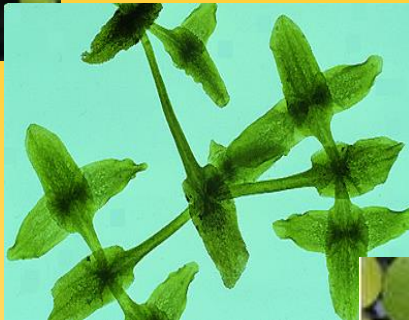
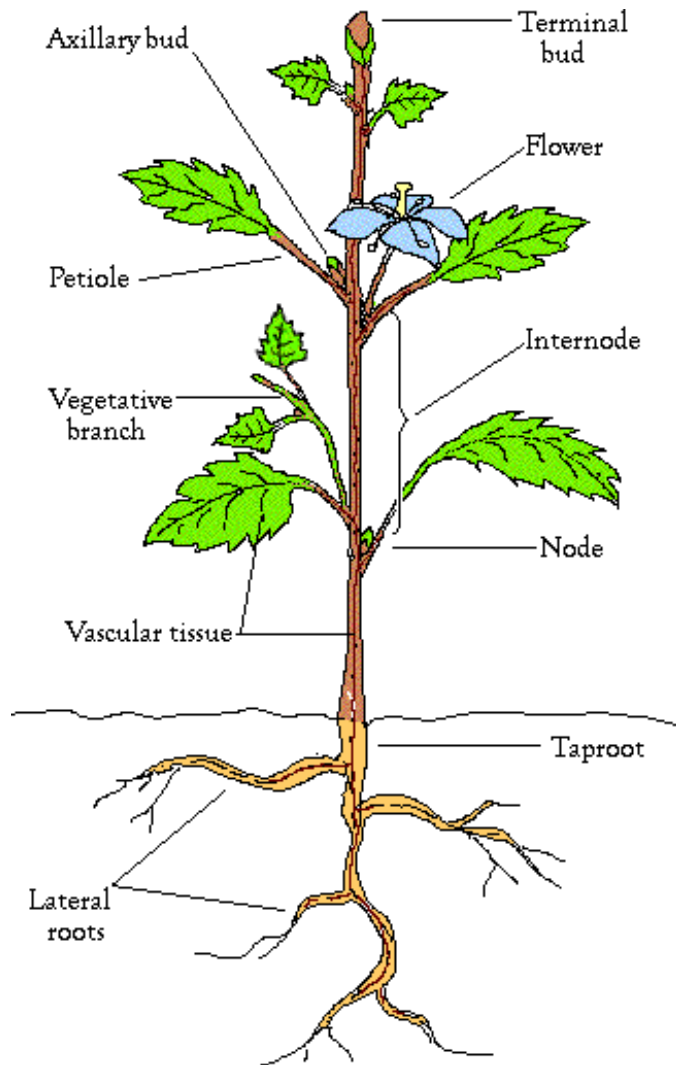


Vodena leća – osobitosti biljke i Lemna-test



Građa tipične biljke



Vodena leća

-biljka, eng. *frond*



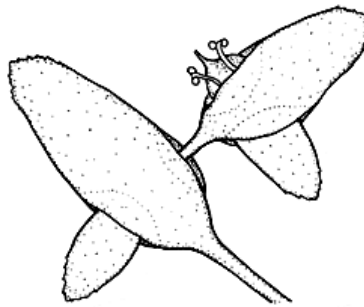
Lemna minor

Razmnožavanje

- vegetativno
- cvjetanje – rijetko, u optimalnim uvjetima



L. gibba



L. trisulca



L. minor - cvjetanje

LEMNA-TEST

-biljni biotest u kojem se prati učinak različitih tvari i drugih
okolišnih faktora na biljke iz porodice *Lemnaceae*
(obuhvaća pet rodova: *Lemna*, *Landoltia*, *Spirodela*, *Wolffia*, *Wolffiella*)

Primjeri biljaka iz porodice *Lemnaceae* pogodnih za biotestove:

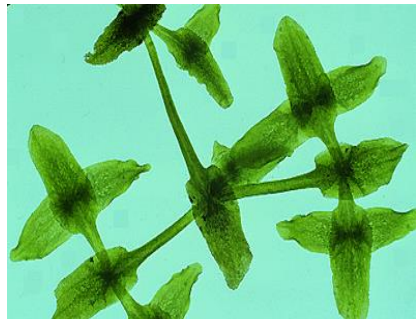
Lemna (*L. minor*, *L. gibba*, *L. trisulca*)

Spirodela (*S. polyrhiza*)

Wolffia (*W. arrhiza*)



Lemna minor



Lemna trisulca



*Spirodela
polyrhiza*



Wolffia arrhiza

ODRŽAVANJE VODENE LEĆE U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

- uvođenje u kulturu (sterilizacija biljaka) → aksenične kulture (ili mogućnost nabave iz zbirki sojeva i klonova)
- održavanje biljaka na tekućoj hranjivoj podlozi u kontroliranim uvjetima (temperatura, svjetlost, hranjiva podloga)

Primjeri hranjivih podloga:

Podloga po Piersonu i Seidelu

Hoaglandova hranjiva podloga uz dodatak

Hellerovih mikroelemenata

Hutnerova podloga, Bristolova, Hillmanova
i dr.

