Delovanje herbicida i njihovih metabolita u kanalskoj vodi na biološke parametre *Lemna minor* L.

Maja Meseldžija¹, Vojislava Bursić¹, Gorica Vuković², Aleksandra Petrović¹,
Igor Jajić¹, Bojan Hadžistević¹

¹Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8,
21000 Novi Sad

²Institut za javno zdravlje Beograd, Bulevar Despota Stefana 54a, 11000 Beograd
E-mail: maja@polj.uns.ac.rs

REZIME

Upotrebom LC-MS/MS u ESI modu, urađena je analiza vode, uzorkovana iz kanala DTD na lokalitetu Čelarevo. Multirezidualnom metodom je obuhvaćeno određivanje dvadeset i jednog herbicida i njihovih metabolita u uzorcima vode, uz izoproturon-d6 i atrazin-d5 kao internih standarda. Detektovani su metolahlor, terbutilazin, atrazin, prometrin, linuron kao i terbutilazin-dezetil (metabolit terbutilazina). Biljni materijal - *Lemna minor* L. je uzgajana u sudovima sa kanalskom vodom, dok je kontrolna biljka bila u vodi bez prisustva ostataka herbicida. Merenje bioloških parametara je vršeno nakon 24, 48, 72 i 120 h. Količine fotosintetičkih pigmenata (hlorofila a, b i karotenoida) bile su većih vrednosti u uzorku u poređenju sa kontrolom. Sadržaj herbicida i njihovih metabolita u kanalskoj vodi je uticao na svežu masu biljaka, čije su vrednosti bile za oko 30% više u kontroli u odnosu na uzorak. Količina rastvorljivih proteina, takođe je bila viša u kontroli nego u uzorku.

Ključne reči: herbicidi, metaboliti, kanalska voda, *Lemna minor* L.

UVOD

Pesticidi, među kojima i herbicidi, dospevaju u vodotokove direktnim i indirektnim putem. Nakon aplikacije na biljke ili zemljište, pesticidi koji se koriste u poljoprivrednoj proizvodnji u suzbijanju insekata i korova, mogu migrirati u površinske i podzemne vode (Ismail et al., 2012). Ne retko, poljoprivredni proizvođači nakon završenog tretiranja, operu prskalice u kanalima što dovodi do direktnog izlivanja opasnih hemikalija i često, u vodu bacaju praznu ambalažu ili ih ostavljaju pored njive, što predstavlja još jedan izvor zagađenja (Bursić i sar., 2013; 2014).

Indirektno, pesticidi dospevaju iz atmosfere zajedno sa padavinama, u obliku proizvoda aktivnosti ljudi i životinja, ulivanjem otpadnih i industrijskih voda gradskih i prigradskih naselja, spiranjem posle kiše sa okolnog zemljišta, zanošenjem (drift) prilikom tretiranjem useva u blizini vodotokova. Prisustvo proizvoda hemijskog porekla, poput pesticida, u atmosferi, zemljištu i vodi, čak i u tragovima, može izazvati ozbiljne probleme kod akvatičnih organizama (Li and Xiong, 2004; Forni et al., 2012). Uprkos svojoj poziciji kao primarnih proizvođača u lancu ishrane u vodenim ekosistemima, makrofite su među prvim organizmima izložene uticaju polutanata u ovim sredinama. Ove biljke se koriste kao indikatori zagađenja vode zbog njihove brojnosti i smanjene pokretljivosti, zbog toga se sočivica i koristi u ekotoksikološkim istraživanjima (Tel-Or and Forni, 2011; Forni et al., 2012).

