

Fitotoksično djelovanje imidazolijeve ionske tekućine (C4MIM) (BF4) na klijanje i rast ječma

Honomihl Feldin, Marina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:149679>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



VELEUČILIŠTE U KARLOVCU
Karlovac University of Applied Sciences

Repository / Repozitorij:

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

VELEUČILIŠTE U KARLOVCU

Stručni studij prehrambene tehnologije

Usmjerenje: prerada mlijeka

MARINA HONOMIHL FELDIN

**Fitotoksično djelovanje imidazolijeve ionske tekućine
[C₄MIM][BF₄] na klijanje i rast ječma**

ZAVRŠNI RAD

Mentor: Ines Cindrić, dipl.ing.

Komentor: Dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković, izv.prof.

Matični broj:0314613091

Karlovac, rujan 2015.

Zahvaljujem se komentorici dr. sc. Ivani Radojčić Redovniković, izv. prof., na razumijevanju, strpljenju i savjetima prilikom izrade i pisanja ovog rada. Veliko hvala i dr. sc. Marini Cyjetko Bubalo na stručnoj pomoći i savjetima te svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na PBF-u u Zagrebu. Zahvaljujem se i mentorici Ines Cindrić, dipl.ing na susretljivosti i savjetima. Posebno zahvaljujem kolegici Karli Hanousek na pomoći i društvu tijekom izrade ovog rada, pogotovo tijekom ekstrakcija. Hvala mojoj majci koja je uvijek spremno uskočila pomoći u kući da bih se ja mogla posvetiti studiranju. Veliko hvala mom suprugu i kćeri na iznimnom strpljenju i čeličnim živicima tokom mog produženog studiranja.

ZAVRŠNI RAD

FITOTOKSIČNO DJELOVANJE IMIDAZOLIJEVE IONSKE TEKUĆINE [C₄MIM][BF₄] NA KLIJANJE I RAST JEČMA

Marina Honomihl Feldin, 0314613091

Sažetak: Ionske tekućine se definiraju kao organske soli koje su pri sobnoj temperaturi u tekućem stanju i tale se pri temperaturi nižoj od 100°C. Zbog jedinstvenih svojstava poput nezatne hlapljivosti, nezapaljivosti i dobre stabilnosti te posebice mogućnosti reciklacije, ionske tekućine se koriste kao zamjena za tradicionalna organska otapala. Da bi se mogle koristiti u industrijskim omjerima, potrebno je istražiti njihovu toksičnost i mogući utjecaj na zdravlje ljudi i okoliš. U ovom radu ispitan je utjecaj 1-butil-3-metilimidazolijevog tetrafluoroborata na rast i klijanje ječma (*Hordeum vulgare*). Rezultati istraživanja pokazali su da je nakon 7-dnevnog uzgoja ječma pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine dokazana toksičnost na rani razvoj i rast klijanaca ječma, pri čemu toksičnost raste s povećanjem koncentracije ionske tekućine. Uočena je povećana aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX) te povećani sadržaj neproteinskih tiola što ukazuje na sudjelovanje u obrani od oksidativnog stresa uzrokovanog ionskim tekućinama, dok antioksidativni sustav klijanaca nakon izlaganja većim masenim koncentracijama ionskih tekućina ne može učinkovito ukloniti kisikove reaktivne čestice koji uzrokuje lipidnu peroksidaciju i oštećenja fotosintetskog sustava.

Ključne riječi: antioksidativni enzimi, ionske tekućine, ječam, toksičnost

FINAL WORK

PHYTOTOXIC EFFECT OF IMIDAZOLIUM IONIC LIQUID [C₄MIM][BF₄] ON THE GERMINATION AND GROWTH OF BARLEY

Marina Honomihl Feldin, 0314613091

Abstract: Ionic liquids are defined as organic salts that are in a liquid state at room temperature and with melting points below 100°C. Due to their features such as very low vapour pressure, non-flammability, great stability, and especially their recycle potential, ionic liquids are extensively studied as a substitute for traditional organic solvents. To use ionic liquids on the industrial scales, it is necessary to investigate their toxicity and their potential effect on human health and the environment. Therefore, in this study the impact of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate on the germination and growth of barley (*Hordeum vulgare*) is investigated. The results showed that after a 7-day cultivation of barley at different concentrations of ionic liquid, toxic effect on the early growth and development of barley is proven, while the toxic effect grows by increasing the concentration of ionic liquid. Increased activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), nonspecific peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APOX) and increased content of non-protein thiols was observed, which indicates their participation in the plant defence mechanism against oxidative stress caused by ionic liquids. However, when seedlings were exposed to higher concentrations of ionic liquid, antioxidant system couldn't effectively remove reactive oxidative particles, leading to lipid peroxidation and damage to the photosynthetic system.

Keywords: antioxidant enzymes, barley, ionic liquids, toxicity

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. IONSKE TEKUĆINE..... | 2 |
| 2.1.1. Struktura i svojstva ionskih tekućina | 2 |
| 2.1.2. Primjena ionskih tekućina | 5 |
| 2.1.3. Ionske tekućine kao <i>zelena</i> otapala..... | 6 |
| 2.1.4. Toksičnost i biorazgradivost ionskih tekućina..... | 7 |
| 2.2. BILJKE I OKSIDATIVNI SRES | 9 |
| 2.2.1. Reaktivne kisikove čestice (ROS) i oksidativni stres..... | 9 |
| 2.2.2. Zaštita od oksidativnog stresa | 11 |
| 2.2.3. Enzimski antioksidansi | 12 |
| 2.2.4. Neenzimski antioksidansi | 14 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 16 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 16 |
| 3.1.1. Biljni materijal | 16 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 16 |
| 3.1.3. Otopine i puferi | 17 |
| 3.1.4. Oprema..... | 18 |
| 3.2. METODE RADA | 19 |
| 3.2.1. Provedba pokusa | 19 |
| 3.2.2. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata | 19 |
| 3.2.3. Određivanje lipidne peroksidacije i H ₂ O ₂ | 19 |
| 3.2.4. Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina | 20 |
| 3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima stresa | 21 |
| 3.2.6. Određivanje sadržaja neproteinskih tiola..... | 22 |
| 3.2.7. Obrada podataka | 23 |
| 4. REZULTATI..... | 24 |
| 4.1. Utjecaj ionske tekućine na klijanje ječma | 24 |
| 4.2. Pokazatelji stresa klijanaca ječma nakon tretmana s ionskim tekućinama..... | 25 |
| 4.3. Antioksidativni obrambeni sustav klijanaca ječma nakon izlaganja ionskoj tekućini .. | 27 |
| 5. RASPRAVA..... | 30 |

| | |
|-----------------------|----|
| 6. ZAKLJUČCI..... | 32 |
| 7. LITERATURA..... | 34 |
| 8. POPIS PRILOGA..... | 35 |

1.UVOD

Tijekom razvoja visoke tehnologije i napretka, upotrebljavaju se mnogi proizvodi kemijske, petrokemijske, farmaceutske i agrokemijske industrije koji mogu imati negativne učinke na okoliš i ljude. Njihova neprimjerena primjena i zbrinjavanje predstavljaju veliku opasnost za cijeli ekosustav što se očituje u onečišćenju vode, tla i zraka te globalnim klimatološkim promjenama. Posljednjih godina također raste svijest ljudi o zaštiti okoliša, stoga se velika pozornost pridaje razvoju *zelenih*, ekološki prihvatljivih i održivih tehnologija, među ostalim i ekološki prihvatljivih i neškodljivih otapala koja se mogu reciklirati. Idealno otapalo treba biti kemijski i fizički stabilno, male hlapljivosti, jednostavno za upotrebu i recikliranje te s mogućnošću ponovne upotrebe. Zbog svojih jedinstvenih svojstava, ionske tekućine su pogodne za brojne primjene u kojima konvencionalna organska otapala nisu dovoljno učinkovita ili nisu primjenjiva. Budući da je broj mogućih kemijskih struktura ionskih tekućina iznimno velik, mogućnost njihova dizajniranja za specifične namjene čini ih jedinstvenim otapalima za raznovrsnu upotrebu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima te procesima ekstrakcije i separacije biološki važnih komponenata.

Iako bi se upotrebom ionskih tekućina smanjilo onečišćenje zraka, one mogu dospjeti u tlo, površinske i podzemne vode te se tako nakupljati u prirodi i višim organizmima. Zbog toga je potrebno detaljno ispitati utjecaj ionskih tekućina na čovjeka i okoliš prije njihove upotrebe u industrijskom mjerilu.

Stoga je cilj ovog rada ispitati utjecaj 1-butil-3-metilimidazolijevog tetrafluoroborata na klijanje i rast ječma (*Hordeum vulgare*) te odrediti biokemijske pokazatelje izazvanog oksidativnog stresa mjerenjem količine fotosintetskih pigmenata i količine H₂O₂ te količine malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije. Nadalje, cilj je i odrediti potencijalne mehanizme zaštite od oksidativnog stresa uzrokovanog izloženosti ječma ionskim tekućinama mjerenjem aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX) kao i sadržaja neproteinskih tiola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. IONSKE TEKUĆINE

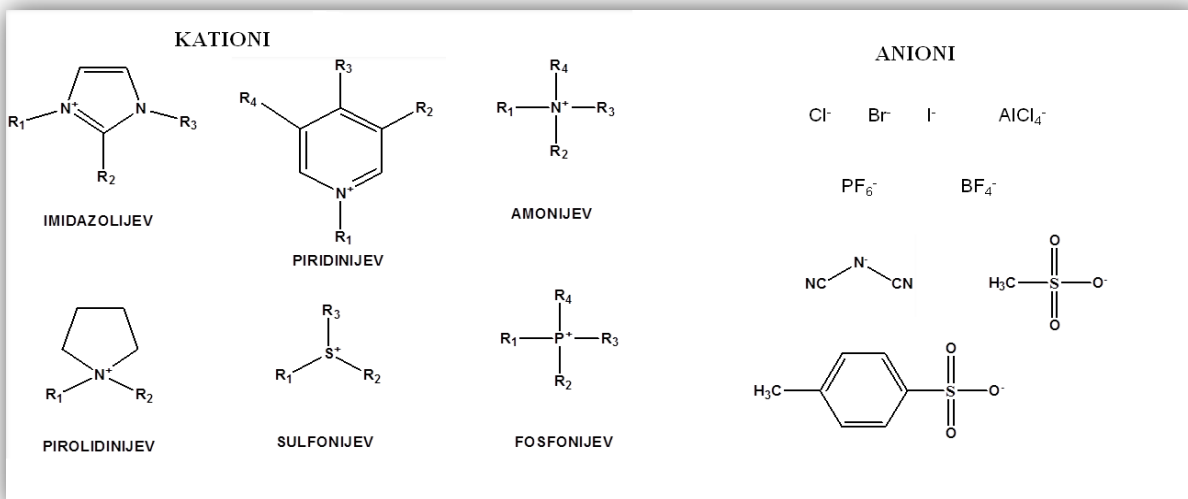
2.1.1. Struktura i svojstva ionskih tekućina

Ionske tekućine (*eng.* Ionic Liquids, ILs) su organske soli s temperaturom tališta nižom od 100 °C. Njihova specifičnost jest u tome što, za razliku od klasičnih otapala, nisu građene od molekula, već od iona. Ionske tekućine se sastoje od velikog organskog kationa i organskog ili anorganskog aniona, koji je obično slabo bazičan (Slika 1).



Slika 1. Ionske tekućine (Schwartz, 2009)

Organski kationi prisutni u ionskim tekućinama su derivati imidazola, piridina, piperidina, pirolidina, amonijevi te rjeđe fosfonijevi kationi. Anioni prisutni u ionskim tekućinama mogu biti jednostavni halogenidi ($[Br]$, $[Cl]$), ali i složeniji spojevi poput tetrakloraluminata ($[AlCl_4]^-$), heksafluorofosfata ($[PF_6]^-$), tetrafluoroborata ($[BF_4]^-$), bis(trifluormetilsulfonyl)imida ($[N(SO_2CF_3)_2]^-$), alkil-sulfata ($[RSO_4]^-$), alkil-sulfonata ($[RSO_3]^-$), *p*-toluensulfonata ($[CH_3C_6H_4SO_3]^-$), acetata ($[CH_3CO_2]^-$), dicijanamida ($[N(CN)_2]^-$) i trifluoracetata $[CF_3CO_2]^-$. (Kärkkäinen, 2007). Neki od tipičnih kationa i aniona koji ulaze u sastav ionskih tekućina prikazani su na slici 2.



