

# Utjecaj troske iz elektropeći na rast i fiziološke procese graha (*Phaseolus vulgaris* L.)

---

Sandev, Dubravka

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:272466>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Dubravka Sandev

UTJECAJ TROSKE IZ ELEKTROPEĆI NA  
RAST I FIZIOLOŠKE PROCESE GRAHA  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Dubravka Sandev

EFFECT OF ELECTRIC ARC FURNACE  
SLAG ON GROWTH AND  
PHYSIOLOGY OF COMMON BEAN  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016

Ovaj je doktorski rad izrađen u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Radić Brkanac, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## ZAHVALA

Ovu disertaciju pisala sam u intenzivnom životnom razdoblju u kojem se često privatni život nametnuo kao prioritet nad profesionalnim. Bilo je izrazito teško uskladiti ta dva prioriteta: razvijati ideju doktorske disertacije, biti pod stresom zbog svih postavljenih rokova i nepredviđenih događaja u privatnom životu. No, često mi je upravo ta činjenica davala dodatnu snagu da nastavim i dovršim započeto...

U tome mi je apsolutno najveća podrška bila moja mentorica, učiteljica i prijateljica, moj veliki uzor u poštenju, znanosti i struci, doc. dr. sc. Sandra Radić Brkanac koja je nesebično prenosila na mene svoje znanje i prijateljstvo te čija je podrška, povjerenje, pomoć i razumijevanje potpuno i bezrezervno.

Kolegama i prijateljima iz uprave Botaničkog vrta zahvaljujem na velikoj podršci i razumijevanju zbog čestih izbivanja te poticaju i podsjećanju na cilj koji sam si zacrtala na svom putu.

Svim kolegama iz laboratorija za biljnu fiziologiju Botaničkog zavoda PMF-a hvala na praktičnim savjetima, pomoći i razumijevanju tijekom višegodišnjeg rada u njihovom laboratoriju gdje sam se uvijek osjećala 'kao kod kuće'.

Prof. dr. sc. Hrvoju Lepedušu, Dr. sc. Zorani Sedlar i Heleni Crnojević na stručnoj pomoći i mjerenjima.

Vrtlaticama u Botaničkom vrtu PMF-a koje su zalijevale i brinule o pokusnim biljkama kroz tri godine pokusa.

Mojoj dragoj obitelji i prijateljima na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

UTJECAJ TROSKE IZ ELEKTROPEĆI NA RAST I FIZIOLOŠKE PROCESE GRAHA  
(*Phaseolus vulgaris* L.)

DUBRAVKA SANDEV

Botanički zavod, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet

Troska korištena u ovom istraživanju je nusprodukt pri proizvodnji nelegiranih ugljičnih čelika u elektropeći. Istraživanja kemijskog sastava troske utvrdila su relativno visok udio makro- i mikroelemenata te nizak sadržaj toksičnih metala. Dokazano je da se metali iz troske postepeno otpuštaju te da ne predstavljaju rizik za okoliš. Cilj istraživanja bio je procijeniti utjecaj troske na rast i fiziološke procese graha (*Phaseolus vulgaris*) te usporediti njenu učinkovitost s onom umjetnog gnojiva. U tu su svrhu provedeni eksperimenti u stakleniku i na pokusnim poljima tijekom nekoliko sezona. Troska je u nižim količinama povećala rast graha, sadržaj pojedinih hranjivih tvari u supstratu i grahu kao i intenzitet fotosinteze. Na temelju pokazatelja oksidacijskog stresa, utvrđeno je da troska nije fitotoksična. Rezultati su pokazali da je troska izvrstan izvor hranjiva neophodnih za rast i razvoj biljaka, po mnogim parametrima bolji ili podjednako učinkovit kao umjetno gnojivo. Elektropečna troska može se koristiti kao učinkovit poboljšivač tla.

(123 stranica/15 slika/25 tablica/227 literaturnih navoda/jezik izvornika: hrvatski)

**Ključne riječi:** elektropečna troska, hranjiva, fotosinteza, grah

Mentor: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, doc.

Ocjenjivači: dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina, prof.

dr. sc. Hrvoje Lepeduš, prof.

dr. sc. Ana-Marija Domijan, izv. prof.

EFFECT OF ELECTRIC ARC STEEL SLAG ON GROWTH AND  
PHYSIOLOGY OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.)

DUBRAVKA SANDEV

Division of Botany, Department of Biology, Faculty of Science

The slag used in this research is a byproduct of unalloyed carbon steel making process in electric arc furnace. Chemical composition of the steel slag show relatively high content of certain macro- and microelements and the low content of toxic metals. Metals within slag are released gradually and thus do not pose a threat to the environment. The aim of this study was to evaluate the effects of steel slag on growth and physiological processes of bean (*Phaseolus vulgaris*) and to compare the efficiency of steel slag to that of the artificial fertilizer. For the purpose, greenhouse and field experiments were conducted during several seasons. Steel slag increased growth, content of essential minerals in the substrate and bean plants as well as photosynthetic rate. Based on oxidative stress parameters, potential phytotoxicity of steel slag was not determined. The obtained results show that steel slag is a very good and inexpensive source of nutrients essential to plants, equally efficient or even better than artificial fertilizer. The steel slag can be used as an excellent soil amendment.

(123 pages/15 figures/25 tables/227 references/original in: Croatian)

**Ključne riječi:** electric arc steel slag, nutrients, photosynthesis, common bean

Supervisor: Dr. Sandra Radić Brkanac, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Branka Pevalek-Kozlina, Prof.

Dr. Hrvoje Lepeduš, Prof.

Dr. Ana-Marija Domijan, Assoc. Prof.

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja .....	4
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
2.1. Troska .....	5
2.1.1. Proizvodnja čelika i troske u svijetu .....	5
2.1.2. Proizvodnja troske i čelika u Hrvatskoj .....	7
2.1.3. Vrsta troske .....	8
2.1.4. Elektropečna troska .....	8
2.1.5. Upotreba troske .....	11
2.2. Poboljšivači tla .....	13
2.2.1. Troska kao anorganski poboljšivač tla i njen utjecaj na okoliš .....	14
2.2.2. Klasična gnojiva i njihov utjecaj na rast biljaka i okoliš .....	18
2.3. Mineralne tvari .....	21
2.3.1. Dostupnost kationa .....	23
2.3.2. Dostupnost aniona .....	25
2.4. Fitotoksičnost metala .....	27
2.4.1. Oksidacijski stres .....	28
2.4.2. Obrambeni mehanizam biljke .....	30
2.5. Fotosinteza .....	32
2.5.1. Fotosintetska učinkovitost .....	32
2.5.2. Fluorescencija klorofila .....	33
2.5.3. Metoda izmjene plinova .....	35
2.5.4. Primjena fluorescencije klorofila <i>a</i> i metode izmjene plinova u istraživanjima .....	35
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>36</b>
3.1. Biljni materijal .....	36
3.2. Metode .....	37
3.2.1. Sastav supstrata za sađenje i uzgoj biljaka .....	37
3.2.2. Parametri rasta .....	37
3.2.3. Određivanje parametara u supstratu .....	38
3.2.3.1. Određivanje pH reakcije tla u vodi i otopini KCl .....	38
3.2.3.2. Određivanje električnog konduktiviteta u tlu .....	38



3.2.3.3. Određivanje pristupačnog fosfora u tlu Trougovom ekstrakcijom	.....	38
3.2.3.4. Određivanje dušika po Kjeldahlu	.....	39
3.2.4. Određivanje sadržaja metala, dušika i fosfora u supstratu i listovima	.....	40
3.2.4.1. Priprema uzoraka za određivanje sadržaja metala u supstratu	.....	40
3.2.4.2. Određivanje sadržaja natrija, kalija, magnezija, mangana i željeza u listovima	.....	40
3.2.4.3. Priprema uzoraka za određivanje sadržaja dušika i fosfora u supstratu i listovima	.....	41
3.2.4.4. Određivanje sadržaja dušika i fosfora	.....	42
3.2.5. Mjerenje intenziteta fotosinteze metodom izmjene plinova	.....	42
3.2.6. Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i> metodom saturacijskog pulsa	.....	43
3.2.7. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila <i>a</i> i OJIP test	.....	44
3.2.8. Određivanje sadržaja pigmenata	.....	46
3.2.9. Određivanje sadržaja malondialdehida	.....	47
3.2.10. Određivanje sadržaja karbonila	.....	48
3.2.11. Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina	.....	49
3.2.12. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	.....	49
3.2.13. Određivanje aktivnosti peroksidaze	.....	50
3.2.14. Određivanje aktivnosti nitrat reduktaze	.....	51
3.3. Statistička obrada podataka	.....	52
<b>4. REZULTATI</b>	.....	<b>53</b>
4.1. Pokazatelji rasta graha	.....	53
4.1.1. Visina, broj listova i mahuna graha – staklenik	.....	53
4.1.2. Prinos mase suhe tvari – staklenik	.....	55
4.1.3. Visina, broj listova i mahuna graha – polje	.....	56
4.1.4. Prinos mase suhe tvari – polje	.....	57
4.2. Sadržaj makro- i mikroelemenata	.....	58
4.2.1. Sadržaj makro- i mikroelemenata u supstratu – staklenik	.....	58
4.2.2. Sadržaj makro- i mikroelemenata u listovima graha – staklenik	.....	60
4.2.3. Sadržaj makro- i mikroelemenata u supstratu – pokusno polje	.....	63
4.2.4. Sadržaj makro- i mikroelemenata u grahu – pokusno polje	.....	65
4.2.5. Aktivnost nitrat-reduktaze u listovima graha – staklenik i pokusno polje	.....	68
4.3. Funkcionalnost fotosintetskog aparata	.....	69

4.3.1. Fotosinteza – metoda izmjene plinova – staklenik	69
4.3.2. Fotosinteza – metoda izmjene plinova – pokusno polje	72
4.3.3. Fluorescencija klorofila <i>a</i> – metoda saturacijskog pulsa – staklenik	74
4.3.4. Fluorescencija klorofila <i>a</i> – metoda saturacijskog pulsa – polje	76
4.3.5. Fluorescencija klorofila <i>a</i> – polifazni rast i OJIP test – staklenik	78
4.3.6. Fluorescencija klorofila <i>a</i> – polifazni rast i OJIP test – pokusno polje	81
4.3.7. Sadržaj klorofila i karotenoida – staklenik	84
4.3.8. Sadržaj klorofila i karotenoida – pokusno polje	86
4.4. Pokazatelji oksidacijskog stresa	87
4.4.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa – staklenik	87
4.4.2. Pokazatelji oksidacijskog stresa – pokusno polje	89
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>91</b>
5.1. Pokazatelji rasta graha	92
5.2. Sadržaj makro- i mikroelemenata	93
5.3. Funkcionalnost fotosintetskog aparata	99
5.4. Pokazatelji oksidacijskog stresa	104
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>107</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>108</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b>	<b>123</b>



Sunčeva svjetlost glavni je pokretač metabolizma u autotrofnih biljaka u kojima se pomoću vode, mineralnih tvari i ugljikova dioksida sintetiziraju organski spojevi i kisik. Sve biljke imaju mogućnost primanja elemenata esencijalnih za njihov rast i razvoj iz tla i vode. Takvih je elemenata 17 te su podijeljeni u makroelemente i mikroelemente (Pevalek-Kozlina, 2003). Povećanjem ljudske populacije, a time i većom potrebom ljudi za proizvodnjom hrane, uzastopno se na istom prostoru uzgajaju iste ili različite poljoprivredne kulture. Tim se postupcima tla iscrpljuju i osiromašuju te ih je potrebno "umjetno" obogatiti odnosno osigurati hranjive tvari u dovoljnim količinama. Različiti su načini putem kojih poljoprivrednici i relevantni stručnjaci pristupaju tom problemu. Najčešće se problem osiromašenog odnosno iscrpljenog tla rješava primjenom mineralnih gnojiva koja u idealnim omjerima hranjivih elemenata doprinose povećanju prinosa, poboljšanju kvalitete proizvoda te ubrzavaju rast dotične kulture. Mineralna gnojiva moguće je dodati u točno određenoj količini te točno onaj element za koji se utvrdi manjak u tlu, a time i njegova slabija dostupnost biljci. Nažalost, zbog prekomjerne uporabe mineralnih gnojiva dolazi do povećanja sadržaja istih u tlu te njegovog ispiranja u dublje slojeve što narušava ravnotežu mineralnih tvari u tlu i uzrokuje onečišćenje okoliša te izvora pitke vode. Naime, biljke apsorbiraju samo manju količinu dodanih mineralnih tvari a ostatak odlazi u dublje slojeve tla. Glavni onečištači koji potječu od prekomjerne upotrebe mineralnih gnojiva su dušik i fosfor (Savci, 2012; Adetunji, 1994).

Brojna istraživanja o štetnosti korištenja mineralnih gnojiva potaknula su stručnjake na istraživanja o alternativnim izvorima prihrane i poboljšanja kvalitete tla. Poboljšivači tla prema definiciji nisu namijenjeni ishrani biljaka već poboljšanju fizikalnih i/ili kemijskih svojstava i/ili biološke aktivnosti tla (NN 163/2003). Danas na tržištu postoje mnogi poboljšivači tla, no svakako su najzanimljiviji oni koji se dobivaju iz otpada. S jedne strane zanimljiv je ekonomski aspekt takvih poboljšivača - smanjenje upotrebe skupih sintetskih gnojiva, izbjegavanje visokih troškova odlaganja otpada te troškovi naknada za proizvedeni i neiskorišteni otpad no s druge strane i ekološki aspekt - smanjenje potreba za odlagalištima, recikliranje otpada, manja štetnost za okoliš. Prije korištenja otpada kao poboljšivača tla potrebno je napraviti opsežna istraživanja o njihovom ekološkom, zdravstvenom i estetskom utjecaju na okoliš kako bi se utvrdilo jesu li takvi otpadi neškodljivi za živi svijet te imaju li očekivane pozitivne učinke.

Poboljšivači tla mogu biti anorganskog i organskog podrijetla. Elektropećna troska se prema svom kemijskom sastavu i utjecaju na kvalitetu tla svrstava se u anorganske poboljšivače tla.

Dobiva se tijekom taljenja oksida u procesu proizvodnje čelika u elektrolučnim pećima. Ispitivanjem eluata uzoraka elektropećne troske određen joj je elementarni i fazni sastav, morfologija i sadržaj teških metala te je utvrđen stabilan kemijski sastav. Dopušteno ju je odložiti na odlagalištima za neopasni otpad, a njena primjena u drugim industrijskim granama moguća je bez štetnih posljedica (Sofilić i Brnardić, 2013). Troska ima dugu tradiciju upotrebe u Njemačkoj kao i u drugim razvijenim industrijskim zemljama (Motz i Geiseler, 2001). Prvenstveno se koristi u cestogradnji, u proizvodnji cementa i građevinarstvu. Tijekom 19. i 20. stoljeća velikom proizvodnjom čelika proizvodilo se i sve više troske koja se počela koristiti i kao izvor fosfora i željeza u uzgoju agrokultura te se u te svrhe koristi i danas. Nacionalno udruženje za trosku Kanade i SAD-a je 1998. g. objavilo detaljna istraživanja 45 proizvođača troske, dobivene pri proizvodnji čelika u elektrolučnim pećima, kojima se pokušao procijeniti mogući rizik korištenja troske kao gnojiva ili punila za ceste. Tim je istraživanjima utvrđeno da se metali iz troske postepeno oslobađaju u okoliš te da ne predstavljaju rizik za biljke (kopnene i vodene), životinje te zdravlje ljudi (Wintenborn i Green, 1998).