Sastav hranjive podloge:

-mikroelementi

-makroelementi

-organski dodaci (šećeri, aminokiseline...) prisutni u nekim
podlogama, **nisu obavezan sastojak**)

Primjer: hranjiva podloga po Piersonu i Seidelu (1950)

makroelementi	mg dm⁻³	mmol dm⁻³
KNO ₃	400	3,95
KH ₂ PO ₄	200	1,47
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	300	1,21
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	804	5,46
mikroelementi	mg dm⁻³	mmol dm⁻³
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,3	0,0015
H ₃ BO ₃	0,5	0,0081
Na ₂ -EDTA × 2 H ₂ O	18,6	0,049
Fe-citrat	5,0	0,02
organski dodaci	g dm⁻³	mmol dm⁻³
saharoza	10,0	29,2
asparagin	0,1	0,66

pH vrijednost: 4,55

-sterilizacija autoklaviranjem pri 121 °C i 0,15 MPa

Krivulja rasta vodene leće

Faze rasta:

A – lag faza

- prilagođavanje novim uvjetima nakon premještanja biljaka na svježu podlogu
- ”priprema” za rast - biokemijske promjene, dioba stanica i diferencijacija tkiva

B – eksponencijalna faza

- rast** (porast broja i mase) biljaka
- konstantna stopa rasta

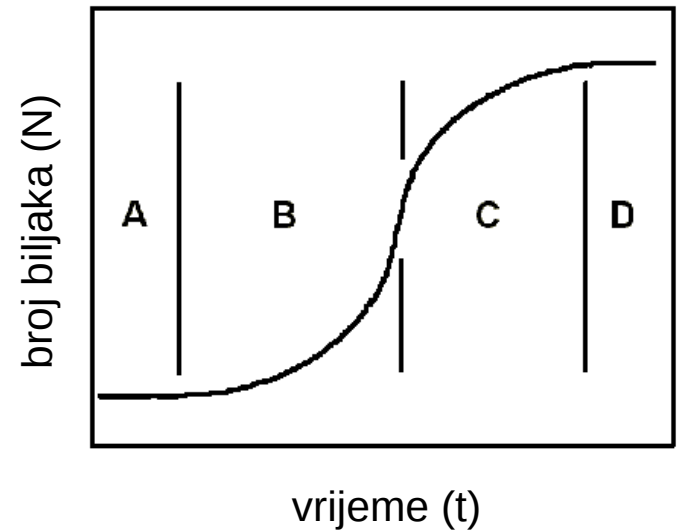
C – prijelazna faza

- faza usporenog rasta i povećanje stope odumiranja biljaka
- posljedica ograničene količine hranjivih tvari

D – stacionarna faza

- pojava novih biljaka te starenje i odumiranje biljaka dolaze u ravnotežu; rast novih biljaka ovisi o hranjivim tvarima koje se oslobađaju odumiranjem i razgradnjom starijih biljaka

- trajanje pojedine faze ovisi o okolišnim / laboratorijskim uvjetima (npr. raspoloživost hranjivih tvari, svjetlost, temperatura...)

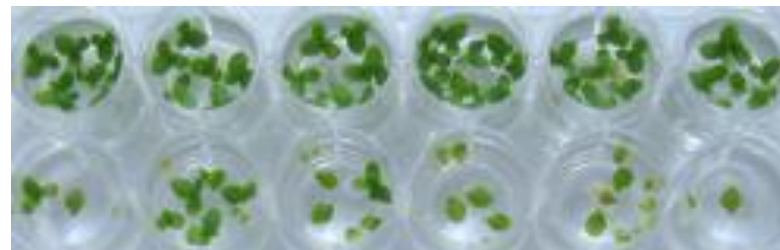


praćenje rasta biljaka
u Lemna testu -u eksponencijalnoj fazi rasta

IZVOĐENJE LEMNA-TESTA

trajanje: 3-21 dan

-kontrolna podloga
-pokusna podloga(e) } usporedba



-važno $\Rightarrow$ sastav hranjive podloge i uvjeti izvođenja testa (temperatura, svjetlost, volumen hranjive podloge) trebaju omogućiti EKSPONENCIJALNI RAST BILJAKA (praćenje rasta biljaka u Lemna testu – u eksponencijskoj fazi rasta)

$$F_t = F_0 e^{kt} \Rightarrow \ln F_t = \ln F_0 + kt$$

F_t – konačni broj biljaka

F_0 – početni broj biljaka

t – vrijeme izvođenja pokusa (dani)

k – nagib pravca (relativna stopa rasta; **RGR** – relative growth rate)

$$\mathbf{RGR} = \frac{\ln F_t - \ln F_0}{t} \quad [\text{day}^{-1}]$$

Huebert, D. B. (1993). Consideration in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. Chem. 12, 481-483.