Slika 2. Neki tipični kationi i anioni koji ulaze u sastav ionskih tekućina (Perić i sur., 2012)

Niska temperatura tališta je najistaknutije svojstvo ionskih tekućina, a posljedica je male vrijednosti energije kristalne rešetke zbog velikih i asimetričnih kationa i aniona pravilne strukture te zbog slabih interakcija između iona koje su uzrokovane delokaliziranim nabojem na kationu i anionu (Earle i Seddon, 2000). Ionske tekućine posjeduju jedinstvena svojstva poput: slabe hlapljivosti, dobre sposobnosti otapanja anorganskih, organskih i polimernih spojeva, velike toplinske, kemijske i elektrokemijske stabilnosti, nezapaljivosti, velike viskoznosti te strukturalne fleksibilnosti (Wasserscheid i Welton, 2003). Njihova jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva ovise o strukturi kationa (veličina i simetrija kationa, duljina alkilnih supstituenata na heterocikličkom prstenu, funkcijske skupine i dr.) te o stupnju delokalizacije naboja na anionu. Ionske tekućine imaju nizak tlak para koji je posljedica snažnih Coulombovih sila između iona, dok im temperatura raspada ovisi o tipu aniona. Mogu se miješati s većinom organskih otapala, ali ne i s vodom te drugim nepolarnim otapalima što omogućava njihovu primjenu u dvofaznim sustavima. Njihova velika viskoznost opada s porastom temperature i asimetrije aniona, a polarnost ionskih tekućina je između vode i kloriranih otapala te zato imaju dobru sposobnost otapanja organskih, anorganskih i polimernih spojeva (Yang i Pan, 2005). Najznačajnija fizikalno-kemijska svojstva ionskih tekućina prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva ionskih tekućina (Perić i sur., 2007).

| Fizikalno-kemijsko svojstva | Vrijednosti |
|---------------------------------|--|
| Temperatura raspada | 150 – 500 °C |
| Temperatura taljenja | < 100 °C (do 239 °C) |
| Temperaturni raspon tekuće faze | - 96 – 300 °C |
| Toplinska vodljivost | 0,117 – 0,199 W m ⁻¹ K ⁻¹ |
| Dielektrična konstanta | ≤ 30 |
| Električna vodljivost pri 25 °C | < 0,6 S m ⁻¹ (do 11,9 S m ⁻¹) |
| Zapaljivost | nezapaljivo |
| Tlak pare | zanemariv |
| Viskoznost | 0,013 – 0,22 Pa s (do 1,02 Pa s) |

Posebno zanimljivo jest da se određena fizikalno-kemijska svojstva, kao što su topljivost, talište, polarnost, hidrofobnost, miješanje s drugim otapalima, viskoznost, indeks loma i gustoća, mogu podesiti određenim modifikacijama strukture kationa i aniona (Hagiwara i Ito, 2000). Zbog velikog broja različitih kombinacija kationa i aniona, velik je i broj mogućih kemijskih struktura ionskih tekućina s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima. Upravo se zbog toga ionske tekućine opisuju kao „dizajnirana otapala“ (*eng.* designer solvents) jer se njihova svojstva mogu prilagoditi zahtjevima određenog procesa. Procijenjeno je da je moguće pripremiti 10^{18} strukturno različitih ionskih tekućina što omogućava njihovu raznovrsnu primjenu kemijskoj sintezi i katalizi, elektrokemiji te separacijskim tehnikama (Ajam, 2005; Kärkkäinen, 2007).

Danas su mnoge ionske tekućine komercijalno dostupne, a mogu se pripremiti relativno jednostavnim postupcima. Naime, postupak sinteze ovih spojeva odvija se u dva koraka: priprava željenog kationa reakcijom kvaternizacije tercijarnog amina ili fosfina s odgovarajućim alkilirajućim reagensom te izmjena aniona solima ili kiselinama koje sadrže željeni anion (Deetlefs i Seddon, 2010). Prvu ionsku tekućinu sintetizirao je 1914. g. P. Walden za vojne potrebe, a danas su u literaturi opisani postupci priprave za oko 10^3 različitih ionskih tekućina. Badische Anilin- and Soda- Fabrik (BASF) je 2003. godine razvio prvu industrijsku pripravu ionskih tekućina, a danas mnoge tvrtke (npr. Ionic Liquids Technologies, Merck, Sigma-Aldrich, Cytec, Solvent Innovation) proizvode ionske tekućine

visoke čistoće u velikim količinama, a na zahtjev potrošača pripremaju i nove, nekomercijalne ionske tekućine.

2.1.2. Primjena ionskih tekućina

Ionske tekućine su se prvo počele upotrebljavati kao otapala u elektrokemiji (elektroliti u baterijama i kondenzatorima) te u gorivima i solarnim ćelijama, zbog dobre električne provodljivosti. Primjenjuju se u biotehnologiji u različitim (bio)katalizama i pročišćavanju proteina. U (bio)katalitičkim reakcijama one se mogu koristiti kao otapalo ili sredstvo za imobilizaciju (bio)katalizatora te kao sredstvo za ekstrakciju. Zbog netopljivosti ionskih tekućina u velikom broju organskih otapala mogu se koristiti u dvofaznim sustavima, npr. za uklanjanje metala iz otpadnih voda i uklanjanje sumpornih spojeva iz plinova. Također, mogu se koristiti kao stacionarne faze u kromatografiji i u masenoj spektrofotometriji, u separacijskoj tehnologiji kao tekući kristali, kao predlošci za sintezu nanomaterijala te pri izradi visokovodljivih materijala. Ionske tekućine koriste se i kao medij za pohranjivanje latentne topline, a u farmaceutici kao dezinficijensi i proizvodi za osobnu njegu. Svoju ulogu su našle i u reakcijama polimerizacije, konverziji biomase te otapanju i regeneraciji celuloze. Podjela primjene ionskih tekućina prikazana je na **slici 3**.



Slika 3. Područja primjene ionskih tekućina (Pham i sur., 2010)

Budući da imidazolijeve ionske tekućine posjeduju svojstvo fluorescencije mogu se upotrijebiti kao biološki marker za droge te za obilježavanje DNA i proteina. Ispituje se i njihova učinkovitost kao inhibitora korozije, površinski aktivnih tvari te u analitici kao otapala za titracije (Ajam, 2005; Tholey i Heinzle, 2006, Perić i sur., 2012; Tang i sur., 2012).

2.1.3. Ionske tekućine kao zelena otapala

U posljednje vrijeme velik broj istraživanja je usmjeren prema primjeni novih, sigurnijih i ekološki prihvatljivijih procesa proizvodnje, a sve s ciljem zaštite okoliša. Zadaća održivih tehnologija je korištenje kemikalija koje su manje opasne za ljudsko zdravlje i okoliš. Nova grana kemije koja se bavi ovom problematikom je *zelena kemija*. *Zelena kemija* temelji se na 12 načela, a podrazumijeva primjenu manje toksičnih i eko-kompatibilnih kemikalija, dobivanje ekološki prihvatljivih proizvoda, reciklaciju, korištenje obnovljivih izvora energije i sirovina te smanjenje štetnih nusproizvoda. Konvencionalna organska otapala koja imaju široku primjenu u industriji su hlapljiva te time utječu na zagađenje zraka, promjenu klimatskih uvjeta i narušavanje ljudskog zdravlja. Također njihova reciklacija i ponovna upotreba zahtijeva skupe i energetske neprihvatljive procese. Ionske su tekućine privukle pažnju u znanstvenim i širim krugovima zbog jedinstvenih svojstava poput odlične sposobnosti otapanja za veliki broj spojeva, velike toplinske stabilnosti, nezapaljivosti i vrlo niskog tlaka para. Također, zbog već navedenog niskog tlaka para te nehlapljivosti, a time i njihove neznatne emisije u atmosferu i povećane sigurnosti za procese u kojima se koriste, ionske su tekućine okarakterizirane kao *zelena* otapala (Coleman i Gathergood, 2010) odnosno, kao potencijalna zamjena za opasna i lako hlapljiva organska otapala koja su sveprisutna u industriji. Najveća je prednost ionskih tekućina mogućnost reciklacije i ponovne upotrebe što je i osnovni cilj održivih tehnologija.

Pri sintezi ionskih tekućina koriste se sirovine poput imidazola i halogenalkana koje se dobivaju iz nafte i time ne pripadaju skupini *zelenih* i prihvatljivih kemikalija. Također, tijekom pripreme ionskih tekućina koriste se organska otapala, dok je sam postupak sinteze povezan sa znatnom potrošnjom energije. Stoga brojna istraživanja kreću u smjeru razvijanja isplativijeg i ekološki prihvatljivijeg postupka sinteze mikrovalnom i ultrazvučnom aktivacijom te korištenje neškodljivih otapala ili provedba reakcija bez otapala. Iako su ionske tekućine slabo hlapljive te ne uzrokuju onečišćenje zraka, one mogu onečistiti tlo i vodu

neopreznim izljevanjem u okoliš. Budući da je većina ionskih tekućina topljiva u vodi i imaju sličan koeficijent difuzije kao konvencionalna organska otapala i anorganske soli, ionske tekućine mogu uzrokovati kontaminaciju vode. Ionske tekućine su vrlo stabilne i slabe biorazgradivosti što predstavlja problem kod odlaganja (Zhao i sur., 2007). Na taj način se mogu nakupljati u prirodi i višim organizmima.

2.1.4. Toksičnost i biorazgradivost ionskih tekućina

U skladu s načelima *zelene kemije* kemijski produkti trebali bi biti neškodljivi za okoliš, biorazgradivi te niske toksičnosti. Do sada su provedena brojna istraživanja na različitim organizmima, od bakterija i kvasaca do biljaka i uzgojenim kulturama životinjskih stanica, a sve s ciljem da se procijeni učinak ionskih tekućina na zdravlje ljudi i okoliš. Istraživanja su pokazala da su ionske tekućine umjereno do jako toksične ili čak toksičnije od organskih otapala koje bi trebale zamijeniti (Liu i sur., 2010; Thuy Pham i sur., 2010).

Uočeno je da je kemijska struktura ionske tekućine u izravnoj vezi s toksičnošću. Naime, toksičnost ovisi o strukturi kationa te se povećava produljenjem alkilnog lanca vezanog na heterociklički prsten, a pokazalo se da su ionske tekućine s imidazolijevim heterocikličkim prstenom toksičnije od onih s morfolinijevim odnosno piridinijevim prstenom (Thuy Pham i sur., 2010). Također, prema dosadašnjim saznanjima, čini se da struktura aniona manje utječe na toksičnost ionske tekućine, no dokazano je da su ionske tekućine s PF_6^- , BF_4^- i $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{N}^-$ anionom toksičnije od aniona koji u sebi ne sadrže fluor, poput Br^- , Cl^- , NO_3^- i CH_3COO^- . U literaturi se često ta činjenica povezuje s hidrolizom fluoriranih aniona pri čemu nastaju fluoridi koji su potencijalni inhibitori $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaze}$ (enzim koji sudjeluje u održavanju statičnog električnog potencijala stanice i transportu te regulira stanični volumen) (Fatemi i Izadyian, 2011).

Istraživanja pokazuju da je toksičnost ionskih tekućina izravno povezana s disrupcijom stanične membrane. Naime, dugi alkilni lanci, često prisutni u kationima ionskih tekućina, povećavaju lipofilni karakter ovih spojeva, što povećava mogućnost njihove interakcije s fosfolipidnim dvoslojem stanične membrane, kao i hidrofobnim domenama membranskih proteina. Posljedično dolazi do disrupcije fiziološke funkcije membrane, izlivanja staničnog sadržaja te stanične smrti (Ranke i sur., 2004; Stepnowski i sur., 2004). Općenito, povezanost lipofilnosti i toksičnosti česta je pojava u toksikologiji i naziva se narkoza (*eng.* narcosis) (kod

sisavaca) ili bazična toksičnost (kod vodenih organizama). Ovaj efekt temelji se na činjenici da povećanje prijenosa neke tvari preko membrane dovodi do veće koncentracije tvari unutar stanice, a samim time i do jačeg toksičnog efekta (Ranke i sur., 2004).