Troska obogaćuje tlo mineralnim tvarima. Dobar je i jeftin izvor željeza, fosfora, magnezija, kalcija, kalija te mnogih mikroelemenata kao što su mangan, bor, molibden, cink i bakar. Jedan od glavnih sastojaka troske su kalcijev i magnezijev oksid koji u reakciji s vodom stvaraju hidroksid te čine trosku lužnatom. Njezinim dodavanjem u tlo rješava se ogroman svjetski problem kiselih tala jer se dodatkom troske povećava i pH vrijednost tla. Jedan od gorućih problema u poljoprivredi je svakako manjak i slaba dostupnost fosfora u tlu. Troska svojim posebnim sastavom pozitivno utječe na njegovu dostupnost. Naime, velike količine silicija iz troske zamjenjuju mjesta s fosforom (Kristen i Erstad, 1996) i na taj se način fosfor otpušta u otopinu tla u obliku dostupnom biljci. S druge strane, aluminij, kalcij i željezo iz troske s fosforom stvaraju spojeve veće topivosti (Shen i sur., 2011). Troska također mobilizira teške metale u tlu djelomično povećanjem pH vrijednosti tla, a djelomično stvaranjem stabilnih spojeva s teškim metalima (Kumpiene i sur., 2008). Troska zbog velikog udjela silicija te njegovog nakupljanja u stanicama čini biljke otpornijima na napade patogena i bolesti (to posebice vrijedi za biljke poput riže kojima je Si esencijalni element) te smanjuje stres nastao promjenama u okolišu. Vrijednost troske u agronomskom smislu varira ovisno o biljnoj vrsti, tipu tla te klimatskim promjenama. Uspješna upotreba troske uočena je kod rasta i prinosa krumpira (Wang i Cai, 2006), uroda riže i šećerne trske (Anderson i sur., 1987), suncokreta (Gašpar, 2010) i mnogih drugih kultura. Pozitivan učinak troske uvelike ovisi o njenom sastavu koji varira ovisno o proizvođaču čelika, odnosno o izvoru Fe u proizvodnji

čelika. Elektropečna troska u prosjeku sadrži 25-45% CaO, 10-35% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10-18 SiO<sub>2</sub>, 4-13% MgO, 1-8% Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2-8% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, manje od 1% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O i Na kao i elemente u tragovima (Yildirim i Prezzi, 2011). Prema Rastovčan-Mioč i sur. (2009) uzorak elektropečne troske iz Željezare Sisak (ABS Sisak doo), koja je korištena u ovom radu, sadrži 30% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 33% CaO, 8% CaCO<sub>3</sub>, 11% SiO<sub>2</sub>, 8% MgCO<sub>3</sub>, 0,496% MnO<sub>2</sub>, 1,8% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,031% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 0,06% K<sub>2</sub>O i 0,06% Na<sub>2</sub>O, kao i neke teške metale u tragovima (Cu, Zn, Pb, Cr, Mo, Cd, Hg), s pH vrijednosti 11,91. Istraživanja su također pokazala da ta troska ne sadrži radioaktivne tvari iznad graničnih vrijednosti koncentracija (Rastovčan-Mioč i sur., 2002). Potencijalna fitotoksičnost troske slabo je istraživana. Dugogodišnji utjecaj teških metala iz troske, vanadija i kroma, ispitali su Kühn i sur. (2006) te su dokazali da niti jedan od tih teških metala nisu negativno utjecali na rast, prinos te na onečišćenje tla. Do sličnih su rezultata došli su i Radić i sur. (2013) koji su dokazali da nema negativnih utjecaja na rast kukuruza te su utvrdili pozitivan učinak troske na kvalitetu tla i povećanje biomase, bolju opskrbljenost biljaka mineralnim tvarima, učinkovitiju fotosintezu i efikasne obrambene mehanizme biljke. U ovom je radu kao modalna biljka korišten grah (*Phaseolus vulgaris* L.) koji je važna poljoprivredna kultura u prehrani ljudi. Ta je agrokultura posebice bogata proteinima, kalijem, fosforom te vitaminima B kompleksa, a ostatci se koriste kao stočna hrana.

## 1.1. Ciljevi istraživanja i hipoteze

### Ciljevi

- Utvrditi učinak troske na rast i produktivnost graha praćenjem pokazatelja rasta, sadržaja mineralnih tvari i učinkovitosti fotosinteze
- Usporediti učinak troske s klasičnim mineralnim gnojivom (tekuće gnojivo NPK s dodatkom Fe)
- Utvrditi potencijalno fitotoksično djelovanje troske obzirom da sadrži veće količine željeza

### Hipoteze

- Elektropečna troska se zbog visokog udjela esencijalnih hranjiva može koristiti kao potencijalni izvor mineralnih tvari ili kao anorganski poboljšivač tla
- S ekonomskog i ekološkog aspekta elektropečna troska će opravdati svoje korištenje u usporedbi s klasičnim gnojivom
- Iako sadrži veće količine željeza, dugotrajna upotreba troske kao poboljšivača tla neće povećati oksidacijski stres odnosno uzrokovati fitotoksično djelovanje jer se metali iz troske polagano otpuštaju u tlo

### 2.1. Troska

Troska je nusproizvod koji nastaje tijekom procesa taljenja u proizvodnji čelika i drugim metalurškim procesima, a čine ju onečišćenja u metalima, rudama ili spaljivanim materijalima. Njeno korištenje datira još od prije 2000 godina u doba Rimskog carstva kada se koristila za gradnju cesta. Sve do sredine prošlog stoljeća njena upotreba bila je sporadična. Sve veći zahtjevi usmjereni na zaštitu okoliša i recikliranje otpada snažno utječu na povećano korištenje troske. Danas je njena upotreba toliko široka da se troska više ne tretira kao korisni otpad nego kao sporedni proizvod (koprodukt) industrije čelika.

#### 2.1.1. Proizvodnja čelika i troske u svijetu

Meteorsko (telurno) željezo upotrebljavalo se već vrlo rano. Poznato je da je željezo poznavao još faraon Tutankamon koji je živio oko 2800 g. pr. Kr. Prvi zapisi o dobivanju željeza iz ruda potječu iz Anadolije, današnje Male Azije oko 1500 g. pr. Kr. Ruda koja se koristila najvjerojatnije je bila hematit ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) koji se kovanjem pretvarao u upotrebljiv metal tzv. "spužvasto željezo". Naime, zbog nedovoljne temperature primitivnih peći nije bilo moguće dobivanje lijevanog željeza. Smatra se da je pleme Hitita iz Male Azije steklo svoju veliku vojnu moć upravo zbog rane proizvodnje željeznog oružja. U to je vrijeme cijena željeza bila veća od cijene zlata, a način njegovog dobivanja čuvao se kao najstroža tajna. (Matković i Matković, 2009). Prema dostupnim literaturnim podacima ([http://www.asa-inc.org.au/Doc/ASA\\_Connections\\_Dec\\_2007.pdf](http://www.asa-inc.org.au/Doc/ASA_Connections_Dec_2007.pdf); <http://www.nationalslag.org/slag-history>; Baricova i sur., 2006) troska se u Njemačkoj koristila već 1589. godine pri izradi topovskih kugli, a u Engleskoj u proizvodnji streljiva. U Njemačkoj se 1852. počinje primjenjivati u industriji cementa, u Wales-u desetak godina ranije za izradu mineralne vune. Krajem 19. stoljeća Nijemci je koriste za izradu ojačanog betona, a Japanci su metaluršku trosku koristili pri izradi opeka od 1901. godine. Sve veću primjenu troske možemo zahvaliti modernoj proizvodnji čelika koja datira iz sredine 19. stoljeća. Naime, Henry Bessemer razvio je 1856. godine odličan način smanjivanja udjela ugljika iz željezne rude dovođenjem zraka, odnosno kisika. Takav je način dobivanja čelika poznat kao Bessemerov postupak. Manjkavost ovakvog načina proizvodnje čelika bila je prevelika količina zaostalog fosfora koja je smanjivala kvalitetu, odnosno povećavala krtost čelika. Danas se dobivanje čelika odvija u tri faze. Prvo se u visokim pećima iz željeznih ruda dobiva sirovo željezo koje u sebi ima veliki postotak ugljika (3,5% - 4,25%). Takvo sirovo željezo obrađuje se u čeličanama



gdje mu se smanjuje postotak ugljika na manje od 1%, te se provodi deoksidacija (postupak kojim se čelik oslobađa znatnih količina kisika). Načini proizvodnje čelika mijenjali su se tijekom prošlosti, a do danas su se zadržali postupci dobivanja čelika u kisikovim konvertorima, u elektrolučnim pećima i u Siemens-Martinovim (SM) pećima. Siemens-Martinovim postupkom u peći s otvorenim ložištem iz sirovog željeza i čeličnog otpada (starog željeza) dobiva se SM čelik. Za dobivanje čelika u kisikovim konvertorima (engl. *Basic oxygen furnace*, BOF) koristi se uz čelični otpad i sirovo željezo proizvedeno u visokim pećima tzv. koksnom metalurgijom. Prema podacima iz 2003. godine 63,3% čelika proizvedeno je u kisikovim konvertorima, 33,1% u elektrolučnim pećima i samo 3,6% u SM pećima (Gojić, 2006). Početkom 20. stoljeća sve veća upotreba električne energije u proizvodnji sirovog željeza i čelika rezultirala je puštanjem u proizvodnju elektrolučne peći (engl. *Electric arc furnace slag*, EAF). Taj postupak koristi se za recikliranje relativno jeftinog čeličnog otpada njegovim pretaljivanjem. Za tonu čelika potrebno je između 1,08 i 1,13 tona čeličnog otpada (Sofilić i sur., 2004). Elektrolučne peći se obično koriste u mini čeličanicama u zemljama s jeftinom električnom energijom i čeličnim otpadom, a služe za proizvodnju visokovrijednih čelika i vrlo su prilagodljive tržišnim uvjetima. Suvremene UHP (*Ultra High Power*) peći po produktivnosti se približavaju konvertorima. S ekološkog stajališta prihvatljiviji je put proizvodnje čelika preko elektrolučne peći nego preko konvertora jer za 1 tonu elektročelika treba 2,4 puta manje toplinske energije. Time je i znatno manja emisija stakleničkog plina CO<sub>2</sub> (Sofilić i sur., 2004).

Željezo je bez ugljika (kao osnovni metal) vrlo mekano i ne može poslužiti kao građevinski materijal. Na promjenu svojstava željeza utječe dodavanje drugih elemenata od kojih je najvažniji ugljik. Dodavanjem već vrlo malih količina ugljika znatno se mijenjaju mehanička svojstva čelika. Klasična podjela legura željeza i ugljika temeljena je na sastavu:

- *bijelo željezo* sadrži vrlo malo ugljika (cca 0,01%) koji nema značajnijeg utjecaja na njegova svojstva,
- *čelik* sadrži obično od 0,05 - 1,5% ugljika, a maksimalno 2,06% ,
- *lijevano željezo* sadrži od 2,0 - 2,5% ugljika.

Osim omjera količine željeza i ugljika na svojstva čelika utječu i prateći te legirajući elementi. Poželjni prateći elementi su mangan i silicij koji oplemenjuju svojstva čelika. U nepoželjne elemente, koji pogoršavaju svojstva čelika, spadaju fosfor, sumpor, kisik (oksidi i silikati), dušik i vodik.

Legirajući elementi (krom, nikal, vanadij, volfram, bakar, molibden, aluminij) dodaju se čeliku kako bi se ciljano poboljšala neka njegova svojstva.

Zbog činjenice da troska nije prirodni mineral statistički podaci o njenoj proizvodnji u svijetu nisu dostupni, pa se godišnje svjetske količine nastale troske procjenjuju na temelju tipičnih odnosa troske i sirovog željeza odnosno čelika u čijim procesima proizvodnje troska i nastaje. U razdoblju od 2008. do 2011. godine proizvodnja sirovog željeza kretala se između 935 i 1084 milijuna tona godišnje dok je u istom razdoblju proizvodnja čelika bila između 1235 i 1515 milijuna tona godišnje (Japan Iron and Steel Federation, 2011). Ukoliko se uzme u obzir da količina nastale visokopećne troske po toni sirovog željeza iznosi 250 kg, može se procijeniti da se u navedenom razdoblju u svijetu godišnje proizvodilo između 234 i 271 milijuna tona visokopećne troske. S obzirom da se količina troske koja nastaje u procesu proizvodnje čelika postupkom kisikovih konvertorskih peći kreće od 85 do 165 kg po toni konvertorskog čelika, a u elektropečnom postupku od 60 do 263 kg po toni elektročelika, za procjenu nastale količine čeličanske troske može se uzeti prosječna količina od 100 kg/t proizvedenog čelika. Na ovaj način se za razdoblje od 2008. do 2011. može reći da se količina čeličanske troske u svijetu kretala od 123 do 151 milijuna tona godišnje. Analogno ovome, procijenjena količina nastale visokopećne troske u EU-27 u istom razdoblju bila je između 20 i 22 tona godišnje, a količina nastale čeličanske troske u tom razdoblju procjenjuje se na 14 do 20 milijuna tona godišnje. Visokopećna troska ima važnu primjenu u cestogradnji i graditeljstvu, kao izolacijski materijal i za proizvodnju obojenog ambalažnog stakla. Najveća primjena visokopećne troske je u industriji cementa (kao sirovina za proizvodnju klinkera ili kao dodatak cementu) te predstavlja potencijalnu zamjenu za "portland" cement u betonu (Rastovčan-Mioč i sur., 2009).

### 2.1.2. Proizvodnja čelika i troske u Hrvatskoj

U Hrvatskoj se troska proizvodila u čeličanama u Sisku i Splitu. Posljednje količine visokopećne troske nastale su 1990. u Sisku gdje je do tada proces proizvodnje sirovog željeza u visokoj peći bio u radu. Nakon toga slijedi porast proizvodnje čelika elektropečnim postupkom. Naši najveći proizvođači čelika i čeličnog odnosno željeznog lijeva svoj proizvodni otpad sakupljaju odvojeno, pri čemu samo dio nastalog otpada vraćaju u proces proizvodnje, dio otpada se ponekad rabi kao sekundarna sirovina u drugim industrijama, a najveći dio završava na vlastitom neuređenom odlagalištu u krugu tvornice (troska, ogorina, istrošeni ljevarski pijesak). Prema podacima o godišnjoj proizvodnji čelika objavljenim na stranicama Svjetske federacije čelika, u Hrvatskoj se od 2002. do 2011. godine proizvodnja

čelika utrostručila, pa je tako 2011. godine iznosila 100 000 tona. Iz tih podataka proizlazi da se godišnje u Hrvatskoj proizvede 10 000 tona troske (Japan Iron and Steel Federation, 2011). Velika količina troske iz ranijih godina odložena na odlagalištu u Sisku zauzima prostor od 25 ha i procjenjuje se na oko 1,5 milijuna tona. Troska s odlagališta u Splitu porijeklom je također iz elektrolučnih peći te se njena zaliha procjenjuje na nekoliko desetaka tisuća tona.

### 2.1.3. Vrste troske

U procesu proizvodnje čelika dobiva se nekoliko različitih vrsta troske. Tijekom procesa taljenja ili rafinacije troska "pliva" na površini rastaljenog metala štiteći ga od oksidacijskog ili redukcijskog djelovanja atmosfere i pri tome ga drži čistim. U procesima proizvodnje sirovog željeza i čelika troska nastaje u određenoj fazi procesa rafinacije taline dodavanjem nemetalnih dodataka i topitelja (smjese različitih oksida) kao i međudjelovanjem taline i vatrostalnog materijala kojim je obzidana unutrašnja strana peći. Trosku dijelimo na: željeznu trosku, uključujući visokopećnu trosku i čeličansku trosku, neželjeznu trosku nastalu pri proizvodnji neželjeznih (lakih i obojenih) metala (Cu, Zn, Pb, Ni, ...), trosku nastalu u termoenergetskim postrojenjima te trosku nastalu u spalionicama krutog otpada. Prema kemijskom sastavu čeličanska troska ima vrlo kompleksnu osnovu koja se primarno sastoji od oksida kalcija, željeza, silicija, aluminijska, magnezija i mangana povezanih u složene spojeve kalcijevih silikata, aluminosilikata i aluminoferita. Nakon uklanjanja tekuće troske primjenjuje se jedna od metoda hlađenja (Kalyoncu, 1997) što izravno utječe na njezine fizička svojstva (gustoću, poroznost i krupnoću zrna), a samim time i na njezinu primjenjivost kao sekundarne sirovine u drugim granama industrije (Bradaškja i sur., 2004).

### 2.1.4. Elektropečna troska

Elektropečna troska (Slika 1) nastaje u velikim količinama tijekom taljenja oksida u procesu proizvodnje čelika u elektrolučnoj peći. Ovisno o uvjetima tehnološkog procesa dobivanja sirovog čelika, troska može sadržavati i preko 7% čelika. Navedeni postotak predstavlja stvaran gubitak željeza iz punjenja elektrolučne peći. Preradom troske moguće je taj čelik kao uložak ponovno vratiti u elektrolučnu peć. To se postiže propuštanjem troske kroz grubu rešetku i izdvajanjem krupnih komada željeza magnetom. Nakon transporta do drobilice, drobljenja, transporta do sita i prosijavanja moguće je i dodatno izdvajanje željeza iz dobivenih frakcija (Matijašić i Žižek, 2009).



**Slika 1.** Elektropečna troska iz čeličane Sisak (Foto: Sofilić T.)

Elektropečna troska je po količini najznačajniji otpad koji nastaje u elektropečnom procesu proizvodnje čelika i kreće se od 60 do 270 kg/t sirovog čelika. Ispitivanjem eluata uzoraka elektropečne troske potvrđena je mogućnost njenog sigurnog odlaganja te se zbrinjavala trajnim odlaganjem na neuređenim odlagalištima u blizini samih čeličana. Na taj način su svi vrijedni sastojci troske izgubljeni kao potencijalni izvor sekundarne sirovine za druge industrijske grane. Da bi se troska mogla upotrebljavati kao sekundarna sirovina ispitana su njezina kemijska i radiokemijska svojstva te određene elementarni i fazni sastav, morfologija i sadržaj teških metala u eluatima. Prema Rastovčan-Mioč (1996) elektropečna troska ima stabilan kemijski sastav (Tablica 1). Dobiveni rezultati ukazuju da je sadržaj radioaktivnih tvari u uzorcima troske ispod graničnih vrijednosti koncentracija (Rastovčan-Mioč i sur., 2002) ispod kojih se pojedini radionuklidi izuzimaju iz nadzora (Narodne novine, 2000).

**Tablica 1.** Prosječne vrijednosti kemijskog sastava elektropećne troske dobivene u procesu proizvodnje ugljičnih nelegiranih i nisko legiranih čelika (Rastovčan-Mioč, 1996).