Organizmi, populacije, biocenoze i ultimativno, ceo ekosistem su prirodno pod dejstvom mnogobrojnih biotičkih i abiotičkih faktora koji dovode do stresa (Leblebici and Aksoy, 2011). Izloženost biljaka ovim faktorima, direktno ili indirektno, pokreće ili proizvodi različite molekulske signale koji regulišu mnogobrojne procese zadužene za pojačavanje i određivanje fizioloških odgovora preko transkripcionih i metaboličkih promena (Zimmo, 2003; Nikolić i sar., 2010 a, b). Primena akvatičnih makrofita, kao što su *Lemna minor* L., *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. i *Pistia stratiotes* L., u otpadnim vodama, poslednjih godina, sve više dobija na značaju (Leblebici and Aksoy, 2011). Sočivica (*Lemna minor* L.) je biljka cvetnica koja se najbrže razvija. Plutajuća je akvatična makrofita koja pripada familiji *Lemnaceae* i široko je rasprostranjena na nutrijentima bogatim vodenim površinama (Zimmo, 2003). Ta biljka, poreklom iz Azije, udvostručava se na svakih 48-72 sata. Brz razvoj sočovice pronalazi primenu u bioregeneraciji zagađenih voda kao i za testiranje organizama za ekološke nauke (Hou et al., 2007; Razingar et al., 2008; Dosnon-Olette et al., 2010).

Ovim istraživanjima će biti obuhvaćen uticaj ostataka herbicida i njihovih metabolita u kanalskoj vodi na sadržaj fotosintetičkih pigmenata (hlorofila a, b i karotenoidi), kao i ukupnu količinu sveže mase i sadržaj proteina rastvorljivih u vodi u uzorcima akvatične vrste *Lemna minor* L.

MATERIJAL I METODE

Uzorkovanje uzoraka: Uzorci za analizu vode uzeti su iz kanala DTD, sa lokaliteta kod naselja Čelarevo (45°16'06"N/19°31'19"E) van zone direktnog uticaja uliva otpadnih voda i pritoka. Uzimani su prema smernicama za uzimanje uzoraka površinskih voda iz reka i potoka SRPS ISO 567-6, iz čamaca od nizvodnog toka ka uzvodnom, bez zahvatanja sedimenta. Kod uzorkovanja se vodilo računa da koeficijent izmeštenosti vode bude 0,70-0,95.

Hemikalije i aparatura: Komercijalni miks standarda NE7500 (LGC Standards), analitički standard izoproturona-d6 i atrazina-d5 (Supelco), metanol i dihlormetan HPLC čistoće (J.T. Baker, Holland). Analiza vode izvršena je Agilent 6410B QQQ na XBridge C18 (150 × 3.0 mm, 3.5 μm) koloni u ESI tipu jonizacije. Mobilna faza je bila 0,1% HCOOH u metanolu (A) i 0,1% HCOOH u vodi (B), u gradijentnom modu: 0 min 70% B, 2 min 70%B, 15 min 50% B,

19 min 50% B, 20 min 30% B, 26 min 30% B sa protokom od 0,5 ml/min. Ekstrakcija herbicida iz uzoraka vode po metodi Milutinović i sar. (2012), izvedena je na OASIS HLB kolonama, aktiviranih sa 5 ml metanola i 5 ml vode. Nakon propuštanja 250 ml uzoraka vode (sa internim standardima), izvršeno je eluiranje analita sa 5 ml dihlormetana. Ekstrakti su zatim upareni u struji azota, rastvoreni u mobilnoj fazi i analizirani na sadržaj 21 herbicida i njihovih metabolita (Tabela 1). Limiti kvantifikacije (LOQ) ispitivanih pesticide su bili 0,002 µg/l.

Tabela 1. MRM uslovi za QQQ i koeficijenti korelacije sa validacionim parametrima