Uz staničnu membranu, stanična stijenka ima važnu ulogu u toksičnosti ionskih tekućina. Kako je stanična stijenka ključna za održavanje stanične morfologije, a djeluje i kao barijera protiv mehaničkog stresa i promjena u okolini, razlike u osjetljivosti različitih organizama u literaturi se često povezuju s postojanjem stanične stijenke i njenom strukturom. Kulacki i Lamberti (2008) te Latala i sur. (2009) pokazali su da su dijatomeje, zbog funkcionalnih skupina koje sadrže silicij prisutnih u staničnoj stijenci, vrlo dobri biosorbensi za kemikalije s nabojem (poput ionskih tekućina), a što se očituje kao veća osjetljivosti na određene toksikante u odnosu na zelene alge. Naime, ti organizmi na površini stanice imaju specifične proteine s kiselim aminokiselinskim ostacima (frustulini, silafini i pleuralini) koji mogu povećati ionsko povezivanje s ionskim tekućinama. Time su omogućene jače interakcije površina stanice – ionska tekućina, što rezultira jačim toksičnim učinkom. Također, autori su ukazali da su među zelenim algama one s celuloznom stijenkom manje otporne nego alge sa stijenkom od glikoproteina.

Većina do sada objavljenih studija usmjerena je prema ispitivanju toksičnosti ionskih tekućina u vodenom ekosustavu. No, slučajnim izljevanjima, odlaganjem otpada ili odrona tla ionske tekućine mogu dospjeti i u tlo. Do općenitih zaključaka teško je doći zbog različitog sastava tla. Međutim, na biodostupnost ionskih tekućina, kao i ostalih ksenobiotika, esencijalan učinak imaju karakteristike tla poput strukture (sadržaj gline i organskih sastojaka koji djeluju kao sorbensi), pH vrijednosti, temperature, vlage i aktivnosti različitih organizama u tlu. U nekoliko studija (Balczewski i sur., 2007; Matzke i sur., 2008) ispitivan je utjecaj strukture bočnog alkilnog lanca i aniona ionskih tekućina na biljke i beskralježnjake u standardnoj njemačkoj vrsti tla Lufa 2.2. Uočeno je da s povećanjem duljine bočnog alkilnog lanca raste toksičnost ionskih tekućina, dok anion uglavnom nema toliko izražen utjecaj na razinu toksičnosti. Toksični učinci ionskih tekućina na morfološke osobine biljaka slični su učincima u slučaju nedostatka hranjivih tvari. Djeluju tako da sprječavaju unos hranjivih tvari u biljku, što dovodi do manjka hranjivih tvari i razvoja bolesti poput kloroze (nedostatak klorofila) (Studzinska i Buszewski, 2008).

Razumijevanje puteva biorazgradnje bilo koje kemikalije važno je za određivanje njenog utjecaja na okoliš. Ionske tekućine uobičajeno su slabo biorazgradive, ali se njihova

svojstva mogu podesiti prilagođavanjem strukture. Primjerice, u brojnim studijama ionske tekućine s imidazolijevim, amonijevim i fosfonijevim kationima pokazale su se nerazgradivima, dok piridinijeve ionske tekućine pokazuju znatno veći stupanj razgradnje (Zhu i sur., 2009).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da ionske tekućine s duljim alkilnim lancima (npr. heksil- i oktil-) imaju značajno veći stupanj biorazgradnje od ionskih tekućina s kraćim lancima. Stupanj biorazgradnje određen je i lipofilnošću ionske tekućine. Tako je dokazana i slaba razgradivost ionskih tekućina s izrazito dugim lancima (npr. dodecil-, heksadecil-) koja je povezana s visokim stupnjem toksičnosti ovih spojeva na mikrobnu zajednicu (Wells i sur., 2006). Biorazgradnja ove skupine spojeva može se poboljšati uvođenjem esterskih, aldehidnih, hidroksilnih, karboksilnih i amidnih grupa te linearnih bočnih alkilnih lanaca (Zhu i sur., 2009).

Znanstvenici upozoravaju da pri provođenju industrijskih procesa treba paziti na izbor ionske tekućine i izbjegavati zagađivanje otpadnih voda. Cilj je dobiti ionske tekućine koje posjeduju što manju toksičnost i što veću biorazgradivost, a to se postiže prilagodbom strukture (ugradnja esterskih ili amidnih grupa) i korištenjem netoksičnih ili obnovljivih prekursora (saharin ili acesulfam) u njihovoj sintezi što predstavlja mogućnost za dizajn ionskih tekućina sigurnih za čovjeka i okoliš (Zhu i sur., 2009). Primjerice, zbog dobre stabilnosti, slabe biorazgradivosti i otpornosti na fotodegradaciju (Stepnowski i Zaleska, 2005), ionske tekućine mogu proći kroz tradicionalne sustave obrade otpadnih voda i postati perzistentnim zagađivačima vodenih ekosustava te posljedično tome dospjeti u tlo navodnjavanjem ili podzemnim vodama. Zbog toga je potrebno odrediti biorazgradnju, bioakumulaciju te toksičnost ionskih tekućina u različitim ekosustavima prije njihove primjene u industrijskom mjerilu.

2.2. BILJKE I OKSIDATIVNI SRES

2.2.1. Reaktivne kisikove čestice (ROS) i oksidativni stres

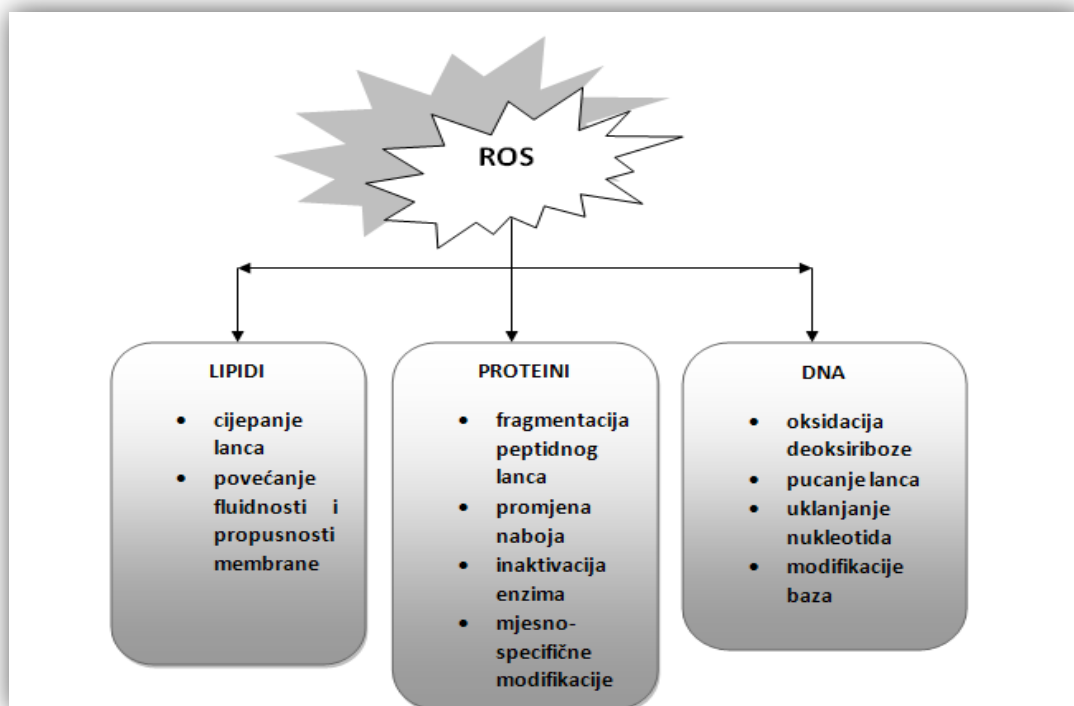
Biljke su neprestano izložene promjenama u okolišu i vanjskim čimbenicima koji negativno utječu na biljku. Čimbenici koji utječu na biljku mogu biti biotički ili abiotički ovisno o tome tko ili što vrši stres nad biljkom. Biotički stres rezultat je štete koju biljci nanose živi organizmi poput fitopatogena, insekata i biljojeda. Abiotički stres uzrokovan je

okolišnim čimbenicima poput oscilacija u temperaturi, intenziteta svjetlosti, manjka ili viška vode (suše ili poplave), onečišćenja zraka, visoke koncentracije soli, teških metala, nedostatak nutrijenata, izloženost UV-zračenju, različitim pesticidima i slično. Svi ovi čimbenici uzrokuju kod biljke oksidativni stres i tako dolazi do pojačanog stvaranja i akumulacije reaktivnih kisikovih čestica (*eng.* Reactive Oxygen Species ili ROS) (Sharma i sur., 2012).

Prvi fotosintetski organizmi koji su proizvodili molekule kisika, zbog čega su ROS postale neizostavni pratitelji aerobnog metabolizma, nastali su evolucijom prije približno 2,7 milijardi godina. ROS su skupina slobodnih radikala ($O_2^{\bullet-}$, superoksidni radikal; OH^{\bullet} , hidroksilni radikal; HO_2^{\bullet} , peroksidni radikal i RO^{\bullet} , alkoksidni radikal) i reaktivnih molekula (H_2O_2 , vodikov peroksid i O_2 , singletni kisik) proizašlih iz O_2 . Pretjerana akumulacija ROS-a unutar ili izvan stanice uzrokuje oksidativni stres što u konačnici dovodi do oštećenja stanice i njene funkcije (Gill i Tuteja, 2010).

U biljkama, reaktivne kisikove čestice nastaju tijekom aerobnih metaboličkih procesa kao što su fotosinteza i respiracija. Zbog toga se glavna proizvodnja ROS-a odvija u mitohondrijima, kloroplastima, citosolu i endoplazmatskom retikulumu. ROS također nastaje oksidacijom glikolata tijekom fotorespiracije u peroksisomima. Drugi izvor ROS-a su reakcije koje kataliziraju NADPH ovisne oksidaze, amino-oksidaze i peroksidaze stanične stijenke (Moller, 2001; Mittler, 2002).

ROS imaju dvostruku ulogu u biljci, ovisno o koncentraciji. Pri visokim koncentracijama uzrokuju oštećenje biomolekula, dok pri niskim/srednjim koncentracijama djeluju kao sekundarni glasnici u unutarstaničnim signalnim kaskadama i posreduju u hormonskom odgovoru stanice. Kao sekundarni glasnici u djelovanju hormona utječu na biosintezu lignina, klijanje, programiranu staničnu smrt, osmotski stres, zatvaranje puči i gravitropizam korijena. Hoće li ROS djelovati štetno ili kao signalne molekule ovisi o osjetljivoj ravnoteži između stvaranja i uklanjanja ROS-a. U normalnim uvjetima postoji ravnoteža između njihovog nastajanja i uklanjanja. Povećana proizvodnja ROS-a uslijed izloženosti okolišnim stresovima predstavlja prijetnju biljci te uzrokuje oštećenja biomolekula: lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina i oksidaciju DNA (slika 4). Posljedica tih oštećenja je promjena fluidnosti, propusnosti i integriteta membrane, transporta iona, gubitak enzimske aktivnosti, agregacija i inhibicija sinteze proteina, modifikacija dušičnih baza, aktivacija programirane stanične smrti, promjena fotosintetske aktivnosti i degradacija fotosintetskih pigmenata (Sharma i sur., 2012).



Slika 4. Oksidativna oštećenja biomolekula uzrokovana ROS-om (Sharma i sur., 2012)

2.2.2. Zaštita od oksidativnog stresa

Kako bi se biljke obranile od oksidativnog stresa i izbjegle oštećenja stanica, razvile su složen antioksidativni obrambeni sustav koji se sastoji od neenzimske i enzimске komponente (Sharma i sur., 2012). Enzimске komponente antioksidativnog obrambenog sustava uključuju enzime: superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT), askorbat-peroksidazu (APOX), glutation-reduktazu (GR), nespecifične peroksidaze (POD), monodehidroaskorbat-reduktazu (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktazu (DHAR), glutation-peroksidazu (GPX), glutation-peroksidazu (GPX), gvajakol-peroksidazu (GPOX) i glutation-S-transferazu (GST). Neenzimske komponente antioksidativnog obrambenog sustava uključuju: askorbinsku kiselinu (ASH), glutation (GSH), fenolne spojeve, alkaloidne, neproteinske aminokiseline, karotenoide i α -tokoferole (Sharma i sur., 2012).