Kemijski sastav	%
FeO	10-35 %
CaO	25-45 %
SiO <sub>2</sub>	10-18 %
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3-8 %
MgO	4-13 %
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1-5 %
TiO <sub>2</sub> , P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , Na <sub>2</sub> O, K <sub>2</sub> O, V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , ZnO, CuO, S i C	≤ 1%

Svako odlaganje otpada, pa tako i troske, na tlo može imati za posljedicu promjenu fizikalno-kemijskih procesa u tlu kao što su promjene vrijednosti pH, osiromašenje tla hranjivim tvarima, promjene kapaciteta i propusnosti tla za vodu i zrak i dr. Kako bi se utvrdila eventualna ekotoksičnost troske provedeno je ispitivanje sastava eluata troske u laboratorijskim uvjetima prema normi DIN 38414-S4. Dobiveni rezultati (Tablica 2) ukazuju da troska zadovoljava propisane uvjete prema kojima ju je dopušteno trajno odložiti na odlagalištima neopasnog otpada (I. i II. kategorije). Njena uporaba u svim industrijskim granama moguća je bez štetnih posljedica po okoliš te je troska ubrojena u neopasni otpad (Sofilić i sur., 2009). Američka agencija za zaštitu okoliša (United States Environmental Protection Agency) isključila je takvu trosku s popisa opasnog otpada još 1990. godine.

**Tablica 2.** Rezultati mjerenja vrijednosti parametara eluata troske namijenjene za trajno odlaganje prema Pravilniku o načinima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada za odlagališta otpada (Sofilić i sur., 2009).

Parametri	mg/kg suhe tvari	
	Granična vrijednost	Izmjerena vrijednost
Arsen	2	<0,1
Barij	100	<15,9
Kadmij	1	<0,1
Ukupni krom	10	<0,5
Bakar	50	<1
Živa	0,2	<0,05
Molidben	10	<0,628
Nikal	10	<1
Olovo	10	<1
Antimon	0,7	<0,05
Selen	0,5	<0,05
Cink	50	<1
Kloridi	15000	133
Fluoridi	150	0,411
Sulfati	20000	17,4

### 2.1.5. Upotreba troske

Visokopećna troska ima važnu primjenu u cestogradnji i graditeljstvu, kao izolacijski materijal i za proizvodnju obojenog ambalažnog stakla. No najveća primjena je u industriji cementa kao sirovina za proizvodnju klinkera ili kao dodatak cementu te predstavlja potencijalnu zamjenu za portland cement u betonu. Primjenjuje se u kolničkim konstrukcijama (za izradu nasipa, posteljica, nevezanih slojeva kolničke konstrukcije - nosivi i tamponski slojevi, vezanih nosivih slojeva od zrnatog kamenog materijala i asfaltnih slojeva

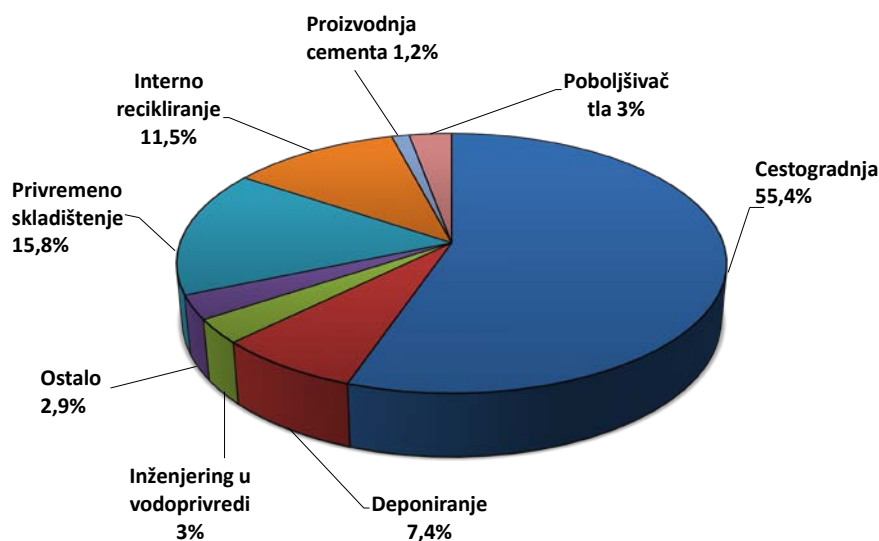
kolničke konstrukcije (Rastovčan-Mioč i sur., 2009). Da bi se mogla koristiti u građevinarstvu, proizvodnji cementa i cestogradnji potrebno ju je usitniti, jer je nastala troska prevelike granulacije i kao takvu nije ju moguće koristiti (Matijašić i Žižek, 2009). Smanjenjem raspoloživih količina visokopećne troske gašenjem procesa proizvodnje sirovog željeza (u Hrvatskoj 1991.) i porasta proizvodnje čelika elektropečnim postupkom, značaj čeličanske troske raste kao i njena primjena u različitim granama industrije i poljoprivredi (Tablica 3).

**Tablica 3.** Neke od najčešćih primjena visokopećne i čeličanske troske (Wintenborn i Green, 1998).

Agregat u cestogradnji (asfaltne mješavine, nosivi slojevi)
Agregat u industriji cementa i betona
Sipina (sprječavanje poledice u zimskim uvjetima)
Stabilizirani nosivi slojevi (sprječavanje erozije)
Uređenje nasipa i obala rijeka
Uređenje morskih luka i obala
Nasipanje neasfaltiranih cesta i putova
Neutraliziranje otpadnih voda rudarske industrije
Agrotehničke mjere (reguliranje pH tla, donor Ca, poboljšivač tla)
Granulirana ispuna (posteljice) kod polaganja cjevovoda, nasipanje neasfaltiranih parkirališta i sl.
U čeličanama kao taljivo
Pokrivanje otpada na odlagalištima
Nasipni materijali (krajobrazna arhitektura)
Ispuna za drenaže
Pokrivalo krovova
Punilo (boje, polimerni materijali, adhezivna sredstva)
Mineralna vuna (izolacijski materijali)

Zadnjih trideset godina i elektropečna troska nalazi sve više svoju primjenu u raznim djelatnostima (Slika 2). Elektropečnu trosku kao alternativnu sirovinu moguće je upotrijebiti u građevinskoj industriji kao dodatak cementu, posebno u cestogradnji bilo kao nasipni sloj bilo kao zamjenu prirodnih mineralnih agregata pri proizvodnji asfaltne mješavine. Stoga se korištenje troske može promatrati puno šire od ekonomske razine, kao čimbenik očuvanja

prirodnih neobnovljivih izvora mineralnih agregata (Sofilić i sur., 2010). Rezultati ispitivanja elektropećne troske (Regelja, 2002) pokazuju da troska nije kemijski inertna i da se može koristiti kao adsorbens za uklanjanje teških metala (bakra, kobalta, kadmija, cinka i olova) iz onečišćenih voda. Rastovčan-Mioč i sur. (2006) navode da se elektropećna troska može upotrijebiti kao izvor metalnog željeza, kao taljivo u metalurgiji, zamjena za neke mineralne sirovine u proizvodnji stakla i staklene vune. Rezultati ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava elektropećne troske pokazuju široku mogućnost njene primjene, od izrade kolničkih konstrukcija u cestogradnji do uporabe kao poboljšivača tla u poljoprivredi.



**Slika 2.** Korištenje elektropećne troske u Europi (European Slag Association, 2006).

## 2.2. Poboljšivači tla

Treba razlikovati pojam prihranjivač tla (gnojivo) od poboljšivača tla jer gnojivo ima glavnu namjenu u ishrani biljke dok su poboljšivači tla prema Zakonu o gnojivima i poboljšivačima tla (Narodne Novine, 2003) tvari dodane u tlo s osnovnom namjenom poboljšavanja fizikalnih i/ili kemijskih svojstava i/ili biološke aktivnosti tla. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata kod poboljšivača tla nije usporediv s klasičnim gnojivima. Danas na tržištu postoje mnogi poboljšivači tla, no svakako su s ekološke strane najzanimljiviji oni koji se dobivaju iz otpada. Poboljšivači tla mogu biti organskog i anorganskog podrijetla. Jedan od poboljšivača tla organskog podrijetla je otpadni mulj nastao u procesu pročišćavanja otpadnih voda kućanstava ili komunalnih izvora (Vouk i sur., 2011). U mulju se organska tvar razgrađuje do anorganske



koja se ugrađuje u glinaste i humusne čestice i postaje dostupna biljkama. Organska tvar u mulju poboljšava strukturu i stabilnost tla te omogućava prozračivanje tla omogućavajući istodobno bolje zadržavanje vlage u tlu (Marinari i sur., 2000). Mulj sadrži značajne količine dušika i fosfora, ali i drugih mineralnih tvari kao što su Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, no sadržaj kalija je prenizak za potrebe rasta biljaka (Warman i Termeer, 2005).

Poboljšivači tla moraju biti sigurni i u zdravstvenom pogledu, posebice glede količine mikroorganizama (Nowak i sur., 2003). Radi očuvanja okoliša u ekološkom, zdravstvenom i estetskom pogledu, otpadne tvari se prije ispuštanja u okoliš moraju obraditi, a preostali nusprodukti obrade odložiti na neškodljiv način. Kako bi se očuvao okoliš, doneseni su odgovarajući zakonski propisi kojih se nužno pridržavati prije donošenja odluke o načinu obrade i konačnog odlaganja takvog otpada.

### 2.2.1. Troska kao anorganski poboljšivač tla i njen utjecaj na biljke

Na temelju ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava troske iz proizvodnje ugljičnih čelika zaključeno je da u elektropečnoj troski ne postoje sastojci koji bi na bilo koji način mogli imati štetan utjecaj na okoliš te je utvrđeno da ju je moguće odložiti na odlagalište neopasnog otpada. To ipak nije najbolje rješenje za zbrinjavanje ovog otpada obzirom na njegova fizikalno-kemijska svojstva koja nam nude niz boljih rješenja koja su ekološki prihvatljivija i ekonomski opravdanija (Sofilić i Brnardić, 2013).

Elektropečna troska se prema svom kemijskom sastavu i prema pozitivnom utjecaju na kvalitetu tla svrstava u anorganske poboljšivače tla. Njezin pozitivan utjecaj na rast biljaka uočen je još sredinom 50-tih godina prošlog stoljeća, a danas se zna da troska:

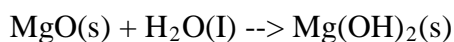
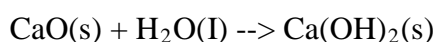
#### – Obogaćuje tlo mineralnim tvarima

Troska je dobar i jeftin izvor željeza te može osigurati dovoljne količine tog iznimno važnog i jednog od najnedostupnijih minerala za rast biljaka, osobito na vapnenastim tlima (Wang i Cai, 2006). Osim željeza, prema mnogim autorima troska povećava dostupnost i drugih makroelemenata kao što su fosfor, magnezij, kalcij i kalij. Važnost mikroelemenata i elemenata u tragovima sve više zaokuplja pažnju znanstvenika te se čimbenici koji ograničavaju rast ne svode više samo na nedostatak dušika, fosfora i kalija (NPK) nego i mnogih drugih elemenata. U troski su prisutni i mnogi mikroelementi kao što su mangan, bor, molibden, cink i bakar. Oni svojim polaganim otpuštanjem u tlo pridonose neagresivnoj i produljenoj dostupnosti tih elemenata neophodnih za rast biljaka, poboljšavaju kvalitetu

usjeva i veći prinos, a dugoročno rješavaju veliki problem uzrokovan iscrpljivanjem tla odnosno nedostatka hranjivih tvari u tlu (Karimian i sur., 2012; Abou Seeda i sur., 2002; Khan i sur., 2007).

### – Poboljšava kvalitetu kiselih tala

Kisela tla mogu uzrokovati više problema nego bilo koji drugi čimbenik u tlu. Kiselost negativno utječe na plodnost tla, na kontrolu štetnika u tlu te na sadržaj i sastav osnovnih mineralnih tvari. Gnojivo i druge organske tvari koje se dodaju u tlo samo još pospješuju i ubrzavaju probleme prisutne u kiselim tlima. Kod niskih pH vrijednosti minerali poput aluminija i mangana postaju vrlo topivi te stvaraju spojeve koji vrlo često negativno, a i toksično utječu na biljni organizam, kalcij i magnezij u takvim tlima su u deficitu, a korisnih bakterija u korijenu mahunarki ima sve manje jer ne mogu opstati u kiselim tlima. Mnoga istraživanja pokazala su da se tom problemu može doskočiti dodavanjem alkalnih tvari u tlo. U tu svrhu sve se više upotrebljava troska (Torkashvand i sur., 2005). Živo vapno (CaO) i MgO jedni su od glavnih sastojaka elektropećne troske (Tablica 1). Oni će u reakciji s vodom iz tla dati gašeno vapno (kalcij hidroksid) i magnezij hidroksid:



Njihovim otapanjem nastaju ioni  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{OH}^-$  koji uzrokuju povećanje vrijednosti pH te time pozitivno utječu na smanjenje kiselosti tla. Prema Shamim i sur. (2008) proces neutralizacije kiselog tla postiže vrhunac 180 dana nakon primjene troske na kiselo sulfatno tlo. Autori smatraju da je vremenski period otpuštanja povezan sa standardno sporootpuštajućim načinom otpuštanja iona iz troske.

### – Smanjuje klorozu

Nedostatak željeza negativno utječe na mnoge biljke, posebice one koje rastu na vapnenastim tlima jer uzrokuje manjak klorofila, tj. klorozu (žućenje) listova. Troska je potencijalno dobar izvor željeza te su se mnogi znanstvenici, iz ekonomskih ili ekoloških razloga, bavili proučavanjem iskoristivosti željeza iz troske. Dokazano je da se troska može koristiti kao dobar izvor željeza za sirak (*Sorghum sp.*) s i bez dodatka sulfatne kiseline kao čimbenika koji će tlo zakiseliti te time poboljšati primanje željeza (Anderson i Parkpian, 1984). Slična istraživanja provedena su i na kukuruzu (Wang i Cai, 2006; Torkashvand, 2011) a zaključci o

povećanju dostupnog željeza te većeg uroda bili su vrlo slični prethodno spomenutom istraživanju.

### – **Povećava mobilnost, a time i veću dostupnost fosfora**

Jedna od osnovnih značajki fosfora (P) je njegova niska dostupnost zbog spore difuzije u stanicu i vrlo slabog otapanja iz minerala (najčešće apatit). Iz toga proizlazi da P, kao jedan od najvažnijih elemenata za rast biljaka, može biti glavni ograničavajući faktor. Primjena kemijskih fosfatnih gnojiva i stajskog gnoja u poljoprivredi mogu poboljšati plodnost tla i biljnu proizvodnju, ali i uzrokovati ogromne štete u okolišu. Holističkim pristupom u razumijevanju dinamike fosfora te njegovom poboljšanom iskoristivosti bavili su se mnogi stručnjaci. Primjenom troske kao poboljšivača tla primijećeno je da je količina biljkama dostupnog fosfora rasla proporcionalno s količinom dodane troske (Torkashvand i Shahram, 2007). Kristen i Erstad još su 1996. godine otkrili da se dostupnost fosfora povećava količinom silicija (Si) u troski. Naime, Si zamjenjuje mjesto u spoju s fosforom i na taj način otpušta fosfor u otopinu u obliku dostupnom biljci. Osim silicija, i minerali kalcija, željeza i aluminijski koji se nalaze u troski, s fosforom stvaraju spojeve koji imaju veću ili manju topivost. Kolika će ona biti ovisi o veličini, odnosno, površini minerala i o pH vrijednosti tla. Na taj način se također povećava dostupnost fosfora biljci (Shen i sur., 2011; Torkashvand i Shahram, 2007).

### – **Stabilizira teške metale u tlu**

Provedena su mnoga istraživanja o utjecaju troske na stabilizaciju teških metala i metaloida u tlu kao što su As, Cr, Cu, Pb, Cd and Zn koji se primjerice oslobađaju u preradi drvne mase i onečišćavaju tlo oko takvih pogona. Posebice su opasni bakrov(II) sulfat i kromirani bakrov(II) arsenat kojima se drvo zaštićuje protiv insekata i gljivica jer izazivaju fitotoksičnost. Dok se arsen može stabilizirati adsorpcijom na okside željeza i stvaranjem amorfnog željezovog(III) arsenata, toksični krom(VI) se imobilizira redukcijom u stabilni krom(III). Stabilnost bakra u tlu ovisi prvenstveno o pH vrijednosti tla jer se njegova mobilnost povećava što je niža pH vrijednost tla. Dodatkom troske povećava se pH vrijednost tla, a time imobilizira bakar. Olovo i cink mogu se stabilizirati dodatkom fosfatnih iona (Kumpiene i sur., 2008). Svi ti stabilizatori nalaze se u sastavu troske što je čini vrlo korisnom za tla onečišćena ionima teških metala (Negim i sur., 2010).