Herbicid	MW	MRM tranzicija (m/z)	tR (min)	R2	Prinos ekstrakcije±RSD (%)
Desizoprolil-atrazin	173	174 →104 174 →68	3.036	0.9999	76.43±6.73
Etidimuron	464	265 →208 265 →161	3.628	0.9987	107.77±6.93
Metamitron	202	203 →104 203 →175	4.401	0.9998	72.00±4.63
Hloridazon	221	222 →104 222 →92	4.959	0.9998	91.20±5.10
Dezetilatrazin	187	188 →146 188 →104	6.165	0.9997	88.63±5.93
Karbetamid	237	238 →72 238 →192	10.464	0.9998	91.10±5.17
Cianazin	240	241 →214 241 →104	10.912	0.9998	82.30±6.17
Simazin	201	202 →132 202 →96	11.658	0.9999	83.93±5.23
Terbutilazin-desetil	201	202 →146 202 →110	13.948	0.9997	85.63±4.98
Hlorotoluron	212	213 →46 213 →72	16.209	0.9998	85.83±4.90
Metabromuron	258	259 →170 259 →148	16.469	0.9997	73.33±6.00
Atrazin	215	216 →174 216 →96	16.724	1.000	82.93±5.77
Metabenzthiazuron	221	222 →165 222 →150	16.830	1.000	83.83±4.97
Izoproturon	206	207 →72 207 →165	18.056	1.000	68.87±8.93
Metazahlor	277	278 →134 278 →210	18.067	1.000	81.63±5.50
Diuron	232	233 →72 233 →160	18.474	0.9999	76.57±3.97
Propazin	229	230 →146 230 →188	22.054	0.9993	73.53±6.77
Dimefuron	338	339 →256 339 →140	22.103	0.9981	76.27±6.97
Linuron	248	249 →160 249 →182	22.163	0.9998	74.37±6.57
Metolahlor	283	284 →252 284 →176	24.409	0.9996	74.47±5.80
Terbutilazin	229	230 →174 230 →104	22.499	0.9996	70.70±7.60

Postavljanje ogleda: Za postavljanje ogleda u polukontrolisanim uslovima, izmereno je po 3 g, svežeg biljnog materija (*Lemna minor* L.) prikupljenog sa kanala Šodroš, za četiri ponavljanja. Sočivica se potom prenosila u sudove sa vodom bez prisustva ostataka herbicida (kontrola) i ista masa biljnog materijala u vodu uzorkovanu sa kanala DTD kod naselja Čelarevo (uzorak). Merenje prinosa sveže mase i određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenata i sadržaja lakorastvorljivih proteina, vrši se nakon 24, 48, 72 i 120 h. Određivanje sadržaja fotosintetičkih pigmenta hloroplasta u apsolutnom acetonskom rastvoru rađeno je po metodi Weltsteina (1957). Sadržaj proteina rastvorljivih u vodi određuje se metodom po Kjeldahlu, PDI metoda (Sl. list RS br. 18/87).

Statistička obrada podataka urađena u statističkom softveru Statistica 12 StatSoft (licenca Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet) na osnovu jedno- i dvofaktorijalne ANOVA i primenu Duncan-ovog testa za dobijene statistički signifikantne vrednosti (za $p < 0.05$ i $p < 0.01$).

REZULTATI I DISKUSIJA

Upoređujući rezultate analize kanalske vode, dobijenih tečnom hromatografijom sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS), sa Direktivom EU 2008/105, koja se bavi kvalitetom voda, u kojoj su aneksom X regulisane maksimalno dozvoljene koncentracije polutanata – MACs, obuhvaćeno je 49 zagađujućih supstanci od kojih je 14 herbicida (atrazin, metribuzin, terbutilazin, simazin, metamitron, izoproturon, linuron, hlorotoluron, acetohlor, alahlor, napropamid, propizamid, prometrin, metolahlor). Ovom metodom, detektovani su metolahlor (0,17 $\mu\text{g/l}$), terbutilazin (0,05 $\mu\text{g/l}$), terbutilazin-dezetil (0,5 $\mu\text{g/l}$), atrazin (0,002 $\mu\text{g/l}$), prometrin (10,57 $\mu\text{g/l}$) i linuron u količini od 0,17 $\mu\text{g/l}$.

Za prisustvo herbicida u uzorku vode ili zemljišta, može da se primeni biološka analiza pomoću vrlo osetljivih biljnih vrsta (*Lemna minor* L.) tako da su moguća tačna određivanja u koncentraciji od 0,00075 $\mu\text{g/l}$ (Geoffroy et al., 2004). Prilikom bioloških ispitivanja određena je količina hlorofila a koja se kretala u intervalu od 0,398-0,596 mg/g (kontrola) i 0,622-0,676 mg/g sveže mase (uzorak) (Grafikon 1).