2.2.3. Enzimski antioksidansi

2.2.3.1. Superoksid-dismutaza (SOD)

Prvu liniju obrane od ROS-a čini superoksid-dismutaza (SOD), koja ima ključnu ulogu u obrani od oksidativnog stresa u svim aerobnim organizmima. SOD je metaloenzim koji katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\bullet-}$) u vodikov peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula $O_2^{\bullet-}$ oksidira u O_2 , a druga reducira u H_2O_2 [1]:



Na taj način se sprječava provođenje Haber – Weissove reakcije, tj. smanjuje se rizik od nastanka hidroksilnog radikala (OH^{\bullet}). SOD je prisutna u većini substancijskih dijelova koji stvaraju aktivirani kisik. Tri su izoenzima: bakar/cink-ovisna SOD (Cu/Zn-SOD), mangan-ovisna SOD (Mn-SOD) i željezo-ovisna SOD (Fe-SOD). Mitohondrijska SOD sadržava Mn, a citoplazmatske Zn ili Cu, dok je Fe-SOD lokalizirana u kloroplastima. Aktivnost SOD-a raste u biljkama koje su izložene različitim okolišnim stresovima, uključujući sušu i metalnu toksičnost. Povećana aktivnost SOD-a je često povezana s povećanjem tolerancije biljke na okolišne stresove (Sharma i sur., 2012).

H_2O_2 je vrlo reaktivan i toksičan produkt reakcije koju katalizira SOD te ga je potrebno ukloniti. Razlog više je i OH^{\bullet} radikal, najreaktivniji je među ROS-om, koji iz H_2O_2 nastaje metal-kataliziranom Fentonovom reakcijom. Osim reakcije koju katalizira SOD, izvor H_2O_2 u biljnim stanicama je elektron transportni lanac kloroplasta, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i stanične membrane, te β -oksidacija masnih kiselina i fotorespiracija. H_2O_2 je supstrat za nespecifične peroksidaze (POD), katalazu (CAT), askorbat-peroksidazu (APOX) i glutation-peroksidazu (GPX).

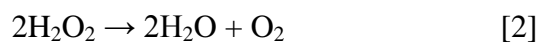
2.2.3.2. Nespecifične peroksidaze (POD)

Nespecifične peroksidaze (POD) reduciraju H_2O_2 u vodu te istovremeno oksidiraju različite supstrate. Razlažu indol-3-octenu kiselinu (IAA) i sudjeluju u biosintezi lignina te obrani od stresa. Imaju slabu supstratnu specifičnost pa im kao donori elektrona mogu poslužiti gvajakol, pirogalol i druge molekule. POD su uključene u procese diferencijacije stanica, biosintezu lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zacjeljivanje rana te obranu

od patogena. Njihova aktivnost ovisi o vrsti biljke i stresu kojem je biljka izložena, a nalaze se u vakuolama, staničnoj stijenci i citosolu. Aktivnost POD-a ovisi o vrsti biljke i stresu kojem je biljka izložena (Gill i Tuteja, 2010).

2.2.3.3. Katalaza (CAT)

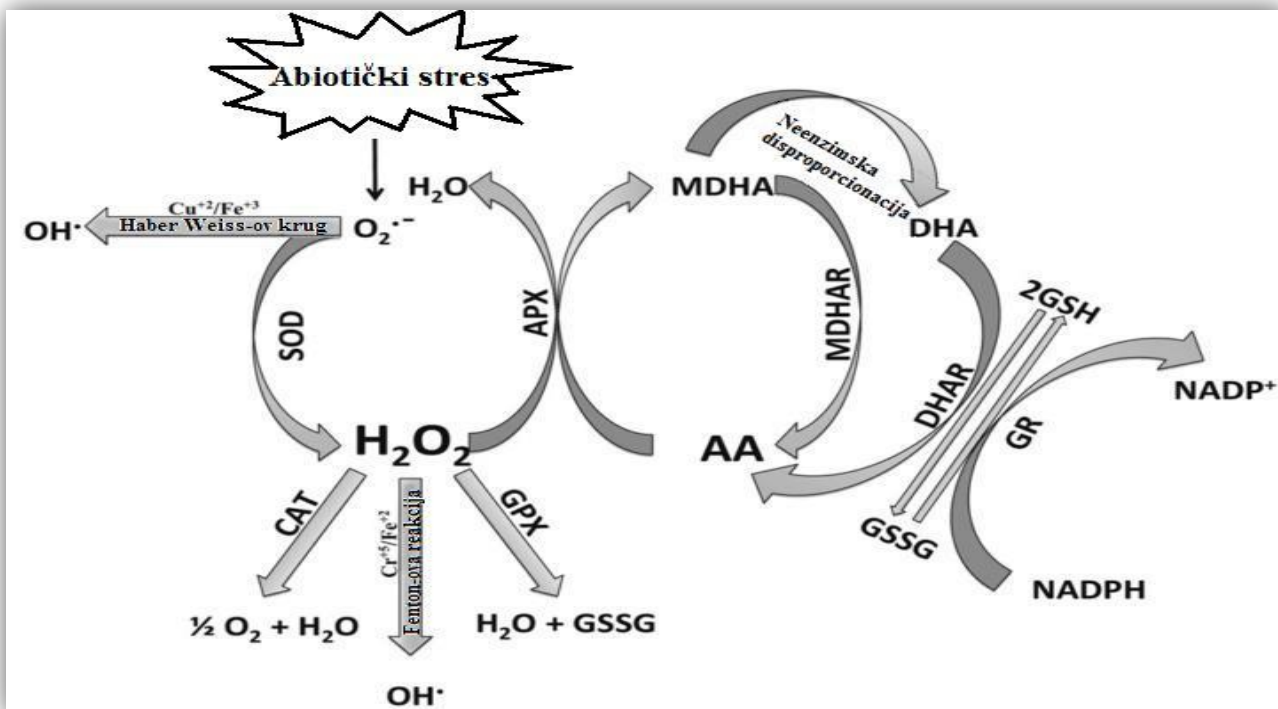
Među antioksidativnim enzimima, katalaza je bila prvi enzim koji je nađen i opisan. To je sveprisutan tetramerni enzim koji sadržava hem te katalizira dismutaciju dviju molekula H_2O_2 u vodu i kisik [2]:



Katalaza uklanja molekule H_2O_2 koje nastaju u procesu fotorespiracije i β -oksidacije masnih kiselina u peroksisomima. Ovaj enzim ima jedan od najvećih koeficijenta konverzije s obzirom na ostale enzime: jedna molekula katalaze može prevesti ~ 6 milijuna molekula H_2O_2 u H_2O i O_2 u jednoj minuti. Visoko je specifična za H_2O_2 , a za organske perokside pokazuje nisku aktivnost (Gill i Tuteja, 2010). Klasificirana je u tri klase. Katalaze klase 1 su izražene u fotosintetskim tkivima, katalaze klase 2 na visokim razinama u vaskularnim tkivima, dok su katalaze klase 3 veoma obilne u sjemenkama i mladima (Sharma i sur., 2012).

2.2.3.4. Askorbat-peroksidaza (APOX)

Askorbat-peroksidaza (APOX) je središnji dio askorbat-glutation ciklusa i ima bitnu ulogu u unutarstaničnoj kontroli razine ROS-a. APOX koristi dvije molekule askorbata za redukciju H_2O_2 pri čemu nastaju dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (MDHA) (Ambriović Ristov i sur, 2007). Osim za uklanjanje H_2O_2 , važna je i za uklanjanje organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida. APOX ima veći afinitet za H_2O_2 (μM raspon) od katalaze i nespecifičnih peroksidaza (mM raspon), a postoji pet izoenzima: citosolna, stromalna, tilakoidna, mitohondrijska i peroksisomalna. Ovaj je enzim jedan od najraširenijih antioksidativnih enzima u biljnim stanicama i izoforme APOX-a imaju mnogo veći afinitet za H_2O_2 nego katalaza i nespecifične peroksidaze (Sharma i sur., 2012).



Slika 5. Odgovor biljke na abiotički stres sustavom antioksidativnih enzima (Gill i Tuteja, 2010). SOD-superoksid-dismutaza, CAT-katalaza, GPX-glutation peroksidaza, APX–askorbat-peroksidaza, AA-askorbat, DHA-dehidroaskorbat, GSH-reducirani oblik glutationa, GSSG-oksidirani oblik glutationa, MDHA-monodehidroaskorbat, MDHAR-monodehidroaskorbat-reduktaza, DHAR-dehidroaskorbat-reduktaza, GR-glutation-reduktaza

2.2.4. Neenzimski antioksidansi

Neenzimske komponente antioksidativnog obrambenog sustava biljke međudjeluju s brojnim staničnim komponentama, imaju važnu ulogu u obrani te kao kofaktori enzima utječu na rast i razvoj. U obrani biljke sudjeluju tako da blokiraju, usporavaju ili mijenjaju oksidativne promjene u stanicama (Gill i Tuteja, 2010).

Tripeptid glutation (γ -glutamyl-cisteinil-glicin, GSH) je jedan od najznačajnijih niskomolarnih neproteinskih tiola koji ima važnu ulogu u obrani stanica od ROS-a induciranih oksidativnim stresom. Prisutan je u gotovo svim staničnim dijelovima: citosolu, kloroplastima, endoplazmatskom retikulumu, vakuolama i mitohondriju te čini 90 % ukupnih neproteinskih tiola u stanici dok ostatak čine tiolni spojevi poput cisteina i metionina. Za antioksidativnu aktivnost odgovorna je sulfhidrilna skupina (-SH) koja se može lako oksidirati

i tvoriti stabilnu disulfidnu vezu. U održavanju staničnog redoks stanja središnju ulogu ima ravnoteža između reduciranog oblika (glutation) i oksidiranog oblika (glutation disulfid, GSSG). Zbog reducirajućeg potencijala, glutation ima važnu ulogu u različitim biološkim procesima: stanični rast i dioba, regulacija transporta sulfata, prijenos signala, konjugacija metabolita, regulacija enzimske aktivnosti, sinteza proteina i nukleinskih kiselina, sinteza fitokelatina za kelaciju metala, detoksifikacija ksenobiotika i ekspresija gena kao odgovora na stres. Kao antioksidans djeluje na više načina: kemijski reagira s ROS-om ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2) i djeluje kao njihov izravni „hvatač“, štiti makromolekule izravnim stvaranjem adukata s reaktivnim elektrofilima (glutationilacija) te djeluje kao proton donor u prisutnosti ROS-a i organskih slobodnih radikala pri čemu prelazi u GSSG. Osim toga, sudjeluje u regeneraciji drugog antioksidansa, askorbata u askorbat-glutation ciklusu (Sharma i sur., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Ječam (*Hordeum vulgare*) sorte Zlatko Poljoprivrednog instituta Osijek.

3.1.2. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su visoke analitičke čistoće.