– **Štiti od napada patogena i stresa izazvanog promjenama u okolišu**

Troska sadrži preko 10% silicija kojeg biljke, osobito jednosupnice, mogu nakupljati u stanicama. Silicij je esencijalni element za neke od njih, npr. rižu, no i mnoge druge biljne vrste kojima nije esencijalan element imaju od njega velike koristi. Nakupljanje silicija u biljci čini ju otpornijom na napad patogena i bolesti. Poznato je da većina parazitskih gljivica ulazi u biljku probijanjem kroz epidermski sloj stanica u kojima silicij može djelovati kao mehanička barijera. Silicij stvara komplekse sa sastojcima stanične stjenke epidermskih stanica riže i smanjuje njenu osjetljivost na enzime koje oslobađaju patogene gljivice. (Inanaga i sur. 1995). Trave koje u listovima imaju visoki udio silicija otpornije su na napade insekata koji se hrane lišćem (Mozt i Geiseler, 2001). Nakupljanje silicija u stanicama štiti biljke od raznih bolesti te ih čini otpornijim na biotički i abiotički stres, smanjuje toksičnost uzrokovanu aluminijem, manganom i željezom, povećava dostupnost fosfora, povećava otpornost biljaka na smrzavanje, pozitivno utječe na ekonomičniju iskoristivost vode u biljci (Savant i sur., 1999). Također, dokazano je da obrambene odgovore biljaka može potaknuti samo topivi oblik silicija dok je polimerizirani oblik inertan. Stoga silicijem uvjetovana otpornost biljaka na patogene prestaje ukoliko se prekine opskrba biljaka silicijem (unatoč činjenici da je silicij nakupljen u stanici; Fauteux i sur. 2005). Topivi oblik Si može djelovati lokalno kao signal u poticanju obrambenih odgovora u jedno- i dvosupnicama, indirektno stimulirajući aktivnost enzima peroksidaza i polifenoloksidaze te potičući stvaranje fitoaleksina, salicilne kiseline, jasmonata i etilena (Ghanmi i sur. 2004).

– **Osigurava veći prinos (riža, šećerna trska, kukuruz, suncokret)**

Svih 17 esencijalnih elemenata potrebno je za normalan rast biljaka. Nedostatak samo jednog od njih narušava rast biljke ili nekih njenih dijelova što u konačnici rezultira slabim rastom i smanjenim ili nikakvim prinosom. Svako prejako prihranjivanje biljaka može dovesti do neželjenog efekta. Troska spada u dodatke tlu iz kojih se esencijalni elementi sporo otpuštaju. Boljem prinosu posebno doprinosi veća količina dostupnog željeza, fosfora, magnezija i kalija. Wang i Cai (2006) istraživali su utjecaj troske na rast i prinos kukuruza. Njihovo istraživanje pokazalo je da je prinos kukuruza bio čak za 30 do 60% veći u odnosu na kontrolu, ovisno o količini dodane troske i kvaliteti tla u koje su posađene biljke. Za veći prinos riže i šećerne trske osobito je važna dostupnost silicija. Prema rezultatima Anderson i sur. (1987) riža i šećerna trska imale su veći urod nakon dodatka troske. Prinos riže bio je veći za 23%, a šećerne trske za 25% u usporedbi s kontrolnim biljkama.

### – Nije toksična za tlo i biljke

Mnoga istraživanja pokazala su pozitivan učinak troske na rast biljaka. Njenim dodavanjem u tlo povećava se dostupnost mineralnih tvari biljci. Taj postupak otpuštanja minerala je postupan i polagan te ne utječe na onečišćenje okoliša. No, jako je malo istraživanja koja bi pokazala utjecaj troske na tlo nakon višegodišnjeg korištenja ili njezinu potencijalnu fitotoksičnost. Kühn i sur. (2006), istraživali su dugogodišnji utjecaj troske na prinos, rast i zdravlje biljaka te kvalitetu tla. Odabrana su različita staništa (oranice, pašnjaci, šume) i posebna pažnja bila je posvećena određivanju teških metala kroma i vanadija kojih je u troski koju su koristili bilo u relativno većim količinama. Na kraju svojih istraživanja zaključili su da je na svim površinama s dodatkom troske prinos bio veći u usporedbi s površinama gdje se nije koristila troska. Vanadij i krom nisu negativno utjecali na onečišćenje tla (bili su stabilni odnosno nepokretni u tlu) niti na rast i razvoj biljaka. Ti su teški metali bili tako slabo pokretljivi da nakon 50 godina testiranja nisu prodrli u dublje slojeve (zadržali su se do 30 cm dubine tla), pa je zaključeno da ne postoji opasnost od njihovog prolaska u podzemne vode. Kako bi se utvrdio potencijalno fitotoksični učinak elektropećne troske provedeno je istraživanje na kukuruzu koji je uzgajan sa ili bez dodatka troske tijekom šest tjedana (Radić i sur. 2013). Rezultati tog istraživanja su pokazali da je troska poboljšala mineralni sastav tla, povećala biomasu biljaka i opskrabila biljke većom količinom esencijalnih elemenata Fe, Mn, Mg, K i P, a pozitivno je utjecala i na fotosintetsku učinkovitost. Istovremeno, mjerenjem pokazatelja oksidacijskog stresa nije utvrđen fitotoksični učinak troske budući da sadržaj malondialdehida (pokazatelj lipidne peroksidacije) nije bio povećan kao ni aktivnost antioksidacijskih enzima.

### 2.2.2. Klasična gnojiva i njihov utjecaj na rast biljaka i okoliš

Biljke su autotrofni organizmi za čiji je normalni rast i razvitak, osim Sunčeve energije, nužno potrebno 17 elemenata koje biljka iz tla prima preko korijena. Uzastopnim uzgojem poljoprivrednih kultura tla se iscrpljuju i osiromašuju te je sve veća potreba za dodavanjem mineralnih tvari putem gnojiva s ciljem povećanja prinosa, bržeg rasta i poboljšanja kvalitete proizvoda. Primarni elementi koji se dodaju u tlo su dušik (N), fosfor (P) i kalij (K) te se uobičajeno gnojiva takvog sastava nazivaju NPK gnojiva. NPK gnojiva vrlo često sadrže i druge elemente, sekundarne hranjive tvari (sumpor, kalcij i magnezij) koji su potrebni u manjim količinama te mikroelemente bor, klor, bakar, željezo, mangan, molibden, nikal i

cink. Mineralne tvari dodaju se u tlo u obliku sporo otpuštajućih organskih gnojiva (npr. biljni ostaci ili stajski gnoj) ili mineralnih gnojiva, odnosno kemijski prerađenih spojeva koje biljka može odmah apsorbirati. Stancheva i sur. (2004) su proučavali je utjecaj različitih oblika dušične gnojidbe (mineralna, organska i folijarna) na prinos, sadržaj nitrata i druge fiziološke pokazatelje graha sorte Xera uzgajanog u plasteniku. Svi primijenjeni oblici gnojidbe statistički su značajno povećali sadržaj klorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolne biljke u fazi cvatnje kada je i intenzitet fotosinteze bio maksimalan. Sadržaj biljnih pigmenta u kontrolnim biljkama se tijekom vremena smanjivao u odnosu na folijarno tretirane biljke zbog procesa starenja listova. Neovisno o obliku gnojidbe, sadržaj karotenoida u listu graha bio je sličan onome u kontrolnim biljkama i nije se promijenio čak ni sa starenjem listova. Folijarna prihrana je pozitivno utjecala na biomasu u različitim vegetativnim organima graha, a u listovima tih biljaka utvrđena je i povećana aktivnost nitrat reduktaze. Povećani sadržaj biljnih pigmenta kao i stimulacija aktivnost nitrat reduktaze pod utjecajem folijarne gnojidbe utvrđena je i u istraživanju Kovacheva i sur. (1999).

Utjecaj različitih doza gnojidbe pojedinim makro- i mikroelementima na intenzitet fotosinteze, provodljivost puči i koncentraciju međustaničnog CO<sub>2</sub> u listu graška i vučike uzgajanih u plasteniku istraživali su Pszczolkowska i sur. (2002). Autori navode da je smanjena količina fosfornog i kalijevog gnojiva dovela do smanjenja intenziteta fotosinteze i koncentracije međustaničnog CO<sub>2</sub> u listu graška. Kod kultivara lupine, intenzitet fotosinteze bio je znatno veći u stadiju formiranja mahuna u usporedbi sa stadijem u kojem je biljka imala 3-4 razvijena lista. U oba kultivara lupine nije zamijećena značajna razlika u koncentraciji međustaničnog CO<sub>2</sub> pod utjecajem različitih doza gnojidbe.

Iako su mišljenja podijeljena, mnogi autori navode da mineralna i organska gnojiva, osim što poboljšavaju urod također pozitivno (direktno ili indirektno) utječu na kemijska, fizikalna i biološka svojstva tla. Mikroorganizmi u tlu, kao što su bakterije, alge i gljivice uključene su u sve biokemijske procese u tlu, uključujući stvaranje humusa, razgradnju organskih i mineralnih tvari, poboljšavanje fizikalnih parametara tla kao što su struktura, poroznost i prozračivanje tla te ih se smatra pokazateljima kvalitete tla (Lin i sur., 2004). U potonjem je istraživanju utvrđeno da kombinacija organskih i mineralnih gnojiva u određenom rasponu koncentracija pozitivno utječe na mikrobiološku aktivnost tla. U više istraživanja je dokazano da se dodatkom organskog ugljika povećava plodnost tla te potiče rast i razvoj mikroba, a povoljnim omjerom u NPK gnojivu može se postići bolji prinos te ujedno stabilizirati pH vrijednost tla (Belay i sur., 2002; He i sur., 2008; Lazcano i sur., 2012).

No s druge strane, dugotrajna i široka upotreba gnojiva uzrokovala je ozbiljne probleme s onečišćenjem okoliša. Iako mogu biti vrlo sličnog kemijskog sastava, organska i mineralna gnojiva se bitno razlikuju po svom utjecaju na onečišćenje okoliša. Naime, mineralna gnojiva osim fosfata, nitrata, amonijevih iona i kalijevih soli sadrže i veliki broj teških metala kao što su Hg, Cd, As, Pb, Cu, Ni i Cu i visoke koncentracije radioizotopa kao što su  $^{238}\text{U}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{210}\text{Po}$  (Sönmez i sur., 2007).

Sve veće količine dodanih gnojiva također povećavaju sadržaj nitrata u tlu koji ispiranjem dopijeva u dublje slojeve tla. Prema Savci (2012) od ukupne količine dodanog mineralnog gnojiva u podzemne vode dopijeva 2 do 10% nitrata. Dulja upotreba mineralnih gnojiva dovodi do zakiseljavanja tla - oko 85% površina pod utjecajem mineralnih gnojiva su tla s pH vrijednosti nižom od 4. Tome posebno pridonosi velika količina dodanih iona natrija i kalija koji narušavaju strukturu tla, smanjuju aktivnost rizobija (simbiotske bakterije koje fiksiraju dušik), a narušena je i ravnoteža mineralnih tvari u tlu. Dugotrajna upotreba mineralnih gnojiva u sjeverozapadnoj Nigeriji dovela je do ozbiljnog i trajnog onečišćenja pitke vode pri čemu su nitrati u podzemnim vodama dosegli visokih 30% (Adetunji, 1994).

Primjena previsokih koncentracija mineralnih gnojiva može dovesti i do oštećenja biljnih stanica. Iz dosadašnjih istraživanja o folijarnoj gnojidbi nije moguće utvrditi optimalnu koncentraciju primjene nekog hranjiva jer je raspon upotrijebljenih koncentracija hranjiva bio vrlo širok, od 2 do 18 mM željeza (Fernandez i sur., 2008) i od 1 mM do 2 M cinka (Zhang i Brown, 1999). Unatoč povećanom riziku pojave fitotoksičnosti, oko upotrebe folijarnih gnojiva postoji zajedničko stajalište prema kojem se većim koncentracijama folijarnih otopina postiže bolja reakcija biljaka. Međutim, u nekoliko je istraživanja utvrđeno da se stopa usvajanja folijarnih gnojiva smanjenje s povećanjem njihove koncentracije izražene kao postotak količine primijenjene na površinu lista (Schlegel i sur., 2006).

Broj stanovnika na Zemlji u stalnom je porastu što prati i sve veća potreba za proizvodnjom hrane. Prema istraživanjima Sturrgul i Bundy (2004) proizvođači organski uzgojene hrane prihranjene isključivo organskim gnojivima suočavaju se s ozbiljnim problemom zadovoljenja količine potrebnog gnojiva za uzgoj poljoprivrednih kultura. Naime, stajski gnoj sadrži N:P:K u omjeru 4:3:8, a potreban omjer je 160:45:35 što organska gnojiva čini financijski puno skupljim u usporedbi s mineralnim gnojivima.

Welch (2002) je istraživao utjecaj mineralnog gnojiva na kvalitetu hrane te je zaključio da prihranjivanje isključivo mineralnim gnojivima uzrokuje manjak mikroelemenata dostupnih biljci u tlu. Osnovni problem je i u posljedično smanjenoj količini mikroelemenata pohranjenih u biljci što znatno smanjuje kvalitetu hrane te kod 40% populacije uzrokuje

mnoge zdravstvene probleme (Sanchez i Swaminathan, 2005). Prema istraživanjima Murphy i sur. (2008) organski proizvedena pšenica imala je veći postotak mikroelemenata (Cu, Mg, Zn, Mn i P) u usporedbi s konvencionalno uzgojenom pšenicom. U tlu na kojem je pšenica uzgajana uz dodatak organskih gnojiva izmjerena je i veća količina organske tvari, utvrđena je veća dostupnost P i N (nitrata i nitrita) a pH vrijednost tla bila je pogodna za rast i razvoj biljaka. Prema mišljenju autora takvom pozitivnom rezultatu doprinijela je mikoriza koja ima vrlo važnu ulogu u povećanju koncentracije mineralnih tvari (Marschner i Dell, 1994).

Na temelju navedenog može se zaključiti da postoji potreba za istraživanjima o novim izvorima prihrane u svrhu poboljšavanja kvalitete tla te utvrđivanja optimalne koncentracije pojedinih hranjivih tvari za pojedine biljne vrste što posljedično može povećati prinos, poboljšati kvalitetu proizvedene hrane te smanjiti troškove i negativan utjecaj na okoliš.

### 2.3. Mineralne tvari

Sunčeva svjetlost glavni je pokretač metabolizma u biljaka, no ne i jedini. Mineralne tvari koje biljke primaju iz okoliša (zrak, voda, tlo) nužne su za njen rast i razvitak. Mineralne tvari ulaze u biljku primarno korijenom, rjeđe kroz list, te se u vodenoj otopini provode kroz biljku provodnim elementima ksilema. Preko korijena biljka može primiti vodu s otopljenim mineralnim tvarima pasivnim i aktivnim putem što prvenstveno ovisi o metabolizmu biljke, gradijentu koncentracije i selektivnoj propusnosti membrane. Pasivnim načinom primanja, koji je i najčešći način primanja hranjivih tvari, biljka prima te tvari bez utroška energije. Pokretačka sila je u tom slučaju pad koncentracijskog gradijenta. Voda s otopljenim mineralnim tvarima tada se kreće iz područja svoje veće u područje svoje niže koncentracije (osmoza) odnosno ulazi iz otopine tla u korijenove dlačice i dalje u provodni sistem biljke. Aktivnim se prijenosom tvari prenose nasuprot njihovom koncentracijskom gradijentu pomoću proteina-nosača čija konformacijska promjena zahtijeva utrošak metaboličke energije (ATP). Osim korijenom biljka može primiti hranjive tvari i preko lista. Primarna funkcija lista vezana je za proces fotosinteze i transpiracije, no novija su istraživanja pokazala da preko lista biljka može primiti i mineralne tvari tako da folijarna prihrana dobiva sve više na značaju u modernoj poljoprivrednoj proizvodnji.

Obzirom na važnost mineralnih tvari za život biljke mineralni elementi dijele se na neophodne (esencijalne) i korisne, dok se oni elementi koji biljci nisu neophodni niti korisni ubrajaju u nekorisne ili čak štetne (toksični elementi npr. teški metali). Pod neophodnim mineralnim elementima podrazumijevaju se elementi bez kojih biljka ne bi mogla završiti svoj životni



ciklus ili je određeni element nezamjenjivi sastojak molekula nužnih za metabolizam tijekom normalnog razvitka biljke. Korisni elementi nisu nužni za održavanje života biljke, ali njihova prisutnost djeluje pozitivno na određene fiziološke procese u biljci. Neophodni elementi se načelno dijele u makroelemente i mikroelemente. Ova podjela napravljena je s obzirom na količinu tih elemenata prisutnih u biljci, dok je njihov značaj za život biljke podjednak. Isključivanje bilo kojeg neophodnog elementa iz života biljke značilo bi ugibanje te biljke jer se nedostatak neophodnog elementa ne može nadoknaditi prisutnošću ili suviškom nekog drugog elementa. Makroelementi su elementi potrebni biljci u većim količinama te se u njih ubrajaju ugljik, kisik, vodik, dušik, fosfor, kalij, sumpor, kalcij i magnezij. Elementi koji su biljkama potrebni u manjim količinama nazivaju se mikroelementima. To su željezo, mangan, bor, cink, bakar, molibden, klor, nikal i drugi. Mineralne tvari u biljnom organizmu mogu imati specifične i nespecifične uloge. Različiti elementi mogu sudjelovati u stvaranju potencijalnog osmotskog tlaka i doprinosti održavanju elektroneutralnosti stoga nespecifične uloge nisu vezane za određeni element. S druge strane, mnogi su elementi sastojci biomolekula (organski spojevi, proteini, nukleinske kiseline, fosfolipidi, hormoni, klorofili), sastojci prostetičkih skupina (primjerice Fe u hem- i FeS-proteinima, Cu u plastocijaninu), aktivatori ili kofaktori enzima (Mg aktivira neke enzime uključene u disanje i fotosintezu te sintezu DNA i RNA, Ni je kofaktor enzima uključenih u metabolizam dušika), sastavni dio enzima (Zn u različitim dehidrogenazama, Mo i Fe u nitrat-reduktazi) ili glasnici (npr. Ca) u odgovorima na okolišne i hormonske signale (Pevalek-Kozlina, 2003).

