454,94	20,51
	3.	189,35	201,32	196,90	210,41	250,39	295,29	159,17	127,74
	povprečje	<b>289,55</b>	<b>304,47</b>	<b>289,84</b>	<b>337,26</b>	<b>421,63</b>	<b>425,88</b>	<b>345,38</b>	<b>146,08</b>
SEA CAT (µmol/min *mg)	1.	17,32	12,80	11,18	7,93	9,31	8,10	10,28	11,98
	2.	12,20	10,64	12,96	10,60	9,95	11,72	7,64	3,91
	3.	4,11	4,34	4,39	4,52	3,76	3,81	2,80	8,56
	povprečje	<b>11,21</b>	<b>9,26</b>	<b>9,51</b>	<b>7,68</b>	<b>7,67</b>	<b>7,88</b>	<b>6,90</b>	<b>8,15</b>

### PRILOGA III: Odvisnost tkivne koncentracije kadmija od koncentracije CdCl<sub>2</sub> v rastnem gojišču

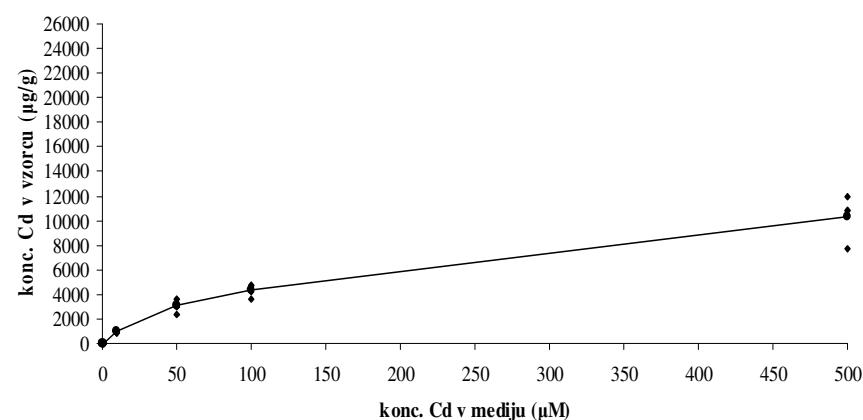
*L. minor* smo za 24 ur izpostavili 0, 0,1, 1, 10, 50, 100 in 500 µM CdCl<sub>2</sub>. Prikazani rezultati so posamezne meritve količine Cd v rastlinskem tkivu treh neodvisnih ponovitev (A, B, C). Za vsako koncentracijo smo pripravili po štiri paralelke (n= 4).



A)



B)



C)

**PRILOGA IV: Učni list za učence na dan nastavitev poskusa**

**UČNI LIST 1  
IZPOSTAVITEV MALE VODNE LEČE BAKRU**

**Priprava poskusa**

Druga skupina, 2 mg modre galice (vir Cu) v litru vode

Ime in priimek: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

1. Oglej si malo vodno lečo in ta opažanja zapiši.

- Barva stebelnih členkov: \_\_\_\_\_
- Dolžina stebelnih členkov: \_\_\_\_\_
- Dolžina koreninic: \_\_\_\_\_
- Drugo : \_\_\_\_\_

Ali je rastlina zdrava?

\_\_\_\_\_

2. Nariši malo vodno lečo in skico ustrezno označi. Nariši tudi izgled pripravljenega poskusa.

3. Zapiši svoja predvidevanja, kako bo baker vplival na malo vodno lečo?

\_\_\_\_\_

**PRILOGA V: Učni list za učence na po enem oziroma dveh tednih**

**UČNI LIST 2  
TEDEN DNI PO IZPOSTAVITVI MALE VODNE LEČE BAKRU**

**Rezultati**

Druga skupina, 2 mg modre galice (vir Cu) v litru vode

- Nariši izgled rastlin in skico ustrezno označi. Z barvicami prikaži spremembe v barvi stebelnih členkov.

- Izpolni!

- Število stebelnih členkov (uporabi rokavice in pinceto!): \_\_\_\_\_
- Barva stebelnih členkov: \_\_\_\_\_
- Dolžina koreninic: \_\_\_\_\_
- Drugo: \_\_\_\_\_

- V tabelo vpiši še podatke drugih skupin.

	1. skupina vodovodna voda	2. skupina 2 mg/l Cu	3. skupina 5 mg/l Cu	4. skupina 10 mg/l Cu
št. členkov				
barva členkov				
dolžina koreninic				
so koreninice odpadle?				

- Pri kateri koncentraciji bakra je zraslo največ členkov? Utemelji odgovor.

---

---

- Kako je baker vplival na rastline? Kakšen pomen ima večanje njegove koncentracije v vodi?

---

---