- Aceton, Kemika
- Destilirana voda, PBF Zagreb
- Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), Kemika
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika
- Gvajakol, Sigma-Aldrich
- Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika
- Kalijev hidrogenfosfat, Kemika
- Kalijev jodid, Merck
- L-askorbinska kiselina, Kemika
- L-metionin, Acros-Organics
- Na-askorbat, Sigma
- Natrijev dihidrogenfosfat, Merck
- Natrijev hidrogenfosfat, Kemika
- Natrijev hipoklorit, Gram-mol d.o.o.
- Nitro-plavi tetrazolijski klorid (NBT), Fisher BioReagents
- Polivinil-polipirolidon (PVPP), Sigma-Aldrich
- Riboflavin, Kemika
- Tiobarbituratna kiselina (TBA), Sigma
- Trikloroctena kiselina (TCA), Merck
- Vodikov peroksid ($w= 0,3$), Kemika
- 1-butil-3-metilimidazolijev tetrafluoroborat, Sigma-Aldrich
- 5,5'-ditio-bis-nitrobenzojeva kiselina (DTNB), Sigma-Aldrich
- 5-Sulfosalicilna kiselina, Sigma-Aldrich

3.1.3. Otopine i puferi

Pufer za ekstrakciju proteina, pH=7,0

- KH_2PO_4 (1 M) 3,85 mL
- K_2HPO_4 (1 M) 6,15 mL
- EDTA (10 mM) 2,00 mL
- L-askorbinska kiselina 176,00 mg
- destilirana voda do 200 mL

Kalij fosfatni pufer (50 mM), pH =7,0

- KH_2PO_4 (1 M) 0,96 mL
- K_2HPO_4 (1 M) 1,54 mL
- destilirana voda do 50 mL

Kalij fosfatni pufer (100 mM), pH =7,4

- KH_2PO_4 (1 M) 0,99 mL
- K_2HPO_4 (1 M) 4,01 mL
- destilirana voda do 50 mL

Natrij fosfatni pufer (NaP pufer) + 5 mM EDTA, pH=7,5

- Na_2HPO_4 (1 M) 9,71 mL
- NaH_2PO_4 (1 M) 2,29 mL
- EDTA 93,1 mg
- destilirana voda do 50 mL

Otopine za određivanje koncentracije proteina po Lowryu

Reagens A: 2 %-tni Na_2CO_3 u 0,1 M NaOH

Reagens B: 0,5 %-tni $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ u 1 %-tnom K,Na-tartaratu

Reagens C: 50 mL reagensa A + 1 mL reagensa B

Folin-Ciocalteu reagens: komercijalni reagens razrijeđen destiliranom vodom u omjeru 1:2

Pufer za mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze, pH=7,8

- KH_2PO_4 (1 M) 0,92 mL
- K_2HPO_4 (1 M) 9,08 mL

- EDTA (10 mM) 2,00 mL
- metionin 388,0 mg
- NBT 127,0 mg
- destilirana voda do 200,0 mL

Pufer za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza

- gvajakol (18 mM) 100,65 µL
- H₂O₂ (w= 0,3) 25,50 µL
- kalij fosfatni pufer (50 mM) do 50,00 mL

Pufer za mjerenje aktivnosti katalaze, pH=7,0

- kalij fosfatni pufer (50 mM) 50,0 mL
- H₂O₂ (10 mM) 51,0 µL

Pufer za mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze, pH=7,0

- kalij fosfatni pufer (50 mM) 50,0 mL
- EDTA (0,1 mM) 500,0 µL

Ellman reagens

- DTNB 11,9 mg
- NaP pufer + 5 mM EDTA 50,0 mL

3.1.4. Oprema

- hladnjak, Zanussi
- laboratorijska centrifuga, HC 240 Tehnica
- laboratorijsko posuđe
- UV/VIS spektrofotometar, Helios γ v 7.03
- vaga analitička, Kern

3.2. METODE RADA

3.2.1. Provedba pokusa

Za ionsku tekućinu [C₄MIM][BF₄] pripremljene su otopine masenih koncentracija: 10 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 250 mg L⁻¹, 500 mg L⁻¹, 750 mg L⁻¹ i 1000 mg L⁻¹ kojima je provedano tretiranje sjemena ječma.

Sjeme ječma sterilizirano je u 1%-tnoj otopini NaOCl tijekom 30 min, isprano 3 puta s destiliranom vodom te inkubirano u vodi i mraku tijekom 24 h pri temperaturi 24 °C. U Petrijevu zdjelicu (*d* = 15 cm) postavljeni su filter papir i sloj vate navlaženi s 30 mL otopine ionske tekućine različitih koncentracija (10 - 1000 mg L⁻¹) te potom dodano 15 sjemena ječma pravilno raspoređenih po čitavoj površini zdjelice. Za svaku masenu koncentraciju ionske tekućine napravljena su dva odvojena eksperimenta. Kontrolni uzorak je bio tretiran s 30 mL destilirane vode. Ječam je uzgajan u kontroliranim uvjetima s izmjenama svjetlo (14 h) /tama (10 h) i temperaturi od 20 °C. Klijanje i rast ječma prati se tijekom 7 dana uz dodatak 20-30 mL otopina ionskih tekućina svaka 24 nakon čega slijedi prikupljanje biljnog materijala. Također je određen postotak iskljalih zrna te su interpolacijom krivulja, koje prikazuju utjecaj masene koncentracije ionske tekućine na klijanje ječma te rješavanjem odgovarajućih jednadžbi, izračunate EC₅₀ vrijednosti (masena koncentracija ionske tekućine pri kojoj 50 % sjemena ne proklija).

3.2.2. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Sadržaj klorofila određuje se u uzorcima listića. 0,1 g listića je homogeniziran u tarioniku uz dodatak 10 mL 80 %-tne otopine acetona u vodi (v/v). Ekstrakcije klorofila provede se u mraku pri temperaturi 4 °C tijekom 24 h. Uzorci su zatim centrifugirani na 4000 g tijekom 10 min te je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija supernatanta pri valnim duljinama 663 nm i 645 nm. Sadržaj fotosintetskih pigmenata izražava se kao µg fotosintetskih pigmenata po gramu svježe tvari klijanaca ječma (µg g⁻¹ svj.tv.) (Arnon, 1949).

3.2.3. Određivanje lipidne peroksidacije i H₂O₂

Oko 0,2 g biljnog materijala homogenizira se u tarioniku uz dodatak 2 mL 0,1 %-tne otopine trikloroetene kiseline u vodi (v/v). Ekstrakt se centrifugira na 10 000 g tijekom 20 min, a dobiveni supernatant koristi se za određivanje lipidne peroksidacije i količine H₂O₂.

3.2.3.1. Određivanje lipidne peroksidacije

Za određivanje lipidne peroksidacije određuje se količina nastalog krajnjeg produkta lipidne peroksidacije – malondialdehida (MDA) koji s trikloroocetnim kiselinom (TCA) daje obojeni produkt. U 1 mL supernatanta se doda 1 mL 0,5 %-tne tiobarbituratne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj trikloroocetnoj kiselini (TCA). Reakcijska smjesa se zagrijava u vodenoj kupelji pri temperaturi 95 °C tijekom 30 min. Slijedi naglo hlađenje u ledenoj kupelji tijekom 10 min. Nakon toga uzorak se 10 min centrifugira na 10 000 g pri temperaturi 4 °C te se izmjeri apsorbancija pri valnim duljinama 532 nm i 600 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog MDA iznosi $155,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a količina malondialdehida (MDA) izražava se kao nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol g}^{-1} \text{ svj. tv.}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.3.2. Određivanje količine H₂O₂

Za određivanje H₂O₂ uzme se 0,5 mL supernatanta, 0,5 mL 100 mM kalij fosfatnog pufera i 1 mL kalijevog jodida. Slijedi određivanje apsorbancije pri valnoj duljini 390 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent za H₂O₂ iznosi $0,28 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a količina H₂O₂ izražava se kao μmol po gramu svježe tvari ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ svj. tv.}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.4. Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina

3.2.4.1. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Oko 0,2 g biljnog materijala homogenizira se u tarioniku na ledu uz dodatak polivinil-polipirrolidona i 2 mL hladnog pufera za ekstrakciju proteina pH=7,0. Dobiveni ekstrakt centrifugira se pri 15000 g i temperaturi 4 °C tijekom 20 min. Supernatant se dekantira i čuva na -20 °C do analize. Dobiveni supernatant koristi se za određivanje koncentracije proteina po Lowryu, mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX).

3.2.4.2. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina

Za određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina korištena je metoda po Lowryu (Ambriović Ristov i sur., 2007). U epruvetu se otpipetira 1 mL reagensa C i doda 0,2 mL razrijeđenog ekstrakta (10 x), promiješa te se ostavi na sobnoj temperaturi tijekom 10 - 15 min. Nakon toga se naglo doda 0,1 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje pomoću

vortexa. Reakcijska smjesa ostavi se na sobnoj temperaturi 60 min nakon čega se izmjeri apsorbanacija pri valnoj duljini 740 nm. Slijepa proba umjesto ekstrakta sadrži 0,2 mL destilirane vode. Koncentracija proteina u uzorku odredi se očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbanacije otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) poznatih koncentracija.

3.2.5. Određivanje aktivnosti enzima stresa

3.2.5.1. Mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze

Pripreme se različita razrjeđenja ekstrakta miješanjem određenih volumena ekstrakta (2,5; 5; 7 i 10 μ L) i pufera za ekstrakciju proteina pH=7,0 do ukupnog volumena od 0,1 mL. U epruvetu se doda 0,9 mL pufera za mjerenje aktivnosti superoksid-dismutaze pH=7,8 i 0,1 mL razrijeđenog ekstrakta. Doda se još i 2 μ L 2 μ M otopine riboflavina u vodi te se enzimska reakcija pokrene uključivanjem izvora svjetla od 36 W. Reakcija se prekida nakon 10 min gašenjem izvora svjetla i zamračivanjem uzorka. Slijedi mjerenje apsorbanacije pri valnoj duljini 560 nm i izrada krivulje aktivnosti enzima.

Aktivnost se izražava kao inhibicija redukcije supstrata:

$$\text{NBT (\%)} = [(A-B)/A] \times 100 \quad [3]$$

gdje je

A - apsorbanacija izmjerena nakon reakcije bez enzima (najveća vrijednost apsorbanacije), a

B - apsorbanacija izmjerena nakon reakcije s enzimom (smanjenje apsorbanacije)

Krivulja aktivnosti enzima izradi se tako da se na ordinatu nanese vrijednosti inhibicije redukcije supstrata NBT (%) [3], a na apcisu volumeni enzimskog ekstrakta upotrebljeni za pripremu razrjeđenja (npr. 2,5, 5, 7, 10 μ L). Jedinica aktivnosti SOD jednaka je količini enzima potrebnog za 50 % inhibicije NBT u reakcijskoj smjesi. Također, odredi se volumen enzimskog ekstrakta koji uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT te iz koncentracije ukupnih proteina izračuna se specifična aktivnost SOD. Aktivnost SOD izražava se u jedinicama enzimske aktivnosti po miligramu ukupnih proteina ($\text{U mg}^{-1} \text{P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.5.2. Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza

Dobiveni ekstrakt razrijedi se 160 puta. U kivetu se otpipetira 950 μL pufera za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza. Reakcija započinje dodatkom 50 μL razrijeđenog ekstrakta. Na spektrofotometru se prati porast apsorbancije svakih 15 s tijekom 2 min pri valnoj duljini 470 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog tetragvajakola iznosi $26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.5.3. Mjerenje aktivnosti katalaze

Uzorci su dobiveni razrjeđivanjem ekstrakta u omjeru 1:1 (50 μL uzorka u 50 μL pufera za ekstrakciju proteina). U kvarcnu kivetu otpipetira se 995 μL pufera za mjerenje aktivnosti katalaze te se reakcija započne dodatkom 5 μL razrijeđenog uzorka. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 240 nm svakih 5 sekundi tijekom 1 minute. Ekstinkcijski koeficijent iznosi $40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost katalaze izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.5.4. Mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze

U kvarcnu kivetu otpipetira se 970 μL pufera za mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze, zatim 10 μL Na-askorbata i 10 μL ekstrakta/supernatanta. Reakcija započinje dodatkom 10 μL 12 mM vodikovog peroksida. Spektrofotometrijski se mjeri pad apsorbancije pri valnoj duljini 290 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao smanjenje količine askorbata s ekstinkcijskim koeficijentom $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao nmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

3.2.6. Određivanje sadržaja neproteinskih tiola

Oko 0,2 g biljnog materijala homogenizira se u tarioniku uz dodatak 1 mL 6,67 %-tne otopine sulfosalicilne kiseline u vodi. Ekstrakt se centrifugira na 15 000 g tijekom 20 min pri temperaturi 4 °C. Dobiveni supernatant se razrijedi s Ellman reagensom u omjeru 1:9 (reakcijska smjesa). Nakon 15 min inkubacije u tami, izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini

412 nm. Sadržaj neproteinskih tiola izražava se kao nmol po gramu svježe tvari (nmol g^{-1} svj. tv.) (Ambriović Ristov i sur., 2007).