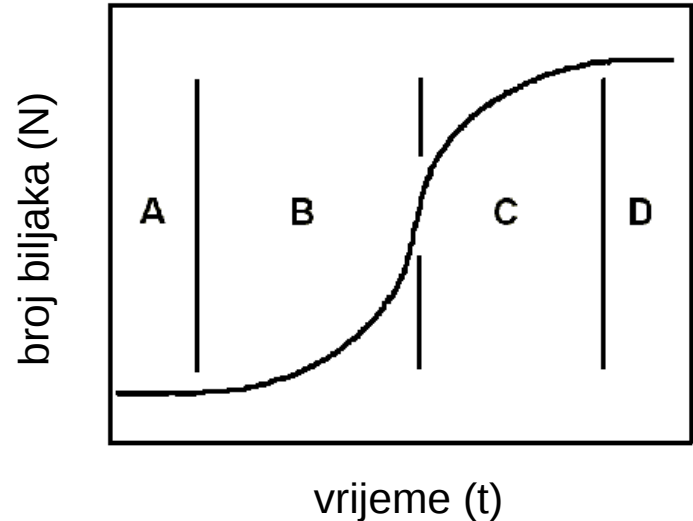
Načini izvođenja Lemna testa

(s obzirom na izmjenu hranjive podloge tijekom izvođenja)

- statički test (najčešći)
- test s periodičkim obnavljanjem hranjive podloge
- protočni test

Trajanje testa ovisi o:

- sastavu hranjive podloge
- načinu izvođenja testa
- ostalim uvjetima izvođenja testa (npr. svjetlost, temperatura)
- svojstvima tvari koja se testira



Pokazatelji učinka istraživanih tvari

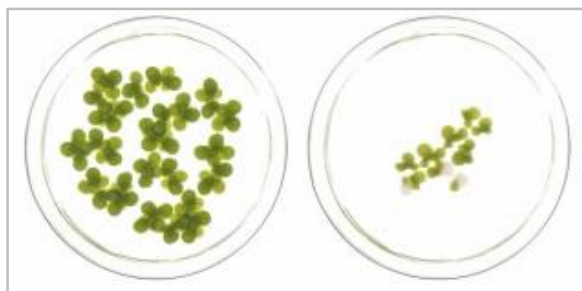
1. izgled biljaka,
 2. prirast broja biljaka,
 3. prirast mase svježih tvari,
 4. omjer mase suhe i svježih tvari,
 5. površina biljaka,
 6. koncentracija fotosintetskih pigmenta,
-
7. ultrastrukturne promjene,
 8. sedimentacijski profil kloroplasta u gradijentu gustoće saharoze,
 9. aktivnost enzima, npr. peroksidaze,
 10. broj izoenzima,
 11. pojava stresnih proteina,
 12. primanje tvari iz hranjive podloge u biljku,
 13. fluorescencija klorofila,
 14. duljina korijena

2. – 6. - pokazatelji učinka koji se koriste u standardiziranom Lemna-testu



1. IZGLED BILJAKA

- veličina biljaka
- pojava kloroze
- nakupine (kolonije) s preklapajućim biljkama (izostanak odvajanja biljaka-kćeri od majčinske biljke)
- uzdignuti distalni kraj biljaka (biljke su samo proksimalnim krajem u dodiru s tekućom hranjivom podlogom)
- tanki listići



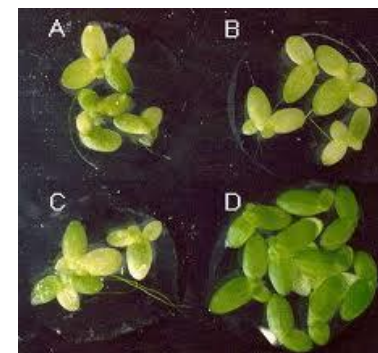
kontrola

učinak Cd



glifozat

kontrola

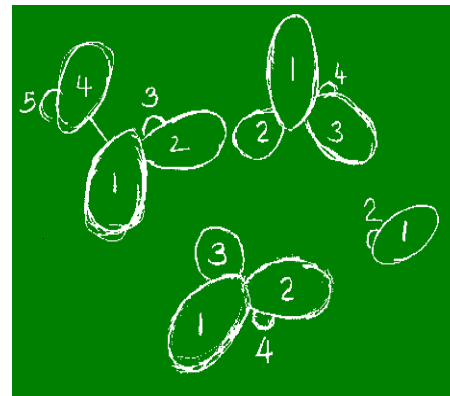


procjena učinka
alelopatskih tvari

*2. PRIRAST BROJA BILJAKA

$$\text{prirast broja biljaka} = \frac{\text{broj biljaka } n\text{-tog dana} - \text{broj biljaka prvog dana}}{\text{broj biljaka prvog dana}}$$