Opskrbljenost biljnih tkiva hranjivim elementima ovisi o primljenoj količini elemenata, ali i o njihovoj pokretljivosti te sposobnosti premještanja unutar biljke. Poznavanje pokretljivosti elemenata u biljci značajno je prilikom utvrđivanja nedostatka određenog elementa. Ako je biljka dobro opskrbljena svim bitnim elementima razvijat će se normalno. No, pri manjku ili nedostatku neophodnih elemenata na biljkama se, osim usporenog rasta i smanjenog prinosa, mogu uočiti i specifični simptomi poput kloroze, nekroze, sušenja listova i slično. Dušik, fosfor, kalij, magnezij, klor i mangan su dobro pokretni elementi te mogu relativno lako prelaziti u mlađe listove. Ukoliko tlu nedostaje jedan od pokretnih elemenata biljka će žrtvovati starije listove i premjestit će taj element u područje rasta (mlađi dio biljke). Tako će se nedostatak pokretnih elemenata uočiti žućenjem i/ili ugibanjem starijih listova. Sumpor, željezo, kalcij, bor, bakar, cink i molibden su slabo pokretni elementi, pa ukoliko se simptomi nedostatka (npr. kloroza) utvrde na mlađim listovima, očito je da se radi o nedostatku slabo pokretnog elementa (Pevalek-Kozlina, 2003).

### 2.3.1. Dostupnost kationa

Tlo oko biljke sastoji se od krute, tekuće i plinovite faze, a nastaje postupnim raspadom stijena pod utjecajem vjetra, oborina, promjene temperature i različitih kiselina koje izlučuje sama biljka. Veći dio mineralnih tvari dolazi u obliku teško topivih fosfata i karbonata, a manji dio je adsorptivno vezan za čestice tla ili je u otopini tla. Pozitivno nabijeni minerali u tlu vezani su uz negativno nabijene čestice tla te se u biljku mogu adsorbirati u procesu izmjene kationa. Biljka izlučene vodikove ione može zamijeniti kationima vezanim uz čestice tla. Kapacitet izmjene kationa ovisi o vrsti čestica tla. Lakša asimilacija kationa moguća je i uz stvaranje kompleksa s organskim spojevima pri čemu se kationski makro- i mikroelementi vežu na organski spoj elektrostatskim vezama.

Neki kationi, poput kalija, nakupljaju se u biljci u obliku slobodnih iona u citosolu i vakuoli (Marschner, 2012) gdje imaju glavnu ulogu u osmoregulaciji, fotosintezi, otvaranju puči i transpiraciji, aktivaciji pojedinih enzima i drugo (Cakmak, 2005; Milford i Johnston, 2007). Kalij je, poslije dušika, najzastupljenija mineralna tvar u biljci. No, od ukupne količine kalija u tlu, samo je 1 do 10% kalija je dostupno biljci u neizmijenjenom obliku (Carrow i sur., 2001). Jedno od glavnih svojstava kalija kao prihranjivača je njegov pozitivan učinak na povećanje otpornosti biljaka na abiotičke (Cakmak, 2005) i biotičke stresove (Prabhu i sur., 2007).

Željezo je četvrti element po zastupljenosti u litosferi odnosno prisutan je u iznimno velikim količinama u tlu te je esencijalan element u biljnoj mineralnoj prehrani, a biljka ga koristi u biosintezi klorofila i kao katalizator u redoks reakcijama (Abadia, 1992). Nedostatak željeza uzrokuje klorozu koja se pojavljuje prvo u mlađim listovima (nepokretni element). Klorozu može uzrokovati i nedostatak mangana koji je sa željezom u antagonističkom odnosu (Alam i sur., 2001). Iako se u tlu nalazi u velikim količinama njegova slaba topivost, osobito u alkalnim i neutralnim tlima, čini ga nedostupnim biljkama (Shao i sur., 2007). U tlu se uglavnom nalazi u obliku netopivih feri iona ( $\text{Fe}^{3+}$ ) koji su pri neutralnoj vrijednosti pH jako slabo topivi što biljci otežava primanje željeza. Biljke mogu povećati dostupnost željeza redukcijom feri iona u bolje topive fero ione ( $\text{Fe}^{2+}$ ) zakiseljavanjem medija oko korijena - izlučivanjem protona tijekom adsorpcije i asimilacije kationa, otpuštanjem organskih kiselina (jabučne, limunske) iz korijena te otpuštanjem helatora koji tvore stabilne topive komplekse sa željezom (Schmidt, 1999). Kompeticiju kod primanja željeza pokazuju bakar, kobalt, nikal, cink, kadmij, krom i mangan, a kod viših vrijednosti pH ioni  $\text{Ca}^{2+}$  i fosfati također ometaju taj

proces (Alam i sur., 2001; Yoshihara i sur., 2006). Prihrana nitratima smanjuje, a prihrana amonijevim ionima povećava dostupnost (primanje) željeza.

Ioni magnezija nemaju veliki ionski radijus, no radijus im se povećava 400 puta kada je taj ion hidratiziran (veći i od  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ ) te su mu potrebni posebni nosači za prolazak kroz membranu (Schock i sur., 2000; Li i sur., 2001). Dostupnost  $Mg^{2+}$  može biti jako smanjena prisutnošću drugih kationa, kao što su  $K^+$  i  $NH_4^+$  (Kurvits i Kirkby, 1980),  $Ca^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  (Heenan i Campbell, 1981) kao i  $H^+$ , odnosno niskom pH vrijednosti tla (Marschner, 2012).

Koncentracija iona kalcija varira ovisno o biljnoj vrsti, uvjetima rasta i biljnom organu. Za optimalni rast biljke jednosupnice trebaju puno manje  $Ca^{2+}$  nego dvosupnice (Loneragan i sur., 1968). Ta razlika uvelike je uvjetovana kapacitetom izmjene kationa koja je različita za pojedine biljke (White i Broadley, 2003). Čimbenik koji također utječe na dostupnost  $Ca^{2+}$  je koncentracija drugih kationa u vanjskoj otopini koji vrlo jednostavno i brzo zamjene mjesta s kalcijevim ionima. Tako potreba za kalcijevim ionima brzo raste porastom koncentracije iona teških metala (Wallace i sur., 1966) ili  $H^+$  iona (Marschner, 2012).

Bakar (Cu) u tlu potječe iz primarnih minerala gdje se nalazi u jednovalentnom obliku, a nakon njihovog raspadanja oksidira se do  $Cu^{2+}$ . Biljke primaju bakar kao  $Cu^{2+}$  ili u obliku helata. Proces primanja je aktivan i smatra se da postoji specifičan prenositelj. Kod primanja bakra konkurentni ioni su  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , a također je zapaženo da dobra opskrbljenost biljaka dušikom i fosforom često izaziva nedostatak bakra. Korijen ga, za razliku od izdanka, sadrži u znatno većim količinama. Bakar stvara stabilne kompleksne spojeve s organskim kiselinama i organskim tvarima te kao takav je biljkama slabo pristupačan. Zbog toga se, posebice u humusnim tlima, javlja manjak bakra (Vukadinović i Lončarić, 1998; Cheng i Allen, 2001).

Cink se prima aktivno i kod njegovog primanja antagonistički djeluju veće količine kalcija i magnezija. Suvišak cinka javlja se samo na kiselim tlima gdje mu je veća topivost i pristupačnost te njegova potencijalna toksičnost za biljku. Cink ima tendenciju većeg nakupljanja u korijenu nego u listovima gdje ometa rast korijena te time ograničava biljkama unos vode i hranjivih tvari (Castiglione i sur., 2007). Cink u kiselim tlima može uzrokovati i klorozu i ometati metabolizam kalcija. Nedostatak cinka javlja se najčešće na teškim glinastim tlima (Chaney, 1993).

U tlu mangan najvećim dijelom potječe iz  $MnO_2$ , a sadrže ga različiti oksidi stupnja oksidacije od +2 do +7. Reducirani Mn biljke lako primaju te se označava se kao aktivan oblik, dok su više oksidirani oblici inaktivni. U neutralnoj i lužnatoj sredini pristupačnost mangana je smanjena, a raspoloživost raste s povećanjem kiselosti, redukcijom (do  $Mn^{2+}$ ) i

dostupnosti elektrona (Adams, 1981). Toksičnost Mn javlja se u kiselim tlima gdje je drugi toksični element nakon aluminija. Prosječan sadržaj mangana u biljkama te tolerancija prema količini Mn ovisi o biljnoj vrsti i dijelu biljke. Na primjer, kod graha (*Phaseolus vulgaris*) toksičnost manganom nastupit će kada koncentracija u listu dosegne  $150 \text{ mg kg}^{-1}$ , kod lubenice (*Citrullus lanatus*) ta koncentracija može biti sedam puta viša, a riža (*Oryza sativa*) može podnijeti i do 35 puta višu koncentraciju mangana u listu prije nego što dođe do njegovog oštećenja (Hannam i Ohki, 1988).

### 2.3.2. Dostupnost aniona

Za razliku od kationa, negativno nabijeni anioni obično nisu vezani za čestice tla, pa se kišom lako iz njega ispiru. Dušik je element koji je nakon ugljika, kojeg biljke primaju u obliku ugljikova dioksida iz zraka, u najvećoj količini potreban biljci za rast. Veći dio dušika je u zraku prisutan u molekularnom obliku ( $\text{N}_2$ ). Taj oblik dušika mogu koristiti samo one biljke (primjerice mahunarke, joha) koje žive u simbiozi s dušik fiksirajućim bakterijama. No biljke najčešće primaju dušik u obliku  $\text{NO}_3^-$  (više od 90% u obliku nitrata, ali samo kad je proces nitrifikacije u tlu moguć ili je primijenjeno mineralno gnojivo koje sadrži nitrata), a rjeđe kao  $\text{NH}_4^+$  (amonijev ion). U većini tala amonijak se nitrifikacijom koju provode bakterije brzo pretvara u nitrat. Količina amonijevih iona u tlu može biti i veća od nitrata, no nitratni ioni dostupniji su biljci zbog puno veće mobilnosti (Owen i Jones, 2001; Miller i Cramer, 2004). Primanje oba oblika je aktivan metabolički proces nasuprot elektrokemijskom gradijentu za što se troši energija. Kod viših pH vrijednosti ( $\text{pH} > 7$ ) biljke preferiraju amonijski oblik dušika, a kod nižih ( $\text{pH} < 6$ ) nitratni (Vukadinović i Lončarić, 1998). U prisutnosti oba oblika mineralnog dušika u tlu, ioni  $\text{NH}_4^+$  kompetitivno inhibiraju primanje nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ). Kod nekih biljaka izražen je i jak antagonizam između iona  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{Cl}^-$ . Nitrat sam stimulira svoje primanje u biljnu stanicu i kada uđe u stanicu višak nitrata može se pohraniti u vakuoli. Dušik se u organske spojeve ugrađuje uvijek u reduciranom obliku tako da biljka reducira nitrat preko nitrita u amonijeve ione u dva enzima katalizirana procesa. Redukcija nitrata u nitrit je prva reakcija u procesu asimilacije dušika. Nitrat reduktaza biljaka su homodimeri sastavljeni od dvije identične podjedinice. Nitrat reduktaza (NR) je glavni protein u vegetativnim tkivima koji sadrži molibden, pa je u slučaju nedostatka molibdena aktivnost ovog enzima vrlo smanjena. Povećana količina nitrata potiče ekspresiju gena za enzim što znači da je sinteza nitrat reduktaze regulirana supstratom. Taj enzim katalizira prijenos elektrona s nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH) ili nikotinamid-adenin-

dinukleotidfosfata (NADPH) preko FAD, citokroma b577 i molibdena na  $\text{NO}_3^-$ . Nastali nitrit brzo se prenosi u plastide, a svaki plastid ima svoju asimilacijsku nitrit-reduktazu i to kloroplasti feredoksin-nitrit-reduktazu, a proplastidi NAD(P)H-nitrit reduktazu. Oba enzima kataliziraju redukciju nitrita u amonijak. Ferodoksin je davatelj elektrona u fotosintetskim tkivima, a NAD(P)H u nefotosintetskim tkivima. Zbog velikog značenja dušika za biljku, aktivnost NR se može koristiti kao biokemijski pokazatelj za predviđanje prinosa biljaka.

Amonijak i amonijevi ioni su u višim koncentracijama toksični, a u biljnim stanicama se brzo ugrađuju u organske spojeve. Biljke koje mogu primati dušik u obliku amonijevih iona mogu sačuvati određenu količinu metaboličke energije (koja bi se inače potrošila na pretvorbu nitrata u amonijak). Zbog male količine u tlu, a velikih potreba u ishrani bilja, u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji primjena dušika gnojdbom nezamjenjiva je agrotehnička mjera (jer su pristupačne količine dušika u tlu uglavnom nedovoljne za postizanje visokih prinosa). U svjetskim razmjerima više od polovice dušikovih gnojiva se primjenjuje u obliku uree. Taj spoj (koji inače nastaje u biljkama razgradnjom arginina) može, primijenjen u obliku gnojiva, ući u biljku direktno ili putem amonijaka ili nitrata nastalih razgradnjom uree djelovanjem bakterija u tlu (Kojima i sur., 2006; Witte, 2011).

Sumpor iz organskih spojeva najvećim dijelom potječe iz sulfata nastalog ispiranjem stijena. Biljka sulfate prima aktivnim procesom uz pomoć specifičnih proteinskih nosača koji ih prenose od korijena do provodnih elemenata. Biljke mogu metabolizirati i sumpor iz zraka ( $\text{SO}_2$ ) nastao atmosferskih onečišćenjem ili korištenjem fosilnih goriva. Sumpor u takvom obliku biljke primaju kroz puči (Pevalek-Kozlina, 2003).

Fosfor biljke primaju iz tla u obliku fosfata koji potječe iz stijena. Njegove zalihe su neobnovljive te se predviđa da bi se mogle iscrpiti za 50 do 100 godina (Cordell i sur., 2009). Fosfor je jedna od najmanje dostupnih mineralnih tvari u tlu što je povezano s načinom vezanja fosfata s česticama tla i drugim elementima (Vance i sur., 2003). Slaba dostupnost fosfata je posebno izražena u kiselim tlima u kojima ima puno željeznih i aluminijevih oksida koji s fosforom stvaraju spojeve nedostupne biljkama (Yan i sur., 2006; Schachtman i sur., 1998).

Biljke sadrže vrlo malo molibdena (Mo) čak ispod 1 ppm (0.1 – 0.5 ppm u suhoj tvari), a relativno veći sadržaj molibdena zabilježen je u mahunarkama i krstašicama. Biljke ga usvajaju u obliku  $\text{MoO}_4^{2-}$  i u biljkama egzistira kao anion pa mu pristupačnost raste porastom pH vrijednosti. U kiselim tlima ( $\text{pH} < 5,5$ ) dostupnost Mo se smanjuje s porastom oksida u tlu (npr. oksida željeza) koji adsorbiraju anione molibdena (Reddy i sur., 1997). Dostupnost mu,

osim već spomenutog pH i koncentracije adsorptivnih oksida, ovisi o stupnju drenaže tla i količini organske tvari u tlu. Fiziološka uloga mu je da sudjeluje u oksidaciji sulfita do sulfata, redukciji nitrata te se kod nedovoljne opskrbe molibdenom smanjuje aktivnost nitrat-reduktaze i dolazi do narušavanja kloroplastne strukture (Vukadinović i Lončarić, 1998).

### 2.4. Fitotoksičnost metala

Sve biljke mogu iz tla i vode primati metale esencijalne za njihov rast i razvoj ali i one poput As, Cd, Hg, Pb ili Se, koji nemaju nikakvu poznatu fiziološku funkciju u biljkama te su u relativno niskim koncentracijama toksični za biljku. U teške metale se ubrajaju i mnogi esencijalni elementi koji su neophodni za osnovne stanične procese, ali su u većim koncentracijama toksični. Stoga je potrebna precizna kontrola nad unutarstaničnom koncentracijom teških metala (homeostaza) jer pretjerano nakupljanje teških metala u biljkama može biti toksično za biljke, a posljedično za životinje i ljude. S kemijske točke, teške metale se definira kao skupinu metala specifične gustoće veće od  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Sanità di Toppi i Gabrielli, 1999). Po toj definiciji, aluminij nije teški metal ali se zbog svojih svojstava i učinka na žive organizme i biološke sustave ubraja u ovu skupinu (Fodor, 2002).

Fitotoksičnost teških metala očituje se poremećajem biokemijskih procesa u stanici što naposljetku rezultira oštećenjem staničnih struktura. Zajednička posljedica učinka teških metala je povećana proizvodnja reaktivnih oblika kisika (engl. ROS – reactive oxygen species) odnosno oksidacijski stres, nekontrolirane redoks-reakcije i posljedično oštećenje vitalnih biomolekula – povećana peroksidacija lipida, oksidacija proteina te oštećenje molekula DNA (razgradnja nukleotidnih baza, jednolančani lomovi, unakrsno vezanje DNA s proteinima).