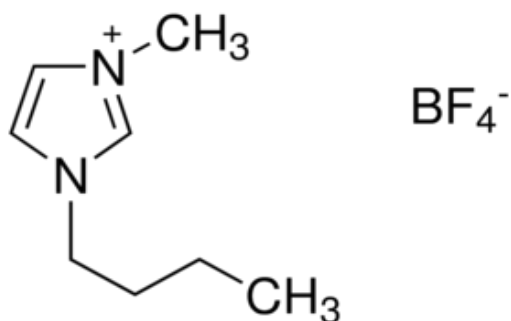
3.2.7. Obrada podataka

Sva mjerenja su provedena u paralelama, tako da su rezultati prosječne vrijednosti dvaju mjerenja te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (S.D.). Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini vjerojatnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U ovom radu ispitan je utjecaj 1-butil-3-metilimidazolijevog tetrafluoroborata ($[C_4MIM][BF_4]$) na klijanje i rast ječma (*Hordeum vulgare*). Struktura navedene ionske tekućine prikazana je na slici 6.

Ječam je tretiran otopinom ionske tekućine masenih koncentracija 0, 10, 50, 100, 250, 500, 750 i 1000 mg L⁻¹ te je praćen utjecaj na klijanje i rast ječma tijekom 7 dana u kontroliranim uvjetima. U kljancima ječma određeni su biokemijski pokazatelji oksidativnog stresa mjerenjem količine fotosintetskih pigmenata, količine malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije i količine H₂O₂. Također, određena je i aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX) te sadržaj neproteinskih tiola kao pokazatelja potencijalne zaštite od oksidativnog stresa uzrokovanog izloženosti ječma ionskoj tekućini.



Slika 6. Struktura 1-butil-3-metilimidazolijeve ionske tekućine s tetrafluoroboratnim anionom.

4.1. Utjecaj ionske tekućine na klijanje ječma

Kako bi se utvrdio utjecaj ionske tekućine na klijanje ječma određen je stupanj inhibicije klijanja ječma i EC₅₀ vrijednost, tj. masena koncentracija ionske tekućine pri kojoj 50 % sjemena ne proklija (tablica 2).

Tablica 2. Stupanj inhibicije klijanja (%) ječma nakon izlaganja različitim masenim koncentracijama 1-butil-3-metilimidazolijevog tetrafluoroborata i pripadajuća EC₅₀ vrijednost

| γ [C ₄ MIM][BF ₄] [mg L ⁻¹] | 0 | 10 | 50 | 100 | 250 | 500 | 750 | 1000 | EC ₅₀ * |
|--|-----|------|------|------|------|------|------|------|---------------------------------|
| Stupanj inhibicije klijanja (%) | 0,0 | 13,4 | 23,4 | 20,0 | 23,4 | 26,7 | 33,4 | 40,0 | 1419,0 mg L⁻¹ |

* EC₅₀ = masena koncentracija ionskih tekućina pri kojoj 50 % sjemena ne proklija

4.2. Pokazatelji stresa klijanaca ječma nakon tretmana s ionskim tekućinama

U klijanima ječma uzgajanih pri različitim masenim koncentracijama ionskih tekućina određen je maseni udio fotosintetskih pigmentata: klorofila *a* (Chl-*a*), klorofila *b* (Chl-*b*) i ukupnog klorofila (Chl-*tot*). Maseni udio fotosintetskih pigmentata prikazan je u tablici 3.

Tablica 3. Utjecaj ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] na količinu fotosintetskih pigmentata u klijanima ječma.

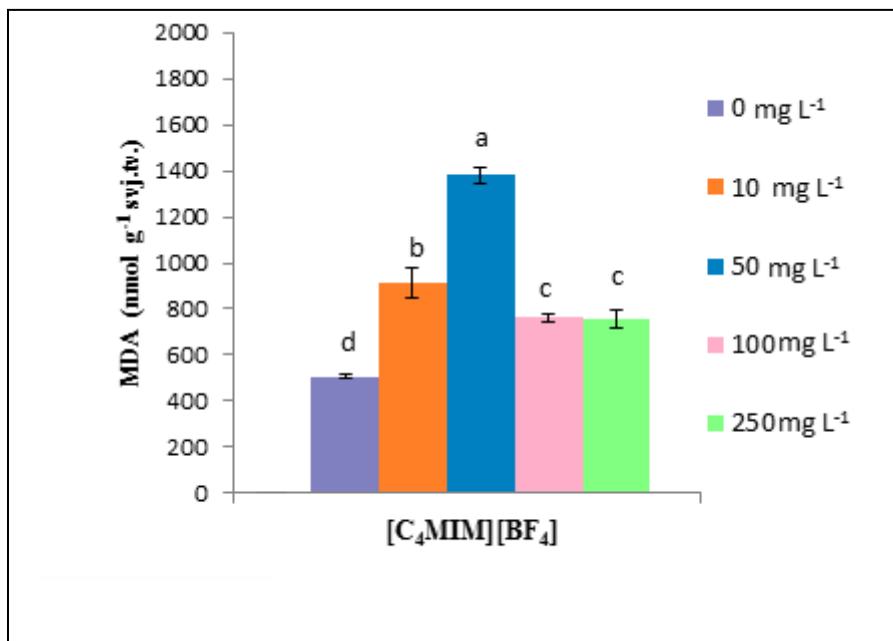
| Masena koncentracija ionske tekućine [C ₄ MIM][BF ₄] (mg L ⁻¹) | Fotosintetski pigmenti** ($\mu\text{g g}^{-1}$ svj. tv.) | | |
|--|--|---------------------------|----------------------------|
| | Chl- <i>a</i> | Chl- <i>b</i> | Chl- <i>tot</i> |
| 0 | 745,3 ^c ± 9,0 | 173,5 ^b ± 9,0 | 918,8 ^b ± 27,7 |
| 10 | 838,3 ^b ± 20,5 | 211,3 ^a ± 20,5 | 1049,6 ^a ± 32,3 |
| 50 | 877,0 ^{ab} ± 5,1 | 171,3 ^b ± 5,1 | 1048,3 ^a ± 13,2 |
| 100 | 643,8 ^d ± 8,6 | 151,7 ^b ± 8,6 | 795,5 ^c ± 25,2 |
| 250 | 596,6 ^c ± 9,9 | 37,3 ^c ± 9,9 | 634,0 ^d ± 30,4 |

* rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (*n*=3), vrijednosti sa istim slovom (a-d) unutar jednog reda statistički se ne razlikuju (*P* < 0,05) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

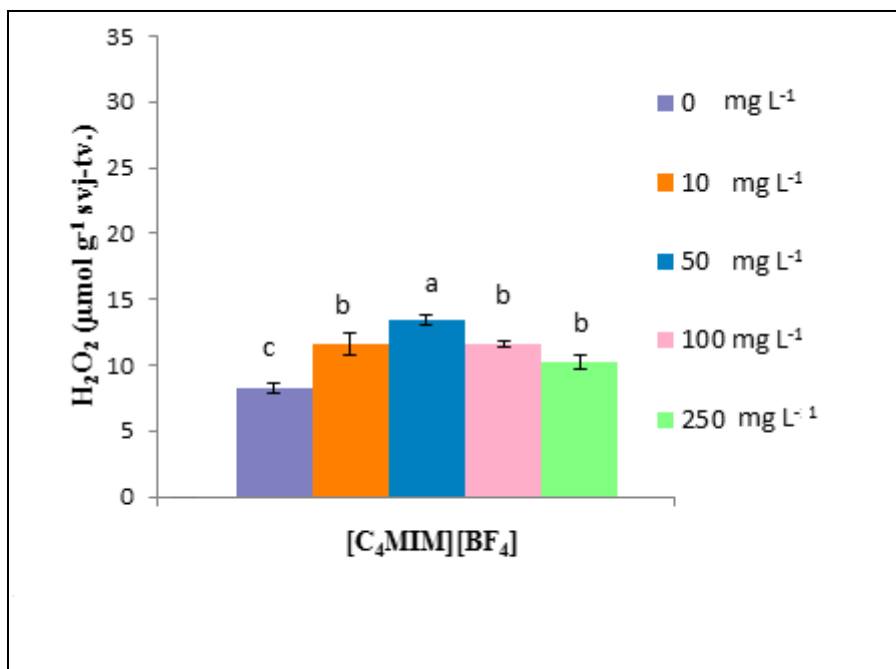
** fotosintetski pigmenti: klorofil *a* (Chl-*a*), klorofil *b* (Chl-*b*), ukupni klorofil (Chl-*tot*)

Lipidna peroksidacija kao posljedica oksidativnog stresa u klijanima ječma određena je mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA). Rezultati su prikazani na grafičkom prikazu

1. Također, određena je i količina H_2O_2 , reaktivne molekule ROS-a, a dobivene vrijednosti prikazane su na grafičkom prikazu 2. Svi rezultati su srednja vrijednost \pm S. D. ($n=3$), a vrijednosti s istim slovom (a-d) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom.



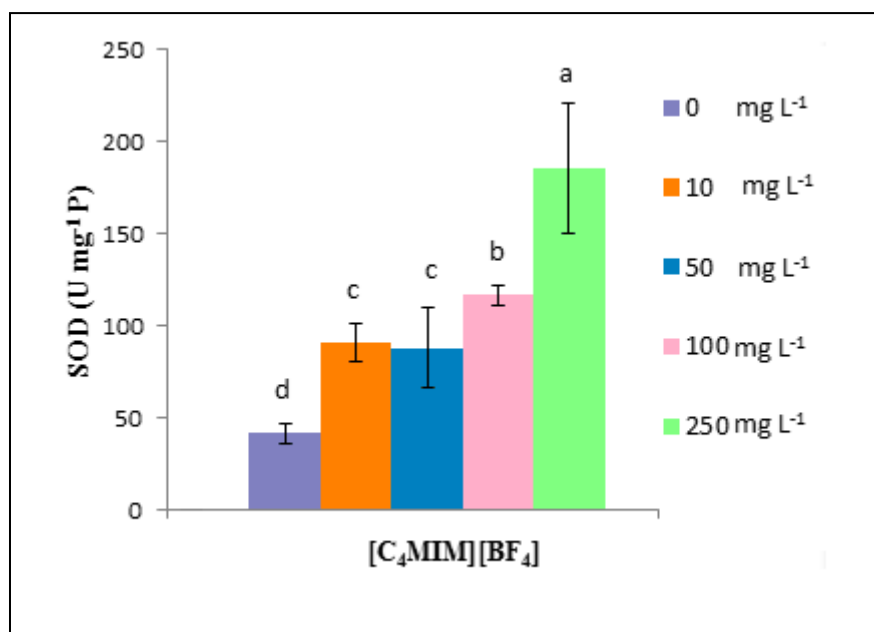
Grafički prikaz 1. Količina malondialdehida (MDA) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$.



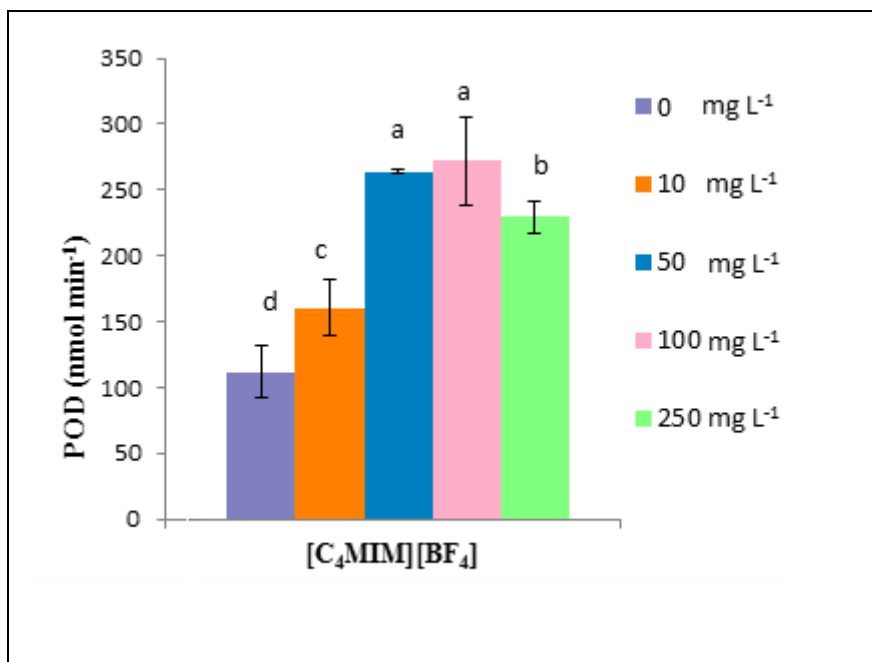
Grafički prikaz 2. Količina H_2O_2 u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$.