Za vreme trajanje eksperimenta, srednja vrednost količine hlorofila a (mg/g sveže mase) u kontrolnoj grupi iznosila je $X_{srha}/k = 0.506000 \pm 0.042919$ ($\sigma = 0.085837$ i $\sigma^2 = 0.000524$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 24 časa ($X_{minha}/k = 0.398000$), a maksimalna nakon 72 časa ($X_{maxha}/k = 0.596000$). Srednja vrednost hlorofila a u uzorku iznosila je $X_{srha}/u = 0.648250 \pm 0.011448$ ($\sigma = 0.022897$ i $\sigma^2 = 0.000524$). Slično rezultatima dobijenim u kontrolnoj grupi, minimalna vrednost hlorofila a u uzorku konstatovana je nakon 24 časa ($X_{minha}/u = 0.622000$), a maksimalna nakon 72 časa ($X_{maxha}/u = 0.676000$) (Grafikon 1). Primenom dvofaktorijalne ANOVA nisu uočene statistički značajne razlike za srednje vrednosti hlorofila a kao zavisno promenljive u odnosu na kontrolnu grupu/uzorak i vreme merenja kao nezavisno promenljive (za $p < 0.05$). Statistički značajne vrednosti nisu dobijene ni za jednofaktorijalnu ANOVA kada su ispitivane srednje vrednosti hlorofila a i u kontrolnoj

grupi i u uzorku u odnosu na vreme merenja ($p=0.720617$ za $p<0,05$). Međutim, statistički značajne vrednosti dobijaju se poređenjem srednjih vrednosti hlorofila a u kontrolnoj grupi i u uzorku ($p=0.018543$, za $p<0,05$).

Srednje vrednosti količine hlorofila b, sveže mase sočivice, nakon različitog vremenskog perioda provedenog u vodi, bile su znatno više u uzorku (0,306-0,395 mg/g) u odnosu na kontrolu (0,177-0,439 mg/g) (Grafikon 2).

Srednja vrednost količine hlorofila b (mg/g sveže mase) za vreme trajanja eksperimenta u kontrolnoj grupi je iznosila $X_{srhb}/k=0.272250 \pm 0.057369$ ($\sigma=0.114738$ i $\sigma^2=0.013165$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 24 časa ($X_{minhb}/k=0.177000$), a maksimalna

Grafikon 1. Srednja vrednost količine hlorofila a izražena u mg/g sveže mase nakon različitog vremenskog perioda

Grafikon 2. Srednja vrednost količine hlorofila b (mg/g sveže mase) nakon različitog vremenskog perioda

nakon 72 časa ($X_{\max hb/k}=0.439000$). U uzorku su konstatovane nešto više vrednosti, te je srednja vrednost količine hlorofila b iznosila $X_{srhb/u}=0.351000 \pm 0.019523$ ($\sigma=0.039047$ i $\sigma^2=0.001525$), ali je minimalna vrednost uočena nakon 48 časova ($X_{minhb/u}=0.306000$), a maksimalna nakon 24 časa ($X_{\max hb/u}=0.395000$) (Grafikon 2). Međutim, primena dvofaktorijske ANOVA za utvrđivanje razlika u kontrolnoj grupi/uzorku i vremenu kao uparenim faktorima kao i jednofaktorijske ANOVA za pojedinačna delovanja nisu pokazali postojanje statistički značajnih razlika (za $p<0,05$) među izmerenim vrednostima.

Srednje vrednosti količine karotenoida sveže mase sočivice, kao i količina fotosintetičkih pigmenta hlorofila a i b imale su veće vrednosti u uzorku (0,177-0,209 mg/g) u odnosu na kontrolu (0,141-0,198 mg/g) (Grafikon 3).