Za razliku od organskih onečištača, metali se u organizmu ne mogu razgraditi pa biljke pribjegavaju nizu obrambenih mehanizama kako bi imale što bolji nadzor nad unosom, nakupljanjem i prijenosom tih opasnih elemenata te detoksikacijom isključivanjem slobodnih iona metala iz citoplazme (Martinez i sur., 2006). Posljednjih godina glavna tema mnogih istraživanja u cijelom svijetu bila je pristupačnost i mobilnost teških metala u tlu kao indikator potencijalnog rizika toksičnosti i negativnih posljedica na kvalitetu tla i vode, te potreba za ocjenom utjecaja na okoliš budući da broj kontaminiranih područja raste (Vukadinović i Lončarić, 1998).

### 2.4.1. Oksidacijski stres

Aktivirani oblici kisika nastaju u raznim dijelovima stanice i u malim količinama su stalni produkti normalnog staničnog metabolizma. Te su molekule neophodne pri nekim procesima, primjerice ROS imaju važnu ulogu u regulaciji rasta i razvoja i programiranoj staničnoj smrti te služe kao signalne molekule u poticanju obrambenih mehanizama i kao sekundarni glasnici u mnogim signalnim putovima posredovanim hormonima (Perl-Treves i Perl, 2002). Tijekom normalnog metabolizma mogu nastati i u većim količinama jer su uključeni u sva područja aerobnih procesa poput disanja i fotosintetskog transporta elektrona na komponentama fotosustava I i II (PSI i PSII), oksidacije različitih supstrata i dr. Zbog velike koncentracije kisika kloroplasti se smatraju glavnim izvorom ROS-a u biljnim stanicama. Toksičnost otrovnih kisikovih spojeva i radikala proizlazi iz njihove sposobnosti da potaknu kaskadne reakcije radikala koje vode oštećivanju proteina, DNA, membranskih lipida i konačno smrti stanice.

Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika uključujući i teške metale povećava se stvaranje kisikovih radikala i molekula oštećenih radikalima, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Njihovo se stvaranje tijekom starenja zbog učinka teških metala povećava jer se narušava ravnoteža između njihove proizvodnje i eliminacije (Fodor, 2002).

Kisik se u osnovnom stanju može smatrati radikalom zbog svoje elektronske konfiguracije - dva nesparena elektrona s paralelnim spinovima - no to je najstabilniji oblik kisika. Naime, kisik zbog paralelnog spina može primiti samo jedan po jedan elektron (monovalentna redukcija) te je i reakcija s neradikalima npr. organskim molekulama vrlo spora jer su elektroni takvih molekula sparni i antiparalelnog spina. Kisik se može aktivirati bilo apsorpcijom energije dovoljne da "obrne" spin jednom od nesparenih elektrona ili monovalentnom redukcijom (prijenos jednog elektrona). Prvim načinom aktivacije nastaje singletni kisik koji može sudjelovati u reakcijama divalentne redukcije (istovremeni prijenos dva elektrona). Stoga taj oblik pokazuje puno veću reaktivnost prema organskim molekulama od kisika. Monovalentnom redukcijom kisika u postepenim koracima nastaju superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ) i voda.  $H_2O_2$  je neradikalni štetni produkt kisika, a može ponovno krenuti u reakciju dajući najjači poznati oksidans - hidroksilni radikal u tzv. Fentonovoj reakciji gdje se  $Fe^{2+}$ -kompleks oksidira u  $Fe^{3+}$ -kompleks. Fentonova reakcija je ciklička jer se  $Fe^{3+}$ -kompleks reducira pomoću superoksidnog radikala što rezultira obnovljenim nastankom  $Fe^{2+}$ -kompleksa što omogućava još jedno reagiranje s

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ioni bakra također kataliziraju reakcije Fentonovog tipa i produciraju OH<sup>•</sup>, ali i induciraju enzim lipooksigenazu koja inicira peroksidaciju lipida.

Reaktivni otrovni kisikovi radikali i neradikalne forme nastaju u raznim staničnim odjeljcima, no njihov najznačajniji izvor su kloroplasti. Kada svjetlosni sustav kloroplasta primi previše energije koju fotosintetski lanac elektrona ne može apsorbirati, višak te energije može se potrošiti otpuštanjem topline i fluorescencijom ili prijenosom na kisik pri čemu nastaju aktivni oblici kisika. U kloroplastu može doći do "curenja" elektrona na bar tri mjesta (Perl-Treves i Perl, 2002). Tako se singletni kisik može formirati u kloroplastima kada fotonima eksitirani klorofil u tripletnom stanju reagira s kisikom. Najvažniji izvor kisikovih radikala tijekom fotosinteze su reducirani akceptori elektrona u fotosustavu I, posebice feredoksin. Reducirani feredoksin putem redukcije NADP<sup>+</sup> osigurava elektrone za fiksaciju CO<sub>2</sub> i druge reakcije u kloroplastu. No, kada Calvinov ciklus ne oksidira NADPH dovoljno brzo odnosno kada na raspolaganju nema dovoljno NADP<sup>+</sup>, elektroni se akumuliraju i dolazi do prijenosa pojedinačnog elektrona na kisik pri čemu se stvara superoksidni radikal. Superoksid u uvjetima niske pH vrijednosti može spontano dismutirati do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ili može reducirati plastocijanin ili citokrom *f*. U drugom slučaju dolazi do cikličkog toka elektrona oko PS I (Mehlerova reakcija). Smatra se da taj mehanizam ima regulatornu ulogu jer dozvoljava "kruženje" viška elektrona i sprječava difuziju radikala iz membrane. Treće mjesto gdje može doći do "gubitaka" elektrona i nastanka superoksidnog radikala je fotosustav II u kojem dolazi do cijepanja vode (pojedinačni prijenos četiri elektrona iz vode u reakcijski centar PS II pri čemu se oslobađa kisik).

Stresni uvjeti uzrokuju promjene u staničnoj membrani, a time utječu i na procese vezane uz provođenje signala i stvaranje energije. Posebno osjetljive na peroksidaciju su polinezasićene masne kiseline, koje su glavne sastavnice membranskih lipida. Aktivacijom kisika, između ostalog, nastaju hidroksidni radikal i singletni kisik, koji reagiraju s metilenskim grupama polinezasićenih masnih kiselina, formirajući tako štetne konjugirane diene, lipidne peroksi radikale i lipidne hidroksiperoksidaze. Lipidna peroksidacija odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Faza inicijacije uključuje aktivaciju kisika, a zatim slijedi dio u kojem reaktivni oblici kisika reagiraju s metilenskim grupama polinezasićenih masnih kiselina, koje su, kako je već napomenuto, najosjetljivije na peroksidaciju. Slobodni radikali djeluju na taj način da „napadaju“ vodik u metilenskim grupama, kidajući tako dvostruke veze i dovodeći do njihove preraspodjele (Blokhina i sur., 2003).

Proteini oštećeni reaktivnim oblicima kisika nakupljanju se tijekom starenja, oksidacijskog stresa te tijekom patoloških procesa. Ove biološke molekule mijenjaju se uslijed djelovanja



reaktivnih oblika kisika ili sekundarnih produkata oksidacijskog stresa. Oksidacijski izazvane promjene proteina dovode do njihove povećane osjetljivosti na proteolizu te do brojnih posljedica u cijelom fiziološkom sustavu, kao što je primjerice inhibicija djelovanja nekih enzima. Oksidacijska modifikacija enzima može imati blagi ili vrlo snažan utjecaj na stanični metabolizam, ovisno o broju modificiranih molekula. Reagiranje aktiviranih oblika kisika dovodi do kidanja peptidnih veza i unakrsnog spajanja nastalih produkata, tj. dolazi do modifikacije aminokiselinskih lanaca, što rezultira promjenama u samim funkcijama proteina, odnosno dolazi do gubitka funkcije (Shacter, 2000). Aminokiseline koje sadrže sumpor su iznimno osjetljive, a posebno cistein i metionin. Njihova modifikacija dovodi do stvaranja disulfida i metionin sulfoksida. Mnogi biološki sustavi posjeduju enzime reduktaze koje mogu oksidirane oblike cisteina i metionina vratiti u njihovo prvotno stanje. To su ujedno i jedini oksidacijski modificirani oblici proteina koji se mogu „popraviti“.

### 2.4.2. Obrambeni mehanizmi biljke

Pojava kisika u atmosferi prethodila je razvoju obrambenih mehanizama koji su održavali koncentraciju ROS na prihvatljivoj razini ili su popravljali štetu. Antioksidansi sprječavaju oksidaciju drugih tvari, a u biološkim sustavima služe za neutralizaciju slobodnih radikala. Zajednička značajka svih antioksidansa je sposobnost stabilizacije nesparenih elektrona i neutralizacija potencijalno štetnog djelovanja slobodnih radikala a da pri tome sami ne postanu nestabilni. Budući da se reaktivni oblici kisika razlikuju po mjestu nastanka u stanici, reaktivnosti s pojedinim biološkim molekulama, topivosti i mogućnosti difuzije, biljci je potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane (Arora i sur., 2002). Najvažniji zaštitni mehanizmi su antioksidacijski enzimi kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (KAT) i peroksidaze koje koriste različite supstrate kao donore elektrona (Rascio i Navari-Izzo, 2011). Biljke sadrže i neenzimske antioksidanse - molekule male molekularne mase od kojih su najbitniji askorbat, glutation, karotenoidi, fenoli i tokoferol. Za regeneraciju tih molekula potreban je čitav niz enzima koji sudjeluju u obnavljanju supstrata za obrambene reakcije – glutation reduktaza, monodehidro- i dehidroaskorbat reduktaza (ciklus Halliwell-Asada). Uz njih postoje i enzimi za uklanjanje štetnih produkata lipidne peroksidacije (Blokhina i sur., 2003).

Prva linija obrane od reaktivnih kisikovih spojeva u stanici je SOD. Taj enzim katalizira dismutaciju superoksidnih radikala na vodikov peroksid i molekularni kisik. Superoksid nastaje na svakom mjestu u stanici u kojoj je prisutan lanac elektrona. Stoga nije neobično da

su superoksid dismutaze prisutne u mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima, gliosomima, apoplastu i citosolu. Fosfolipidne membrane su nepropusne za nabijene superoksidne molekule. Stoga je važno da se superoksid dismutaze nalaze u odjeljcima u kojima superoksid nastaje kako bi ga mogle razgraditi (Miller, 2004).

Peroksidaze (oksidoreduktaze vodikovog peroksida) su široko rasprostranjeni enzimi nađeni u životinja, biljaka, gljiva i prokariotskih organizama. Biljne peroksidaze su glikoproteini sačinjeni od jednog polipeptidnog lanca. Kao prostetičku skupinu imaju feriprotoporfirin IX. Kataliziraju oksidaciju pojedinih staničnih tvari koristeći vodikov peroksid ili neki drugi organski peroksid kao primatelj elektrona. Postoji veliki broj izoenzima peroksidaze smještenih na različitim mjestima s različitim funkcijama i svojstvima u biljci te im se molekulska masa kreće u rasponu od 30 do 50 kDa (Hiraga i sur., 2001). S obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifičnost peroksidaze su podijeljene u dvije skupine (Asada, 1992). U jednoj skupini su peroksidaze koje koriste vodikov peroksid za različite oksidacijske procese u stanici i čija je karakteristika slaba supstratna specifičnost. Zbog slabe supstratne specifičnosti kao donor elektrona mogu poslužiti pirogalol, guajakol, siringaldazin i drugi fenolni spojevi. Ova skupina uključena je u procese biosinteze lignina i suberina, razgradnje auksina, zaraštavanje rana, obrane od patogena i uklanjanje toksičnih spojeva peroksida. Druga skupina su peroksidaze kojima je glavna uloga uklanjanje vodikovog peroksida i organskog peroksida, a među kojima su askorbat i glutation peroksidaza. Za redukciju toksičnog vodikovog peroksida potreban je reducirajući supstrat koji je uglavnom askorbat. Askorbat peroksidaza ima važnu ulogu u uklanjanju vodikovog peroksida i njegovi izoenzimi smješteni su u najmanje četiri jasno odvojena mjesta u stanici. To su stroma i tilakoidna membrana u kloroplastima, mikrosomi (uključujući glioksisome i peroksisome) i citosol (Shigeoka i sur., 2002). Za redukciju vodikovog peroksida potrebne su dvije molekule askorbata, a nastali produkti su dvije molekule vode i monodehidroaskorbat (MDA). Različiti stresni uvjeti kao što je temperatura, solni stres, teški metali, patogeni, onečišćenje tla ili zraka uzrokuju promjenu aktivnosti peroksidaze što je dobar pokazatelj stresa u biljke (Rout i Das, 2003).

Katalaza (KAT) je enzim koji uspješno katalizira dismutaciju toksičnog vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik. U životinjskim stanicama, peroksisomalna i citosolna katalaza je glavni enzim za detoksikaciju vodikovog peroksida. U listovima biljnih stanica katalaza je smještena u peroksisomima gdje uklanja toksični sadržaj vodikovog peroksida nastao raznim metaboličkim procesima kao što je  $\beta$ -oksidacija masnih kiselina u glioksilatnom ciklusu ili katabolizam purina, pri klijanju sjemenki, biosintezi lignina, fotorespiraciji ili procesu

starenja. Svi oblici katalaze su tetramerni enzimi s prosječnom molekulskom masom 220 000. U kukuruzu su opisana tri tipa izoenzima katalaze čiji geni se nalaze na različitim kromosomima. Sva tri oblika smještena su na različitim mjestima u stanici i svaki oblik je neovisno reguliran. Zanimljivo svojstvo katalaze je značajna osjetljivost na svjetlost ali i učinak nekih drugih okolišnih čimbenika koji djeluju inhibitorno na sintezu ovoga enzima (Hertwig i sur., 1992; Fodor, 2002).

### 2.5. Fotosinteza

#### 2.5.1. Fotosintetska učinkovitost

Fotosinteza predstavlja jedini biološki važan proces u kojem se djelovanjem Sunčevog zračenja anorganske tvari mogu pretvarati u organske spojeve. Tim se procesom svake godine u organske spojeve veže oko 60 milijardi tona CO<sub>2</sub> i nastaje više od 110 milijardi tona ugljikohidrata. Svojevrsan nusproizvod ovog procesa je kisik bez kojega na Zemlji ne bi bilo života u obliku kakvog znamo. Veliki dio energije na Zemlji rezultat je fotosintetske aktivnosti koja se zbivala u prošlosti. Ta energija danas je pohranjena u obliku fosilnih goriva te osigurava oko 90% ukupne energije potrebne za transport, industriju, kućanstva i dr.

Proces fotosinteze koji se odvija u kloroplastima biljnih stanica omogućava opskrbu biljke ugljikohidratima potrebnim za njezin rast i razvoj te je važan izvor energije. Proces fotosinteze je niz složenih reakcija koje uključuju apsorpciju svjetlosti, prijenos elektrona i enzimske reakcije kojima se proizvode ugljikohidrati. Apsorpcija svjetlosti, reakcije prijenosa elektrona od vode do NADP<sup>+</sup> te fotofosforilacija ADP-a u ATP događaju se na molekulama i proteinskim kompleksima u tilakoidnim membranama kloroplasta. Kompleksi za sakupljanje svjetlosti fotosustava II (PSII) apsorbiraju svjetlosnu energiju i prenose je do reakcijskog središta P<sub>680</sub>. Svjetlost inducira oksidaciju vode i prijenos elektrona na feofitin koji je primarni akceptor elektrona i na dva plastokinona koji se reduciraju u plastokinol. Elektroni se dalje prenose preko kompleksa citokrom *b<sub>6</sub>f*, plastocijanina i fotosustava I (PSI) na NADP<sup>+</sup> koji je konačni akceptor elektrona. Svjetlosnim reakcijama nastaje reducirani oblik nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfata (NADPH) koji je izvor visokoenergiziranih elektrona, a nastali protonski gradijent koristi ATP-sintaza za proizvodnju adenozin-trifosfata (ATP). Druga faza fotosintetskih reakcija odvija se u stromi kloroplasta (Calvinov ciklus), a obuhvaća fiksaciju CO<sub>2</sub> topljivim enzimima npr. najvažniji je ribuloza-1,5-difosfat-karboksilaza-

oksidaze (RuBisCO) i prevođenje u ugljikohidrate uz korištenje NADPH i ATP nastalih u primarnim reakcijama (Pevalek- Kozlina, 2003).