4.3. Antioksidativni obrambeni sustav klijanaca ječma nakon izlaganja ionskoj tekućini

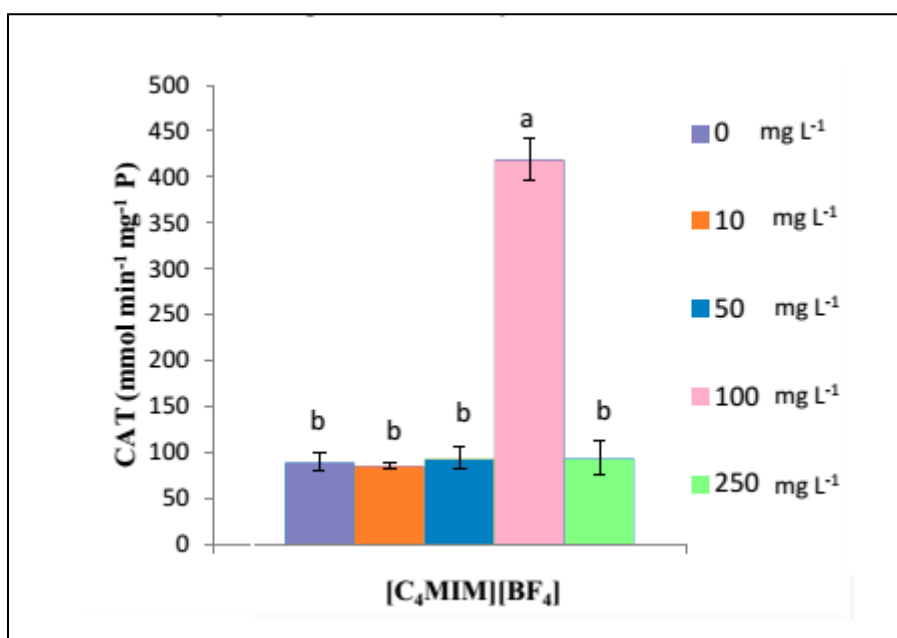
Antioksidativni enzimi djeluju u obrani biljke od oksidativnog stresa. U klijancima ječma određena je aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX). Dobivene vrijednosti prikazane su na grafičkim prikazima 3-6. Također, određeni su i neproteinski tioli, niskomolekularni antioksidansi koji spadaju u neenzimsku komponentu antioksidativnog obrambenog sustava biljke. Dobivene vrijednosti sadržaja neproteinskih tiola u klijancima ječma prikazane su na grafičkom prikazu 7. Svi rezultati su srednja vrijednost \pm S. D. ($n=3$), a vrijednosti s istim slovom (a-d) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom.



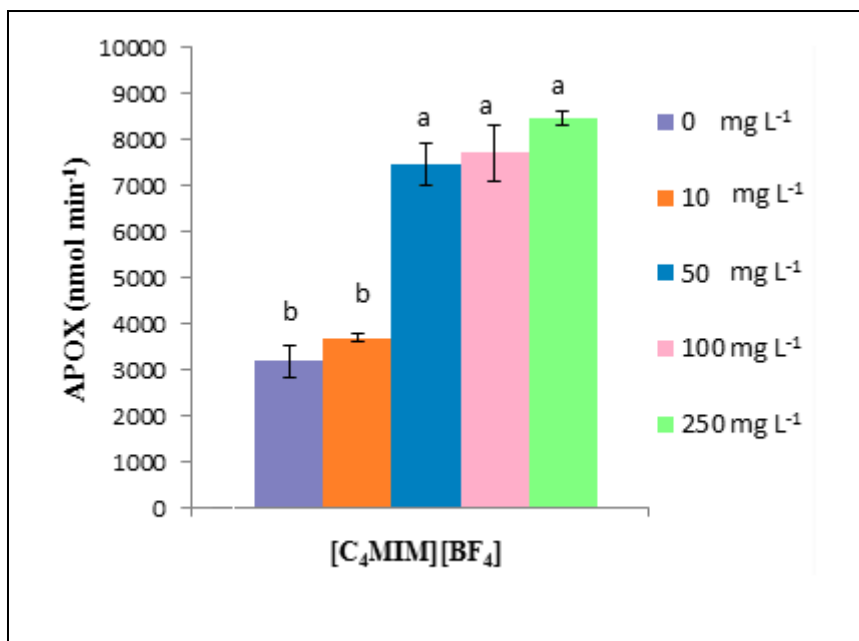
Grafički prikaz 3. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄].



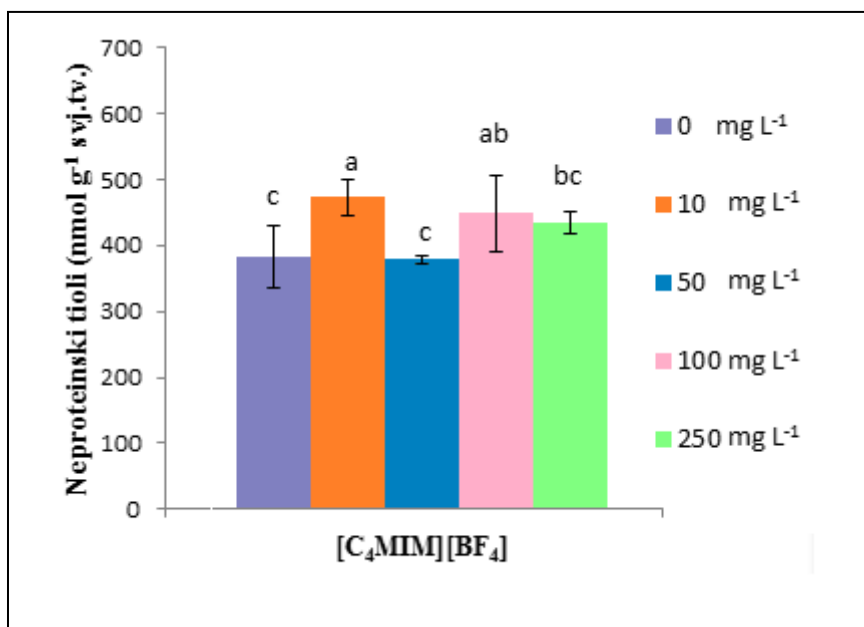
Grafički prikaz 4. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza (POD) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄].



Grafički prikaz 5. Aktivnost katalaze (CAT) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄].



Grafički prikaz 6. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APOX) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄].



Grafički prikaz 7. Količina neproteinskih tiola u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄].

5. RASPRAVA

Ionske su tekućine skupina spojeva jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava koja se posljednjih godina intenzivno proučava kao zelena zamjena za štetna otapala u industriji. Kako bi se potvrdio zeleni karakter ionskih tekućina, posljednjih godina provode se različita istraživanja njihovog učinka na okoliš (Thuy Pham i sur., 2010). Određivanje toksičnosti ionskih tekućina, kao i drugih novih spojeva provodi se izvođenjem niza testova na različitim organizmima kako bi se na temelju toga mogao procijeniti njihov utjecaj na ljude i okoliš.

U ovom radu ispitan je utjecaj imidazolijeve ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] na klijanje i rast ječma, praćena su morfološka i fiziološka svojstva ječma (*Hordeum vulgare*). Odabrana je imidazolijeva ionska tekućina s obzirom na to da su one među prvim ionskim tekućinama upotrebljenim u industrijskom mjerilu (Petković i sur., 2010). Kao biokemijski pokazatelji oksidativnog stresa istraživani su: sadržaj fotosintetskih pigmenata, količina malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije i količina H₂O₂. Isto tako, analizirane su aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APOX) te sadržaj neproteinskih tiola kao pokazatelja potencijalne zaštite od oksidativnog stresa uzrokovanog izloženosti ječma ionskim tekućinama.

Ječam je tijekom 7-dnevnog uzgoja bio tretiran otopinama ionske tekućine masenih koncentracija 10 - 1000 mg L⁻¹ te je pokazao morfološke, fiziološke i biokemijske promjene u odnosu na kontrolu (0 mg L⁻¹). Tijekom uzgoja, uočena je inhibicija klijanja (tablica 2). Pokazalo se da s povećanjem masene koncentracije ionskih tekućina raste stupanj inhibicije klijanja, klijanci su znatno manji. Primjerice, pri većim masenim koncentracijama ionske tekućine listići klijanaca su manji u odnosu na kontrolu, a korijenčići kraći i suši. Zapaženi učinci toksičnosti ionske tekućine slični su učincima koje uzrokuje nedostatak hranjivih tvari (Studzinska i Buszewski, 2008).

Kako je u literaturi zabilježen međuodnos strukture ionske tekućine i toksičnosti prema različitim organizmima, određena je ovisnost inhibicije klijanja ječma (izražena kao EC₅₀ vrijednost, odnosno vrijednost pri kojoj ne proklija 50 % sjemena). Za [C₄MIM][BF₄] ionsku tekućinu EC₅₀ iznosi 1419,0 mg L⁻¹. To je u skladu s rezultatima studija koje [C₄MIM][BF₄] navode kao najmanje toksičnu ionsku tekućinu među istraženim ionskim tekućinama (Wang i sur., 2008).

Ulazak ionske tekućine u biljku uzrokuje različite promjene što može dovesti do pretjeranog nastanka i akumulacije reaktivnih kisikovih čestica (ROS), kao i pod utjecajem drugih okolišnih stresova. ROS-ovi dovode do raznih oštećenja što kao posljedicu ima

promjenu fluidnosti, propusnosti i integriteta membrane, transporta iona, gubitak enzimske aktivnosti, agregacija proteina, modifikacija dušičnih baza, aktivacija programirane stanične smrti, promjena fotosintetske aktivnosti i degradacija fotosintetskih pigmenata (Sharma i sur., 2012). Da bi se procijenila jačina stresa u klijancima ječma, određeni su neki biokemijski pokazatelji oksidativnog stresa mjerenjem količine fotosintetskih pigmenata, količine malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije te količine H_2O_2 .

Utjecaj ionske tekućine na sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je u listićima ječma mjerenjem klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnog klorofila (tablica 3). Smanjenje sadržaja klorofila doprinosi smanjenju fotosintetske aktivnosti i usporenom rastu biljke. U klijancima ječma tretiranim $[C_4MIM][BF_4]$ ionskom tekućinom pri masenim koncentracijama 10 mg L^{-1} i 50 mg L^{-1} dolazi do povećanja sadržaja ukupnog klorofila u odnosu na kontrolu, dok pri većim masenim koncentracijama ionske tekućine (100 mg L^{-1} i 250 mg L^{-1}) dolazi do smanjenja sadržaja fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolu. Rezultati pokazuju da pri većim masenim koncentracijama ionske tekućine s tetrafluoroboratnim anionom opada sadržaj fotosintetskih pigmenata. Razlog tome moglo bi biti toksično djelovanje ionskih tekućina na biosintezu fotosintetskih pigmenata i njihova degradacija uzrokovana reaktivnim kisikovim česticama (ROS) (Couling i sur., 2006). Nadalje, mjenen je i sadržaj malondialdehida (MDA) kao pokazatelja oksidativnog oštećenja membranskih lipida. Izmjerena koncentracija MDA najniža je u netretiranim uzorcima ječma, dok je u tretiranim uzorcima koncentracija MDA povišena, što ukazuje na povećani stupanj lipidne peroksidacije (grafički prikaz 1). Najveća koncentracija MDA izmjerena je pri masenoj koncentraciji 50 mg L^{-1} . Također, utvrđena je povećana količina H_2O_2 u odnosu na kontrolu što ukazuje na nakupljanje H_2O_2 u klijancima ječma (grafički prikaz 2). Nakupljanje H_2O_2 ukazuje na to da antioksidativni enzimi ne mogu u potpunosti ukloniti ROS te da dolazi do njihova nakupljanja.