Tokom izvođenja eksperimenta, srednja vrednost količine karotenoida (mg/g sveže mase) u kontrolnoj grupi iznosila je $X_{src/k}=0.169000 \pm 0.013657$ ($\sigma=0.027313$ i $\sigma^2=0.000746$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 24 časa ($X_{minc/k}=0.141000$), a maksimalna nakon 120 časova ($X_{maxc/k}=0.198000$). Kao i kod hlorofila a i b, u uzorku su uočene više vrednosti, pa je srednja vrednost količine karotenoida bila $X_{src/u}=0.192500 \pm 0.007309$ ($\sigma=0.014617$ i $\sigma^2=0.000214$), ali su minimalne vrednosti uočene nakon 24 časa ($X_{minc/u}=0.177000$), a maksimalne nakon 48 časova ($X_{maxc/u}=0.209000$) (Grafikon 3). Slično srednjim vrednostima količine hlorofila b i srednje vrednosti količine karotenoida nisu pokazale statistički signifikantne razlike u poređenju dobijenih vrednosti za pojedinačne faktore kontrola/uzorak i vreme, kao ni za upareno delovanje ove dve nezavisno promenljive.

U postavljenom ogledu, izmerena sveža masa biljaka sočivice je bila veća u kontroli (3,202-4,2036 g) u odnosu na uzorak (2,303-2,933 g) (Grafikon 4).

Srednja vrednost prinosa biljne mase u kontrolnoj grupi za vreme eksperimenta iznosila je $X_{srpbm/k}=3.899250 \pm 0.235747$ ($\sigma=0.471494$ i $\sigma^2=0.222306$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 48 časova ($X_{minpbm/k}=3.202000$), a maksimalna nakon 120 časova

Grafikon 3. Srednja vrednost količine karotenoida (mg/g sveže mase) nakon različitog vremenskog perioda

($X_{\max \text{pbm}/k}=4.236000$). Međutim, u uzorku, srednja vrednost prinosa biljne mase bila je $X_{\text{srpbm}/u}=2.554000 \pm 0.136819$ ($\sigma=0.273638$ i $\sigma^2=0.074878$), ali je minimalna vrednost uočena nakon 120 časova ($X_{\min \text{pbm}/u}=2.303000$), a maksimalna nakon 24 časa ($X_{\max \text{pbm}/u}=2.933000$) (Grafikon 4). ANOVA nije pokazala postojanje statistički značajnih razlika u udruženom delovanju kontrola/uzorak i vreme, kao ni u uticaju vremena kao pojedinačnog faktora na dobijene srednje vrednosti prinosa biljne mase kao zavisno promenljive. Nasuprot tome, jednofaktorijalna ANOVA ističe postojanje statistički visoko značajnih razlika u srednjim vrednostima prinosa biljne mase između kontrole i uzorka ($p=0.002616$ za $p<0.01$).

Grafikon 4. Prinos biljne mase vrste *Lemna minor* L.

Grafikon 5. Količina rastvorljivih proteina (%)

Prema literaturnim podacima (Landolt, 1986; Leng, 1999), vrsta *Lemna minor* L. je zbog visokog sadržaja proteina (25-45%), a u zavisnosti od stadijuma razvića i reprodukcije, pogodna za stočnu ishranu. Svi biološki parametri vrste *Lemna minor* L. i *L. gibba* L. se koriste u ekotoksikološkim ispitivanjima US Environmental Protection Agency (Anonimni autor, 2014). U ogledu je utvrđena ukupna količina rastvorljivih proteina u uzorku i kontroli u vrlo visokom procentu u odnosu na suhu masu biljaka. Količine rastvorljivih proteina (%) su imale veće vrednosti u kontroli (28,94-40,08) u odnosu na uzorak (32,26-53,09) (Grafikon 5).