$$n = 3, 5, 8, 10, 12, 14$$



-brojimo svaku biljku koja je vidljiva golim okom

*3. PRIRAST MASE SVJEŽE TVARI

$$\begin{array}{l} \text{prirast mase} \\ \text{biljaka} \end{array} = \frac{\text{m. svježe tvari na kraju pokusa} - \text{m. svježe tvari 1. dana}}{\text{masa svježe tvari 1. dana}}$$

*često se izražavaju i kao RGR; v. standardizirani Lemna-test

4. OMJER MASE SUHE I SVJEŽE TVARI

$$\text{omjer masa suhe i svježe tvari} = \frac{\text{masa suhe tvari na kraju pokusa}}{\text{masa svježe tvari na kraju pokusa}}$$

Oprez prilikom prikaza rezultata: povećan broj biljaka ne znači i veću biomasu (neki toksikanti uzrokuju pojavu većeg broja malih biljaka čija biomasa može iznositi svega 5% u odnosu na biljke koje nisu bile izložene testiranoj tvari)

5. RELATIVNA POVRŠINA BILJAKA

$$\text{relativna površina biljaka} = \frac{\text{površina biljaka na kraju pokusa}}{\text{broj biljaka 1. dana}}$$

6. SADRŽAJ I KOLIČINA FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

-spektrofotometrijska metoda po Arnonu (1949) ili Lichtenthaleru (1987) - klorofil *a*, klorofil *b* i ukupni karotenoidi

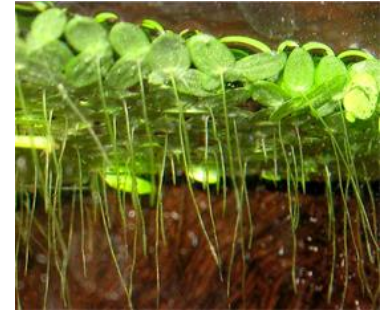
Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382.

-metoda HPLC

-osim određivanja klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, omogućuje razdvajanje i određivanje koncentracije feofitina te pojedinih karotenoida (npr. α i β -karotena, luteina, neoksantina, anteraksantina, violaksantina)

14. DULJINA KORIJENA

- uloga korijena vodene leće – položaj biljke
- sadrži kloroplaste



Pokazatelj toksičnosti:

- rast korijena, nakon rezanja
- visoka osjetljivost, kratkotrajnost testa (48 sati)
- usporedba učinka Ag, Cd, Cr, Cu i Hg na tri vrste - *Lemna gibba*, *L. minor* i *L. paucicostata*

Park, A., Kim, Y.-J., Choi, E.-M., Brown, M. T., Han, T. (2013).
A novel bioassay using root re-growth in *Lemna*. *Aquatic Toxicol.*
140-141, 415-424.

osjetljivost vodene leće ⇔ tolerancija nekih toksikanata

-visoki kapacitet za bioakumulaciju
toksikanata

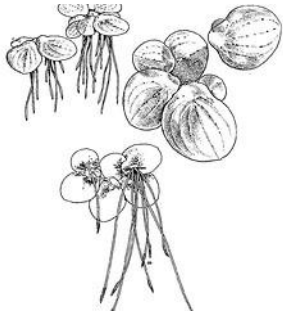
Je li vodena leća pogodna za fitoremedijaciju?

Fitoremedijacija – primjena biljka za uklanjanje organskih i anorganskih tvari iz tla i vode u cilju pročišćavanja

Literatura

Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., Gert Dudel, E. (2014). The Lemna Bioassay: Contemporary Issues as the Most Standardized Plant Bioassay for Aquatic Ecotoxicology, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44:2, 154-197.

Test inhibicije rasta barske leće *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden



-u testu se koriste dormantni stadiji vrste *S. polyrhiza*, tzv. zimski pupoljci ili turioni (engl. turions)

-test se izvodi na pločici s jažicama

-trajanje: tri dana

-**promatrani pokazatelj učinka:**

-„klijanje” i rast vegetativnih pupova (turiona), **na temelju mjerenja ukupne površine biljke**

-izražavanje rezultata: inhibicija rasta u usporedbi s kontrolom