### 2.5.2. Fluorescencija klorofila

U tilakoidnim membranama kloroplasta molekule pigmenta organizirane su u dva fotosustava PSI i PSII. Svaki od njih sastoji se od antenskog kompleksa, reakcijskog središta i primarnog akceptora elektrona. Antenski kompleks čini nekoliko stotina antenskih molekula pigmenta (klorofila, karotenoida) koji služe za hvatanje i provođenje svjetlosne energije do molekule klorofila *a* u reakcijskom središtu. U reakcijskom središtu energija pokreće reakciju oksidacije klorofila, a on predaje svoj ekscitirani elektron primarnom akceptoru elektrona. Taj proces predstavlja pretvorbu svjetlosne energije u kemijsku energiju. U optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze, međutim dio se energije gubi u obliku topline i svjetlosti, pri čemu nastaje fenomen koji nazivamo fluorescencija klorofila. Tri spomenuta načina oslobađanja energije prilikom deekscitacije klorofila su u međusobnoj kompeticiji što znači da povećanje učinkovitosti jednog od njih dovodi do smanjenja druga dva (Maxwell i Johnson, 2000). Svjetlost oslobođena fluorescencijom je veće valne duljine od apsorbirane svjetlosti, što znači da emisijski spektar klorofila ima maksimum u crvenom području, pri nešto većoj valnoj duljini od maksimuma apsorpcijskog spektra klorofila u crvenom području. Iako prinos fluorescencije iznosi samo 3 do 5% apsorbirane energije (Walker, 1987), mjerenjem fluorescencije u uvjetima *in vivo* dolazi do velikih promjena u intenzitetu fluorescencije. Te su promjene prvi uočili Kautsky i njegovi suradnici 1960. godine (Maxwell i Johnson, 2000). U literaturi su te promjene različito nazivali - „Kautsky effect“, „fluorescence induction“, „fluorescence transient“, „OJIP curve“, „fluorescence decay“ (Govindjee, 2004; Papageorgiou i sur., 2007). Nakon osvjtljavanja fotosintetskog materijala prilagođenog uvjetima tame (najmanje 10 minuta; Stribet i Govindjee, 2011), intenzitet fluorescencije naglo raste i unutar 1 sekunde doseže svoj maksimum. Porast intenziteta fluorescencije posljedica je progresivnog zatvaranja reakcijskih središta fotosustava II. Naime, kada primarni akceptor elektrona plastokinon (QA) primi elektron, mora ga predati slijedećem prenosioču (QB) kako bi primio sljedeći elektron. U tom periodu se za reakcijska središta kaže da su „zatvorena“. Postojanje određenog udjela zatvorenih reakcijskih središta, koje je prisutno u svakom trenutku, za posljedicu ima smanjenje učinkovitosti fotokemijske pretvorbe energije i odgovarajuće povećanje prinosa fluorescencije (Maxwell i Johnson, 2000).

Mjerenje fluorescencije klorofila *a* je relativno jednostavno budući da je spektar fluorescencije različit od spektra apsorbirane svjetlosti. Naime, emitirani foton svjetlosti ima veću valnu duljinu, a time manju energiju nego svjetlost koja ju je izazvala. Klorofil *a* uvijek fluorescira crveno jer se foton, neovisno o valnoj duljini apsorbiranih fotona, emitira pri prijelazu iz prvog pobuđenoga stanja u osnovno stanje pri čemu se višak energije oslobađa u obliku topline i fluorescentne svjetlosti (Pevalek-Kozlina, 2003). Najveći udio fluorescencije klorofila *a* pri sobnoj temperaturi potječe od kompleksa PSII (oko 90%). Kompleksi koji su dio PSI vrlo slabo fluoresciraju, no znanstvenici još nisu u potpunosti objasnili zašto je tome tako (Govindjee, 2004). Budući da promjene u fluorescenciji ovise uglavnom o PSII, interpretacija eksperimentalnih podataka je time olakšana (Schreiber i sur., 1994). Kada je fotosintetski materijal prilagođen na uvjete tame, smatra se da su sva reakcijska središta otvorena, tj. QA je potpuno oksidiran i prinos fluorescencije je u tome trenutku minimalan ( $F_0$ ). Ukoliko se na takav fotosintetski materijal primijeni saturacijska svjetlost, sva reakcijska središta se zatvaraju i prinos fluorescencije je maksimalan ( $F_m$ ). Razlika između maksimalnog ( $F_m$ ) i minimalnog ( $F_0$ ) intenziteta fluorescencije naziva se varijabilna fluorescencija ( $F_v$ ). Iz podataka o maksimalnom i minimalnom intenzitetu fluorescencije može se izračunati maksimalni kvantni prinos PSII kao omjer varijabilne fluorescencije i maksimalnog intenziteta fluorescencije ( $F_v/F_m$ ). Maksimalni kvantni prinos PSII se koristi kao indikator ukupne učinkovitosti fotosinteze i u zdravom fotosintetskom materijalu njegova vrijednost iznosi oko 0,83 (Bjorkman i Demmig, 1987). Iako je povezanost fluorescencije klorofila *a* sa stopom fotosinteze poznata još od otkrića Kautsky efekta tridesetih godina prošloga stoljeća, razvojem dovoljno preciznih rutinskih fluorometara osamdesetih godina prošloga stoljeća počinje era istraživanja fotosintetske učinkovitosti bazirana na fluorescenciji klorofila *a* (Baker i Oxborough, 2004). Mjerenje fluorescencije klorofila je vrlo osjetljiv, neinvazivan i pouzdan način mjerenja učinkovitosti PSII koji se zasniva na dva različita principa. Jedan tip fluorimetara mjeri fluorescenciju moduliranom svjetlošću tzv. *engl.* Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) 16 Fluorometry (Schreiber, 2004) dok drugi mjeri fluorescenciju klorofila *a* induciranu kontinuiranom svjetlošću u periodu od 1s tzv. „brza“ fluorescencija kojom se bilježi polifazni rast fluorescencije (Strasser i sur., 2000). Iako obje tehnike imaju svoje prednosti i nedostatke, njihovi rezultati ne bi smjeli biti kontradiktorni. Te će metode biti detaljnije opisane u poglavlju Materijali i metode.

### 2.5.3. Metoda izmjene plinova

Fluorescencija klorofila vrlo je jednostavna i učinkovita tehnika, no mnogi autori je kombiniraju s drugim tehnikama, posebno metodom izmjene plinova kako bi interpretacija rezultata bila što bolja te doprinijela kompletnijoj slici odnosa biljke i njenog okoliša (Maxwell i Johnson, 2000; Long i sur., 1996). Unazad 15 godina 95% laboratorijskih mjerenja premješteno je iz vrlo kompliciranih i zahtjevnih uvjeta na nove aparate koji su puno jednostavniji te imaju mogućnosti trenutnih mjerenja neovisno o mjestu rasta biljke (npr. u polju). Metodom izmjene plinova mjeri se difuzija CO<sub>2</sub> preko lista, transpiracija, provodljivost puči (stomatalna provodljivost) u uvjetima *in vivo* i koncentracija međustaničnog CO<sub>2</sub>. Za mjerenje je često dovoljna vrlo mala površina lista (2 cm<sup>2</sup>) a mjerenja je moguće provesti na velikom broju listova u vrlo kratkom vremenu (Long i Hällgren, 1993).

### 2.5.4. Primjena fluorescencije klorofila *a* i metode izmjene plinova u istraživanjima

Osim u fundamentalnim istraživanjima fotosinteze i fotosintetskog aparata (Lepeduš i sur., 2009; Lepeduš i sur., 2010), mjerenje izmjene plinova i fluorescencije najveću primjenu ima u istraživanja abiotičkog i biotičkog stresa jer se fotosintetski organizmi prilagođavaju promjenama u okolišu mijenjajući fotosintetsku aktivnost, a time i fluorescenciju klorofila te kapacitet fotosintetskog aparata (Strasser i sur. 2000). Mnoga istraživanja temeljena na mjerenju i analizi ovim metodama dokazala su utjecaj stresa na biljke uzrokovanog sušom (Bertamini i sur., 2007), poplavom (Smethurst i sur., 2005), visokim temperaturama (Stefanov i sur., 2011), niskim temperaturama (Tambussi i sur., 2004), povećanim ili smanjenim intenzitetom svjetlosti (Griffin i sur., 2004), UV zračenjem (Ranjbarfordoei i sur., 2011), solnim stresom (Ranjbarfordoei i sur., 2006), nedostatkom hranjivih tvari (Huang i sur., 2004; Lin i sur., 2009), djelovanjem teških metala (Appenroth i sur., 2001), djelovanjem ozona (Flowers i sur., 2007), djelovanjem različitih kemijskih tvari (Kummerová i Váňová, 2007), aeropolutanata (Lepeduš i sur., 2005) i drugim abiotskim čimbenicima.

Fluorescencija klorofila *a* koristi se i u istraživanjima biotičkog stresa (Christen i sur., 2007), istraživanjima razvojnih stadija biljaka (Lepeduš i sur., 2011), starenja (Lepeduš i sur., 2010), kontroli kvalitete voća i povrća (Hagen i sur., 2006).

#### 3.1. Biljni materijal

Kao modelna biljka korišten je grah (*Phaseolus vulgaris* L.) koji je podrijetlom s američkog kontinenta odakle je prenesen u Europu. U početku se za jelo koristilo samo zrelo zrno, a tek kasnije mlade mahune i mlado zrno. Grah pripada porodici *Fabaceae*, rodu *Phaseolus*. Jednogodišnja je zeljasta biljka, čija stabljika naraste 30 do 40 cm kod niskih sorti koje se granaju, odnosno do 3 metra kod visokih sorti. Plod graha je mahuna različitog oblika, boje i veličine. Najčešće uzgajane sorte graha mahunara imaju okrugle ili plosnate mahune, dužine 10 do 20 cm, zelene ili žute boje. Grah je termofilna kultura te je minimalna temperatura klijanja između 8 i 10 °C. No, optimalna temperatura tijekom cvatnje i početka formiranja mahuna iznosi oko 23 °C, dok temperature ispod 15 °C te iznad 32 °C dovode do otpadanja cvjetova i formiranih mahuna te smanjivanja prinosa (Knezović i sur., 2008). Niski grah ima kratku vegetaciju (60 do 80 dana), dobro uspijeva na svim vrstama tala te se može uzgajati od mediteranskog do kontinentalnog i planinskog područja. Grah služi i kao vrijedan predusjev za većinu povrtnih kultura zbog značajne količine dušika koja ostaje u tlu od simbiotskih bakterija iz roda *Rhizobium*. Grah je u prehrani ljudi važan izvor hranjivih tvari, osobito proteina. Bogat je kalijem i fosforom te kompleksom B vitamina. Mlada mahuna graha odlikuje se sadržajem proteina koji je po aminokiselinskom sastavu sličan proteinima životinjskog podrijetla (Coelho i Sgarbieri, 1995). Termičkom obradom se uništava štetni sastojak glukozid fazein. Može se konzervirati sterilizacijom i zamrzavanjem.

U ovom istraživanju je korištena sorta niskog graha zrnaša "Lingua di fuoco". Na slici 3. prikazan je uzgoj graha u stakleniku i na pokusnom polju Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.



**Slika 3.** Lijevo - niski grah zrnaš (*Phaseolus vulgaris* L.) uzgajan u stakleniku (kvarcni pijesak) i desno - grah uzgajan na pokusnom polju (vrtna zemlja) Botaničkog vrta (Foto: Dubravka Sandev).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Sastav supstrata za sadenje i uzgoj biljaka

Pokus je postavljen u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom tri vegetacijske sezone (2010., 2011. i 2012. g. ) u stakleniku (ožujak-svibanj) ili dvije vegetacijske sezone (2011. i 2012. g.) na pokusnim poljima (svibanj-srpanj). Za pokus u stakleniku kao supstrat je korišten silicijski pijesak, a na polju je upotrijebljena vrtna zemlja (Botanički vrt). Sjeme niskog graha zrnaša posijano je u kontrolni supstrat (K; ne sadrži ni trosku ni tekuće gnojivo s dodatkom Fe), u supstrate s dodatkom troske (10g - T1, 20g - T2, ili 40g - T3 troske), u supstrat s dodatkom tekućeg gnojiva i Fe (NPK) te u supstrat s kombinacijom troske u količini od 20 g i tekućeg gnojiva i Fe (NPKT) (vegetacijska sezona 2012.g). Kada su mlade biljčice razvile prve prave listove (nakon dva tjedna) dijelu kontrolnih biljaka i biljaka iskljanih u prisutnosti troske dodan je izvor dušika u obliku  $\text{KNO}_3$  (50 mg N/kg supstrata). Dijelu kontrolnih biljaka dodan je izvor dušika (7,5 mL/ L) u obliku tekućeg gnojiva NPK (Plantella, N:P:K=6:3:6) te izvor Fe (10 mL/ L) u tekućem obliku (Plantella, 2% Fe vodotopivo, 1% Fe vodotopivo u helatnom obliku, 1% vodotopivo iz  $\text{FeSO}_4$ ). Te su biljke nadalje u pokusu služile kao pozitivna kontrola. Što se tiče pokusnog polja, vegetacijske sezone 2011.g. biljke graha bile su uzgajane s dodatkom 10 g troske (T1), a vegetacijske sezone 2012.g. primijenjeni su isti tretmani kao i u stakleniku te godine, s izuzetkom najveće količine troske: K, NPK, NPKT, T1 i T2. Biljke su rasle u uvjetima dugog dana pri čemu je prosječna dnevna temperatura iznosila  $25 \pm 2$  °C, a noćna  $14 \pm 2$  °C. Biljke u stakleniku redovito su bile zalijevane destiliranom vodom (do punog zasićenja supstrata) te su bile izložene količini svjetlosti od prosječno  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  prve vegetacijske sezone te prosječno  $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  druge i treće vegetacijske sezone. Biljke na pokusnim poljima su zalijevane kišnicom te su bile izložene količini svjetlosti od prosječno  $1200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  neovisno o vegetacijskoj sezoni. Biljke su uzimane za analitička istraživanja nakon osam tjedana rasta.

### 3.2.2. Parametri rasta

Za procjenu rasta i prinosa, mjerena je masa suhe tvari (g), visina biljaka (cm), ukupan broj mahuna te masa zrna. Masa suhe tvari određena je na način da su listovi mase 1 g posušeni na 80 °C do konstantne mase (24h) te izvagani. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija te izraženi u odnosu na kontrolu.



#### 3.2.3. Određivanje parametara u supstratu

##### 3.2.3.1. Određivanje pH reakcije tla u vodi i otopini KCl

Ova se metoda provodi radi utvrđivanja pH reakcije tla, koja je pokazatelj niza agrokemijskih svojstava tla važnih za ishranu bilja, a izražava se u pH jedinicama. Reakcija tla određuje se pH-metrom pomoću kombinirane elektrode. Određuju se aktualni aciditet tla suspendiran u destiliranoj vodi i supstitucijski aciditet tla suspendiran u otopini KCl-a. Vrijednost supstitucijskog aciditeta uvijek je niža od vrijednosti aktualnog aciditeta. Određivanje pH reakcije tla u navedenim otopinama izvodi se na način da se na tehničkoj vagi odvaži dva puta po 10 g osušenog tla koje se prenosi u čašu od 50 mL. Uzorci se zatim preliju s 25 mL prokuhane destilirane vode (prokuhavanje je bitno zbog odstranjivanja otopljenog CO<sub>2</sub> koji snižava vrijednost pH), odnosno 0,1 M KCl te se povremeno promiješaju staklenim štapićem. Nakon 30 minuta mjeri se pH vrijednost u suspenziji tla (omjer mase tla i volumena tekućine mora biti 1:2,5) pH-metrom koji je propisno kalibriran standardnim puferskim otopinama poznate pH vrijednosti (Bogdanović i sur., 1966).

##### 3.2.3.2. Određivanje električnog konduktiviteta u tlu

Za određivanje električnog konduktiviteta (EC) uzimani su uzorci supstrata s dodacima troske i mineralnih hranjivih tvari iz staklenika i s pokusnih ploha u Botaničkom vrtu PMF-a. Uzorci su osušeni i samljeveni u fini prah. Električni konduktivitet je mjereno u ekstraktu dobivenom miješanjem 20 g uzorka supstrata sa 100 mL destilirane vode (1:5 w/v uzorak:voda, Tiquia i Tam, 2000). Nakon 1 sata miješanja na rotacijskoj mućkalici EC je izmjereno pomoću instrumenta Conductivity meter (model PCD-431) uranjanjem elektrode u otopinu. Nakon stabilizacije rezultata očitano je konduktivitet te je elektroda isprana destiliranom vodom. Postupak je ponavljan sa svim uzorcima.

##### 3.2.3.3. Određivanje pristupačnog fosfora u tlu Trougovom ekstrakcijom

Trougova ekstrakcija je najčešći postupak ispitivanja biljkama pristupačnog fosfora u tlu. Trougov ekstraktant dobije se miješanjem 40 mL 0,05 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> s 2 L dH<sub>2</sub>O uz dodatak 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Količina od 1,25 g suhog tla prenosi se u plastične boce za izmućkavanje te se svaki uzorak prelije 250 mL Trougovog ekstraktanta i miješa na rotacijskoj mućkalici na sobnoj temperaturi 30 minuta. Ekstrakt tla se profiltrira te se od dobivenog filtrata otpipetira

10 mL u odmjernu tikvicu od 50 mL, a zatim se doda 2 mL amonij-molibdat reagensa. Reagens se priprema otapanjem 25 g amonijevog molibdata ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ ) u 200 mL  $\text{dH}_2\text{O}$  te se otopini nakon filtriranja oprezno doda 280 mL konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (otopljene u 400 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Tako pripremljen reagens nadopuni se destiliranom vodom do volumena od 1 L te ga se do korištenja čuva u mraku. Otopina radnog standarda priprema se otapanjem 0,04 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u 100 mL destilirane vode. Serija radnih standarda se priprema na način da se odmjeri određeni volumen pripremljenog radnog standarda (0, 1, 2, 5, 10 i 15 mL) te se odmjerne tikvice (50 mL) nadopune vodom do oznake. Po 10 ml pripremljenih otopina se odmjeri u novu tikvicu u koju se doda 2 mL stanoklorida i 2 mL amonij molibdata. Stanoklorid se priprema netom prije početka pokusa otapanjem 0,5 g  $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  u 250 ml 2%-tne otopine  $\text{HCl}$ . Tikvice sa stanokloridom i amonijevim molibdatom se ostave stajati 30 minuta. Koncentracija fosfora u uzorcima i standardima mjerena je spektrofotometrijski na 700 nm (Allen i sur., 1974). Rezultat je izražen u mg P/100 g tla.