Za vreme trajanja eksperimenta, srednja vrednost količine rastvorljivih proteina (%) u kontrolnoj grupi iznosila je $X_{srkrp/k}=40.45250\pm4.673058$ ($\sigma=9.346116$ i $\sigma^2=87.34989$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 72 časa ($X_{minkrp/k}=32.26000$), a maksimalna nakon 48 časova ($X_{maxkrp/k}=53.09000$). U uzorku, srednja vrednost količine rastvorljivih proteina bila je $X_{srkrp/u}=33.08750\pm2.553688$ ($\sigma=5.107376$ i $\sigma^2=26.08529$), pri čemu je minimalna vrednost uočena nakon 24 časa ($X_{minkrp/u}=28.94000$), a maksimalna nakon 48 časova ($X_{maxkrp/u}=40.02000$) (Grafikon 5). Primenjena ANOVA nije pokazala postojanje statistički značajnih razlika u pogledu vrednosti količine rastvorljivih proteina i kontrole/uzorka i vremena, kako pojedinačnih, tako ni uparenih faktora (za $p<0.05$).

ZAKLJUČAK

Analizom vode uzete iz kanala DTD, sa lokaliteta kod naselja Čelarevo, detektovani su ostaci herbicida: metolahlor, terbutilazin, atrazin, prometrin i linuron, kao i terbutilazin dezetil. U uzorcima vrste *Lemna minor* L. utvrđena je razlika u svim merenim biološkim parametrima (sadržaj fotosintetičkih pigmenata, sveže mase i sadržaja proteina rastvorljivih u vodi) a u odnosu na kvalitet vode u kojoj je uzgajana (kontrola i uzorak). Količine fotosintetičkih pigmenata (hlorofila a, b i karotenoida) su bile većih izmerenih vrednosti u uzorkovanoj vodi u kojoj su detektovani herbicidi (metolahlor, terbutilazin, atrazin, prometrin, linuron) i njihovi metaboliti (terbutilazin-desetil) u odnosu na kontrolu. Sadržaj herbicida i njihovih metabolita u kanalskoj vodi je uticao na svežu biljnu masu, koja je izmerena veća u kontroli (3,202-4,236 g) u odnosu na uzorak (2,303-2,933 g). Kvalitet vode je uticao i na sadržaj rastvorljivih proteina (%), jer su biljke u kontroli imale veći sadržaj u odnosu na one gajene u kanalskoj vodi.

ZAHVALNICA

Ovaj rad rezultat je rada na projektu TR 43005, Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