Antioksidativni obrambeni sustav koji čine antioksidativni enzimi te niskomolekularni antioksidansi kao što je glutation ima važnu ulogu u zaštiti staničnih membrana i organela od različitih okolišnih stresova i oštećenja, a njegova aktivnost ukazuje na odgovor biljke na oksidativni stres uzrokovan različitim ksenobioticima i povezana je s tolerancijom biljke na stres (Sharma i sur., 2012). SOD katalizira reakciju dismutacije vrlo reaktivnog superoksidnog aniona $O_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 . Rezultati aktivnosti SOD ukazuju na statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) u svim tretiranim uzorcima ječma za odabranu ionsku tekućinu u odnosu na kontrolu (0 mg L^{-1}) (grafički prikaz 3). Najveća aktivnost SOD izmjerena je pri masenoj koncentraciji 250 mg L^{-1} , a kako je pretjerana produkcija H_2O_2 rezultat i povećane aktivnosti

SOD, potrebna je i povećana aktivnost enzima kao što je POD, CAT i APOX, koji će nastali H₂O₂ ukloniti i tako spriječiti njegovo štetno djelovanje (grafički prikaz 4-6). Za aktivnost nespecifičnih peroksidaza (POD) u tretiranim uzorcima ječma uočeno je statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) pri svim masenim koncentracijama ionske tekućine (grafički prikaz 4). Rezultati aktivnosti antioksidativnog enzima katalaze (CAT) u uzorcima ječma pokazali su statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) pri masenoj koncentraciji od 100 mg L⁻¹, dok se pri ostalim masenim koncentracijama rezultati statistički ne razlikuju od kontrole (grafički prikaz 5). Također, rezultati aktivnosti enzima askorbat peroksidaze pokazali su statistički značajno povećanje ($p < 0,05$) u svim tretiranim uzorcima ječma u odnosu na kontrolu (grafički prikaz 6). Najveća vrijednost aktivnosti askorbat-peroksidaze za [C₄MIM][BF₄] ionsku tekućinu izmjerena je pri masenoj koncentraciji 250 mg L⁻¹. Naposljetku, utvrđena je povećana količina neproteinskih tiola u odnosu na kontrolu u svim uzorcima klijanaca ječma (grafički prikaz 7) što upućuje da i oni sudjeluju u obrani od stresa uzrokovanog ionskim tekućinama.

Iz gore navedenih rezultata može se zaključiti da imidazolijeva ionska tekućina [C₄MIM][BF₄] ima toksičan učinak na rani rast i razvoj klijanaca ječma, pri čemu stupanj fitotoksičnog učinka ovisi o koncentraciji ionske tekućine. S povećanjem masene koncentracije ionske tekućine povećava se i fitotoksični učinak. U studiji koju su proveli Matzke i sur. (2008) ispitan je utjecaj različitih aniona (Cl⁻, BF₄⁻, (CF₃SO₂)₂N⁻, HSO₄⁻) na toksičnost 1-butil-3-metilimidazolijevе ionske tekućine na rast pšenice (*Triticum aestivum*) u tlu s različitim sastavom minerala gline. [C₄MIM][CF₃SO₂)₂N] ionska tekućina pokazala se najtoksičnijom, neovisno o sastavu tla, dok na toksičnost [C₄MIM][Cl], [C₄MIM][BF₄] i [C₄MIM][HSO₄] ionskih tekućina uglavnom utječe kationski dio. Uočeni toksični učinak ovih ionskih tekućina varirao je ovisno o sastavu i koncentraciji gline u tlu. S povećanjem sadržaja gline toksični učinak [C₄MIM][Cl], [C₄MIM][BF₄] i [C₄MIM][HSO₄] ionskih tekućina je manje izražen, dok je za [C₄MIM][CF₃SO₂)₂N] ionsku tekućinu veći.

U zaključku, toksičnost ionskih tekućina, kao relativno nove skupine spojeva s potencijalom industrijskom primjenom, potrebno je kritički ispitati. Rezultati navedenih studija ukazuju da fitotoksičnost ionskih tekućina ovisi i o vrsti aniona, te je potrebno ispitati utjecaj sva tri strukturna elementa (kationa, aniona i bočnog alkilnog lanca) kao i utjecaj različitih okolišnih uvjeta na stupanj toksičnosti ovih spojeva.

Budući da su ionske tekućine „dizajnirana otapala“ te se mogu sintetizirati kombinacijom različitih kationa i aniona, cilj je dobiti ionsku tekućinu sa što većom biorazgradivosti i što manjom toksičnošću.

6. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitan je utjecaj 1-butil-3-metilimidazolijevog tetrafluoroborata na klijanje i rast ječma (*Hordeum vulgare*). Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. [C₄MIM][BF₄] ima toksičan učinak na rani rast i razvoj klijanaca ječma, pri čemu stupanj toksičnog učinka ovisi o koncentraciji ionske tekućine.
2. Smanjenjem količine klorofila te povećanjem količine malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije i količine H₂O₂ dokazuje se fitotoksično djelovanje ionske tekućine
3. U obrani biljke od oksidativnog stresa uzrokovanog izlaganjem 1-butil-3-metilimidazolijevom tetrafluoroboratu sudjeluju antioksidativni enzimi: superoksid-dismutaza, nespecifične peroksidaze, katalaza i askorbat-peroksidaza te neproteinski tioli kao skupina neenzimskih antioksidansa
4. Antioksidativni sustav klijanaca nakon izlaganja većim masenim koncentracijama ionske tekućine ne može učinkovito eliminirati ROS koji uzrokuje lipidnu peroksidaciju i oštećenja fotosintetskog sustava.

7. LITERATURA

- Ajam, M. (2005) Metathesis and hydroformylation reactions in ionic liquids. Magistarski rad, Sveučilište u Johannesburgu.
- Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Madarić, B., Cetković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katusić Hecimović, S., Mestrovic Radan, N., Mihaljevic, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007) Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Balczewski, P., Bachowska, B., Bialas, T., Biczak, R., Wieczorek, W. M., Balinska, A. (2007) Synthesis and phytotoxicity of new ionic liquids incorporating chiral cations and/or chiral anions. *J. Agri. Food Chem.* **55**, 1881-1892.
- Coleman, D., Gathergood, N. (2010) Biodegradation studies of ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 600–637.
- Couling, D. J., Bernot, R. J., Docherty, K. M., Dixon, J. K., Maginn, E. J. (2006) Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling. *Green Chem.* **8**, 82–90.
- Deetlefs, M., Seddon, K. R. (2010) The green synthesis of ionic liquids. U: handbook of green chemistry, Volume 6: Ionic liquids, (Wasserscheid, P., Stark, A., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, str. 1-38.
- Earle, M. J., Seddon, K. R. (2000) Ionic liquids. Green solvents for the future. *Pure Appl. Chem.* **72**, 1391-1398.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Bioch.* **28**, 909-930.
- Hagiwara, R., Ito, Y. (2000) Room temperature ionic liquids of alkyylimidazolium cations and fluoroanions. *J. Fluorine Chem.* **105**, 221-227.
- Kärkkäinen, J. (2007) Preparation and characterization of some ionic liquids and their use in the dimerization reaction of 2-methylpropene. Disertacija, Sveučilište u Oulu.
- Liu, P., Ding, Y., Liu, H., Sun, L., Li, X., Wang, J. (2010) Toxic effect of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the wheat seedlings. *J. Environ. Sci.* **22**, 1974-1979.
- Matzke, M., Stolte, S., Arning, J., Uebers, U., Filser, J. (2008) Ionic liquids in soils: effects of different anion species of imidazolium based ionic liquids on wheat (*Triticum aestivum*) as affected by different clay minerals and clay concentrations. *Ecotoxicology* **18**, 197-203.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405-410.
- Moller, I. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Phys.* **52**, 561-591.

- Perić, B., Marti, E., Sierra, J., Cruanas, R., Garau, M. A. (2012) Green chemistry: Ecotoxicity and biodegradability of ionic liquids. U: Recent Advances in Pharmaceutical Sciences II, (Muñoz-Torrero, D., Haro, D., Vallès, J., ured.) Transworld Research Network, Kerala, str. 89-113.
- Petković, M., Seddon, K. R., Rebelo, L. P. N., Pereira, C. S. (2010) Ionic liquids: a pathway to environmental acceptability. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1383-1403.
- Ranke, J., Mölter, K., Stock, F., Bottin-Weber, U., Poczobutt, J., Hoffmann, J., Ondruschka, B., Filser, J., Jastorff, B. (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **58**, 396–404.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J.Bot.* **2012**, 1-26.
- Stepnowski, P., Zaleska, A. (2005) Comparison of different advanced oxidation processes for the degradation of room temperature ionic liquids. *J. Photoch. Photobio. A* **170**, 45–50.
- Studzinska, S., Buszewski, B. (2008) Study of toxicity of imidazolium ionic liquids to watercress (*Lepidium sativum* L.). *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 983-990.
- Thuy Pham, T. P., Cho, C. W., Yun, Y. S. (2010) Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Res.* **44**, 352-72.
- Wasserscheid, P., Welton, T. (2003) Ionic liquids in synthesis. Wiley-VCH, Weinheim, str. 20-200.
- Wells, A. S., Coombe, V. T. (2006) On the freshwater ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids. *Org. Proc. Res.* **10**, 794-798.
- Wilkes, J. S. (2002) Introduction. U: Ionic liquids in synthesis, (Wasserscheid, P., Welton, T., ured.) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, str. 1-6.
- Yang, Z., Pan, W. (2005) Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzym Microb Tech.* **37**, 19-28.
- Zhang, B., Li, X., Chen, D., Wang, J. (2012) Effect of 1-octyl-3-methylimidazolium bromide on the antioxidant system of *Lemna minor*. *Protoplasma* **250**, 103-110.
- Zhu, S., Chen, R., Wu, Y., Chen, Q., Zhang, X., Yu, Z. (2009) A mini-review on greenness of ionic liquids. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **23**, 207-211.

8. POPIS PRILOGA

Slika 1. Ionske tekućine (Schwartz, 2009), str. 2

Slika 2. Neki tipični kationi i anioni koji ulaze u sastav ionskih tekućina (Perić i sur., 2012), str. 3

Slika 3. Područja primjene ionskih tekućina (Pham i sur., 2010) , str.5

Slika 4. Oksidativna oštećenja biomolekula uzrokovana ROS-om (Sharma i sur., 2012) , str.11

Slika 5. Odgovor biljke na abiotički stres sustavom antioksidativnih enzima (Gill i Tuteja, 2010). SOD-superoksid-dismutaza, CAT-katalaza, GPX-glutation peroksidaza, APX–askorbat-peroksidaza, AA-askorbat, DHA-dehidroaskorbat, GSH-reducirani oblik glutaciona, GSSG-oksidirani oblik glutaciona, MDHA-monodehidroaskorbat, MDHAR-monodehidroaskorbat-reduktaza, DHAR-dehidroaskorbat-reduktaza, GR-glutation-reduktaza, str.14

Slika 6. Struktura 1-butil-3-metilimidazolijeve ionske tekućine s tetrafluoroboratnim anionom, str.24

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva ionskih tekućina (Perić i sur., 2007) , str.4

Tablica 2. Stupanj inhibicije klijanja (%) ječma nakon izlaganja različitim masenim koncentracijama 1-butil-3-metilimidazolijeve tetrafluoroborata i pripadajuća EC_{50} vrijednost, str.25

Tablica 3. Utjecaj ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$ na količinu fotosintetskih pigmenata u klijancima ječma, str.25

Grafički prikaz 1. Količina malondialdehida (MDA) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$, str.26

Grafički prikaz 2. Količina H_2O_2 u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$, str.26

Grafički prikaz 3. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine $[C_4MIM][BF_4]$, str.27

Grafički prikaz 4. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza (POD) u klijancima ječma nakon 7-

dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] ,
str.28

Grafički prikaz 5. Aktivnost katalaze (CAT) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] , str. 28

Grafički prikaz 6. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APOX) u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] ,
str.29

Grafički prikaz 7. Količina neproteinskih tiola u klijancima ječma nakon 7-dnevnog uzgoja pri različitim masenim koncentracijama ionske tekućine [C₄MIM][BF₄] , str.29