LITERATURA

- Anonymous:** US Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov>. Datum pristupa stranici: 15.april 2014.
- Bursić, V., Gvozdenac, S., Vuković G., Cara, M., Pucarević, M., Lazić, S., Vuković, S., Zeremski, T., Indić, D.:** Comparative study of pesticide residue levels in water from irrigation canal with LC-MS/MS and biological methods, 3rd International Conference of Ecology "Essays on Ecosystem and Environmental Research", May 31- June 5.2013. Tirana, Albania, Proceeding book, 870-874, 2013.
- Bursić, V., Vuković, G., Mirosavljević, S., Meseldžija, M., Arčaba, J., Pucarević, M.:** Prisustvo urea herbicida u kanalskoj vodi, XIX Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 7-8. mart 2014., Čačak, Zbornik radova, Vol 19 (21), 491-495, 2014.
- Dosnon-Olette, R., Couderchet, M., El Arfaoui, A., Sayen, S., Eullaffroy, P.:** Influence of initial pesticide concentrations and plant population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species, 408, 2254-2259, 2010.
- Forni, C., Braglia R., Harren, F.J.M., Cristescu, S.M.:** Stress responses od duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dedecyl-sulphate (SDS). *Aquatic Toxicology*, 110-111, 107-113, 2012.
- Geoffroy, L., Frankart, C., Eullaffroy, P.:** Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environ. Pollution*.131 (2): 233-41, 2004.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chi Chang, C.:** Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*), *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 62-69, 2007.
- Ismail, B. S., Siti Humaira, H., Mohd. Talib, L.:** Pesticide pesidue levels in the surface water of the irrigation canals in the mud an irrigation Scheme Kedah, Malaysia, *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS*, 12, 6, 85-90, 2012.
- Landolt, E.:** The family Lemnaceae – a monographic study 1. Veroff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zurich, 71, 1986.
- Leblebici, Z., Aksoy, A.:** Growth and lead axxumulation capacity of *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae): Interactions with nutrient enrichment, *Water Air Soil Pollut.*, 214, 175-184, 2011.
- Leng, R.A.:** Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. FAO, Roma, Italy. Animal Production and Health Div.; University of Tropical Agriculture Foundation, Phnom Penh (Cambodia), 1999.
- Li, T.Y., Xiong, Z.T.:** A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals, *Environ. Toxicol.*, 19, 2, 95-102, 2004.
- Milutinović, V., Vuković, G., Matović, V., Špirović, B.:** Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of pesticide residues in surface water on the territory of Belgrade, Annual MGPR Meeting 2012 and International conference on food and health safety: Moving towards a sustainable agriculture, Belgrade, Serbia 11-12 October, Book of Abstracts, 74, 2012.
- Nikolić, B., Drinić, G., Stojaković, S., Jovanović, V., Đalović, I., Milićević, Z.:** Različiti aspekti inhibicije rastenja i fotosinteze kukuruza (*Zea mays* L.) uzrokovanih fosfonatnim herbicidom sulfosatom.5. Manipulacija statusom korena biljaka raslih u kontrolisanim uslovima. *Acta herbologica*, Vol.19, No.2, 57-63, 2010.
- Nikolić, B., Jovanović, V., Đurović, S., Milićević, Z., Janjić, V., Dodig, D.:** Uticaj fitohormona kinetina na razvoj fitotoksičnog procesa uzrokovanog fosfonatnim herbicidom sulfosatom. *Acta herbologica*, Vol.19, No.2, 65-69, 2010.
- Official Journal of the European Union:** Directive 2008/105/EC of the European parliament and of the council. Available at: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/eur84568.pdf>, 2008.
- Razinger, J., Drinovec, L., Zrimec, A.:** Real-time visualization of oxidative stress in a floting macrophyte *Lemna minor* L. exposed to cadmium, copper, menadione and AAPH. *Environmental Toxicology*, 573-580, 2009.
- Službeni list RS:** Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama fizičkih, hemijskih i mikrobioloških analiza stočne hrane. Br. 18/87.

- Tel-Or, E., Forni, C.:** Phytoremediation of hazardous toxic metals and organics by photosynthetic aquatic systems, *Plant Biosystems*, 145, 1, 224–235, 2011.
- Weltstein, D.:** Chlorophyll-letale und der submicroscopische formwechsel der plastiden. *Exp.Cell Res.* 12, 437-440, 1957.
- Zimmo, O.:** Nitrogen transformations and removal mechanisms in algal and duckweed waste stabilization ponds. PhD thesis, International Institute for Infrastructural, Hydraulic and Environmental Engineering, Delft, The Netherlands, 2003.

The Effect of present herbicides and their metabolites in canal water on biological parameters *Lemna minor* L.

SUMMARY

The samples for water analyses were taken from DTD canal from the locality Čelarevo. A multi-residue method was used for the determination of twenty-one herbicides and the products of their transformation with isoproturon-d6 and atrazine-d5 as internal standards in surface water using liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) with ESI. Metolachor, terbuthylazine, atrazine, prometryn and linuron as well as terbuthylazine-desethyl (metabolite of terbutylazine) were detected. Plant material (3 g) was transmitted in the courts with the canal water (sample) and water without herbicides residues (control). Measurements of biological parameters were performed after 24, 48, 72 and 120 h. Quantities of photosynthetic pigments (chlorophylls a, b and carotenoids) were higher in the sampled water measured values in comparison with the control. The content of herbicides and their metabolites of the canal water had affected the fresh weight of a plant, which was greater in the plants grown in the control (3.202 to 4.236) in comparison to the sample (2.303 to 2.933). Quantities of soluble protein (%) had higher values of the control (32.26 to 53.09) in comparison to the sample (28.94 to 40.08).

Keywords: herbicides, metabolites, canal water, *Lemna minor* L.