#### 3.2.3.4. Određivanje dušika po Kjeldahlu

U prisutnosti sulfatne kiseline, salicilsumporne kiseline,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  i  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , amino dušik većine organskih spojeva se prevodi u amonijev ion tijekom kuhanja na 250 °C. Nakon dodatka natrijeve lužine, nastaje amonijak koji se destilacijom uvodi u bornu kiselinu s dodanim miješanim indikatorima nakon čega se destilat u bornoj kiselini titrira s 0,1 N  $\text{HCl}$ -om. U tikvice za digestiju dodano je po 2 g zrakosuhe zemlje natopljene s 8 ml salicilsumporne kiseline, a nakon 20 minuta dodano je 2 g kristalnog  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 5 ml koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 0,2 g selenske reakcijske smjese. Nakon opreznog kratkog zagrijavanja dodano je 1,5 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  te je uz postepeno povećanje temperature zagrijavanje nastavljeno kroz 1 do 2 sata. Digestija se provodila tako dugo dok sadržaj tikvice nije poprimio jednoličnu svijetlosivu boju. Tikvice su ohlađene na zraku i njihov sadržaj je prenesen u odmjerne tikvice od 50 ml uz dodatak par kapi indikatora metilrot, a potom je uzorak podvrgnut procesu destilacije. Uređaj za destilaciju bio je podešen tako da je vrijeme trajanja destilacije bilo sedam minuta, a zadani volumen dodane lužine 40 do 50 mL. U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL otpipetirano je 5 mL zasićene borne kiseline s dodanim indikatorima, pa su odmjerna tikvica s digestiranim uzorkom i Erlenmeyerova tikvica s otopinom borne kiseline montirane na uređaj za destilaciju te je pokrenuta destilacija. Prilikom destilacije ljubičasta boja indikatora u bornoj kiselini prelazi u zelenu zbog prelaska amonijaka iz uzorka u otopinu borne kiseline. Nakon postupka destilacije sadržaj tikvice s

bornom kiselinom i destilatom je titriran s 0,1 N HCl-om do promjene boje iz zelene u ljubičastu boju koja se više nije mijenjala (Allen i sur., 1974). Postotak dušika je izračunata pomoću jednadžbe:

$$N(\%) = (a \times 1,4 \times 100 / b \times 1000) \times F$$

a = volumen utrošenog 0,1 N HCl za titraciju uzorka (mL)

b = masa uzorka zemlje (g)

F = faktor konverzije, dobiva se titriranjem 0,1 N HCl na  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (čiju masu izmjerimo na četiri decimalne i otopimo u 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  uz dodatak 1-2 kapi metiloranža) do promjene boje

#### 3.2.4. Određivanje sadržaja metala, dušika i fosfora u supstratu i listovima

Sadržaj pojedinih metala u supstratu i listovima biljaka određen je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Plamena (*engl.* FAAS - flame atomic absorption spectrometry) i grafitna (*engl.* GFAAS – graphite furnace atomic absorption spectrometry) tehnika temelje se na postizanju temperatura dovoljno visokih da kemijske spojeve razore do atoma koji zatim isparavaju, a mjerenje se vrši u nastalom "oblaku" atoma. Obje su tehnike visoko specifične jer se spektralne linije atoma nikada ne preklapaju, a suvremeni monokromatori mogu lako razdvojiti čak i vrlo bliske spektralne linije. Sadržaj ukupnog dušika i fosfora u supstratu i listovima određen je spektrofotometrijski.

##### 3.2.4.1. Priprema uzoraka za određivanje sadržaja metala u supstratu

Uzorci posušeni do konstantne mase (80 °C, 48h) su razarani u smjesi koncentrirane nitratne i koncentrirane kloridne kiseline (omjer 1:3) u mikrovalnom uređaju za pripremu uzoraka (Anton Paar Multiwave 3000) na 200 °C te potom razrijeđeni do određenog volumena. Sadržaj natrija, magnezija, željeza, mangana i kalija određen je plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Sadržaj svih kationa izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri replike  $\pm$  standardna devijacija te izraženi u odnosu na kontrolu.

##### 3.2.4.2. Određivanje sadržaja natrija, kalija, magnezija, mangana i željeza u listovima

**Mangan:** Određivanje se vrši metodom FAAS na instrumentu Perkin Elmer Analyst 800 uz korekciju deuterijevom lampom.

Instrumentalni uvjeti:

lampa: HCL valna duljina 279,5 nm

slit: 0,2 nm

plamen: zrak : acetilen (17 L/min : 2 L/min)

kalibracijski standardi: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL I 2,5 µg/mL

program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab

**Željezo:** Određivanje se vrši metodom FAAS na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 800 uz korekciju deuterijevom lampom.

Instrumentalni uvjeti:

lampa: HCL valna duljina 248,3 nm

slit: 0,2 nm

plamen: zrak : acetilen (17 L/min: 2 L/min)

kalibracijski standardi: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL I 2,5 µg/mL

program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab

**Natrij, kalij:** Određivanje se vrši metodom FAAS na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 800

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 589 nm

slit: 0,2 nm

plamen: zrak : acetilen (17 L/min: 2 L/min)

kalibracijski standardi: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL

program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab

**Magnezij:** Određivanje se vrši metodom FAAS na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 800

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 285,2 nm

slit: 0,2 nm

plamen: zrak : acetilen (16 L/min: 7,8 L/min)

kalibracijski standardi: 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL

program za kontrolu instrumenta i obradu podataka: Perkin Elmer AA Winlab

### **3.2.4.3. Priprema uzoraka za određivanje sadržaja dušika i fosfora u supstratu i listovima**

Uzorci posušeni do konstantne mase (80 °C, 48h) su razarani kuhanjem u smjesi koncentrirane sumporne i koncentrirane kloridne kiseline uz dodatak peroksida te su potom razrijeđeni do

određenog volumena. Sadržaj dušika i fosfora određuje se spektrofotometrijski. Sadržaj dušika i fosfora izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari.

#### 3.2.4.4. Određivanje sadržaja dušika i fosfora

**Dušik:** Određivanje se vrši salicilatnom metodom na UV/Vis spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina: 655 nm

Reagensi:

Salicilat-citratna otopina i Na-dikloroisocijanurat

Mjerenje apsorbancije nakon 2 sata od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$  i 1  $\mu\text{g/mL}$

**Fosfor:** Određivanje se vrši metodom s kiselim molibdatom na UV/Vis spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina: 880 nm

Reagensi:

Askorbinska kiselina i kiseli molibdat

Mjerenje apsorbancije nakon 15 minuta od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01  $\mu\text{g/mL}$ , 0,05  $\mu\text{g/mL}$ , 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$  i 1  $\mu\text{g/mL}$

#### 3.2.5. Mjerenje intenziteta fotosinteze metodom izmjene plinova

Izmjere fotosinteze obavljene su u tri vegetacijske sezone na po tri biljke (na svakoj biljci tri uzastopna mjerenja na srednjem listu) po tretmanu pomoću LC-pro prenosivog sustava s komorom za široke listove i izvorom svjetlosti (program Leaf Chamber Analysis System, Li-Cor, Lincoln, England). Sustav izmjera temelji se na razlikama koncentracija  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  tijekom zraka koji prolazi kroz komoru. Sustav kontrolira svjetlost, temperaturu, koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CO}_2$  te protok plinova iz čega se izračunava asimilaciju. Automatska kontrola parametara fotosinteze u neposrednom okruženju gornje i donje površine lista omogućena je variranjem parametara mikroklimatskih uvjeta, odnosno sadržaja  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , jačine svjetlosti i temperature unutar komore lista. Fotosintetska aktivnost lista prati se na osnovu utroška  $\text{CO}_2$  tijekom samog procesa pomoću minijaturnog infracrvenog plinskog detektora smještenog unutar glave komore.

Intenzitet fotosinteze mjereno je tijekom dana od 10:00 do 12:00 sati. Mjerenja su izvedena na listu površine 6,25 cm<sup>2</sup> što odgovara veličini širokolisne lisne komore. Mjerenje intenziteta fotosinteze izvršeno je pri ambijentalnim uvjetima osvjetljenja i temperature te pri konstantnim vrijednostima koncentracije CO<sub>2</sub> (380 μmol mol<sup>-1</sup> zraka).

#### 3.2.6. Mjerenje fluorescencije klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa

Fluorescencija klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa mjerena je pomoću „Qubit“ sustava za mjerenje fluorescencije. Metoda saturacijskog pulsa (Schreiber i sur., 1994) temelji se na primjeni svjetlosti malog intenziteta na fotosintetski materijal prilagođen uvjetima tame. U tom su trenutku svi plastokinoni potpuno oksidirani a reakcijska središta potpuno otvorena, pa elektroni sudjeluju u fotokemijskim reakcijama. Ovo se događa u uvjetima slabog osvjetljenja i tada se mjeri minimalni prinos fluorescencije (F<sub>0</sub>). Primjenom saturacijske svjetlosti dolazi do potpune redukcije vezanog plastokinona (Q<sub>A</sub>), a fluorimetar tada bilježi maksimalni intenzitet fluorescencije (F<sub>m</sub>). Saturacijski puls trenutno zatvara sva reakcijska središta pa u tome trenutku nema fotokemijske pretvorbe energije (*engl.* photochemical quenching) nego je postojeći „quenching“ nefotokemijski tj. dolazi do disipacije energije. Primjenom saturacijskog pulsa potpuna redukcija Q<sub>A</sub> biti će uzrokovana neovisno o tome je li fotosintetski materijal prilagođen uvjetima tame. Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom (F<sub>v</sub>). Iz tih podataka se računa optimalni prinos fotosustava II, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>. Ovaj omjer predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II, a za većinu biljnih vrsta ima vrijednost oko 0,83. Uslijed osvjetljenja, a primjenom impulsa saturacijske svjetlosti mijenja se vrijednost maksimalne fluorescencije (F'<sub>m</sub>). Razlika F<sub>m</sub> – F'<sub>m</sub> predstavlja nefotokemijsko, a razlika F'<sub>m</sub> – F fotokemijsko gašenje fluorescencije. F je prinos fluorescencije uzorka prilagođen određenoj količini svjetlosti. Iz ovih podataka računa se efektivni prinos fotosustava II (ΔF/F'<sub>m</sub>), te se može izračunati vrijednost rel. ETR ("Relative Electron Transport Rate") koja opisuje funkcioniranje transportnog lanca elektrona i vrijednost NPQ koja opisuje nefotokemijsko gašenje fluorescencije:

$$(F'_m - F) / F'_m = \Delta F / F'_m$$

$$ETR = \Delta F / F'_m \cdot PFD \cdot 0,5$$

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

PFD predstavlja gustoću fotosintetski aktivnog toka fotona ("Photosynthetically active Photon Flux Density"), a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o jednakoj eksitaciji

fotosustava II i I. Prije samog mjerenja, biljke su držane 30 minuta u potpunoj tami. List prilagođen uvjetima tame korišten je za mjerenje vrijednosti  $F_o$  i  $F_m$ . Nakon toga, list je osvjetljen količinom svjetlosti od 100 (biljke iz staklenika) ili 200 (biljke s polja)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tijekom 30 minuta, odnosno dok se vrijednosti  $F$  i  $F_m$  nisu ustalile. Preposljednje mjerenje za svaku količinu aplicirane svjetlosti uzeto je kao relevantno za izračun vrijednosti  $\Delta F/F_m$ , PQ, NPQ i relativne brzine prijenosa elektrona.

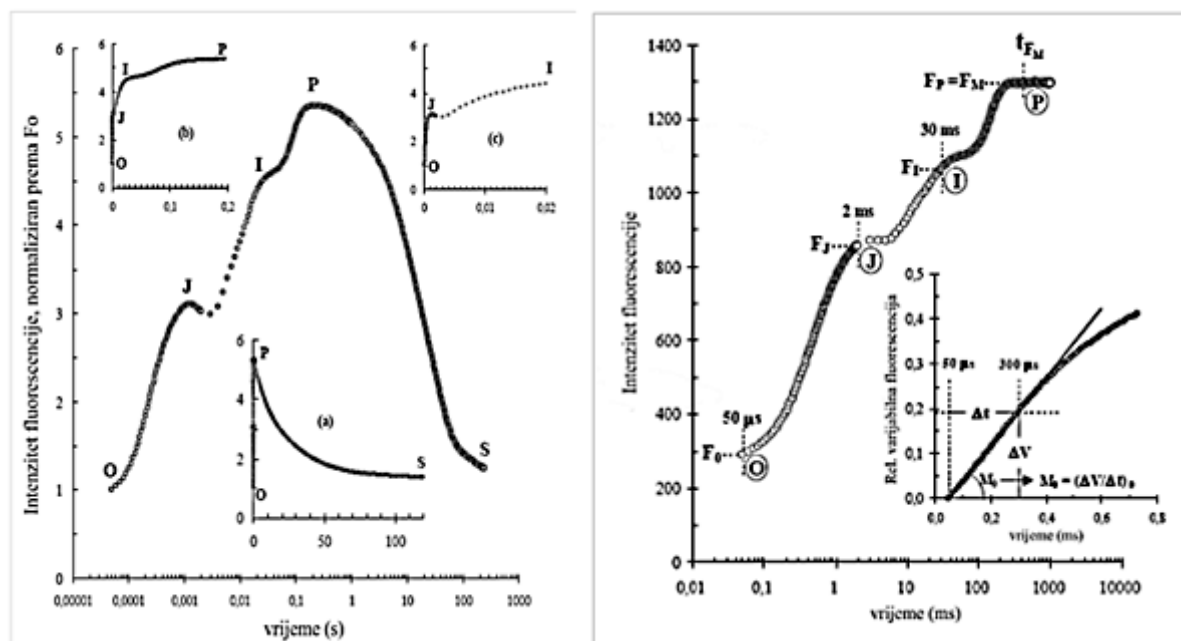
#### 3.2.7. Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i OJIP test

Mjerenje polifaznog rasta fluorescencije se temelji na indukciji fluorescencije kratkom crvenom svjetlošću velikog intenziteta, a mjere se promjene intenziteta fluorescencije tijekom 1 s (Strasser i sur., 2004). Porast fluorescencije od  $F_o$  do  $F_m$  sastoji od više stupnjeva koji se označavaju slovima abecede (Slika 4): O stupanj – inicijalni stupanj koji odgovara intenzitetu fluorescencije nakon 50  $\mu\text{s}$  ( $F_o$ ), J stupanj – predstavlja intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (FJ), I stupanj – intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (FI) te P stupanj – maksimalni intenzitet fluorescencije ( $F_m$ ). Ovisno o jačini pobudne svjetlosti porast O-P traje manje od 1 s pa sve do maksimalno nekoliko sekundi, a nakon toga slijedi smanjenje intenziteta fluorescencije (PS) do postizanja njenog stabilnog intenziteta. Porast fluorescencije od O-J odgovara fotokemijskoj redukciji primarnog akceptora elektrona QA (Joly i Carpentier, 2007), traje vrlo kratko (2ms) i označava se kao fotokemijska faza (Lazár i sur., 2005). Nakon stupnja J slijedi sporija faza od stupnja J do stupnja P koja se naziva termalna faza no još uvijek nije u potpunosti razjašnjen uzrok porasta intenziteta fluorescencije u fazama J-I i I-P iako neki autori predlažu moguća objašnjenja (Boisvert i sur., 2006; Joly i Carpentier, 2007; Schansker i sur., 2005). Na šest biljaka po tretmanu uzgojenih u stakleniku na prosječno tri lista je mjerena fluorescencija klorofila *a* *in vivo* pomoću aparata Plant Efficiency Analyser (PEA; Hansatech). Pola sata prije mjerenja listovi su prilagođeni na uvjete tame posebnim plastičnim kopčama. Prilagodбом listova na uvjete tame dolazi do potpune oksidacije plastokinona, odnosno do otvaranja svih reakcijskih središta što je preduvjet za mjerenje minimalnog intenziteta fluorescencije. PEA-fluorimetar mjeri polifazni rast fluorescencije klorofila induciran pulsom crvene saturacijske svjetlosti (pik 650 nm, 3000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a bilježi promjene u intenzitetu fluorescencije tijekom 1s, počevši od 50  $\mu\text{s}$  nakon osvjetljavanja (Slika 4). Tijekom prve 2 ms promjene se bilježe svakih 10  $\mu\text{s}$  te nakon toga svake ms. Intenzitet korištene svjetlosti omogućuje zatvaranje svih reakcijskih središta, odnosno postizanje maksimalnog intenziteta fluorescencije. Iz podataka dobivenih ovim mjerenjem

(Slika 4, Tablica 4) izračunavaju se parametri OJIP testa koji opisuju funkcioniranje PSII (Tablica 5) (Strasser i sur., 2004).

**Tablica 4.** Podaci dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a*

oznaka	značenje
F <sub>0</sub>	intenzitet fluorescencije nakon 50 μs (O stupanj)
F <sub>300</sub>	intenzitet fluorescencije nakon 300 μs
F <sub>J</sub>	intenzitet fluorescencije nakon 2 ms (J stupanj)
F <sub>I</sub>	intenzitet fluorescencije nakon 30 ms (I stupanj)
F <sub>m</sub>	maksimalni intenzitet fluorescencije (P stupanj)
F <sub>v</sub>	maksimalna varijabilna fluorescencija; $F_v = F_m - F_0$
t <sub>max</sub>	vrijeme potrebno da se postigne F <sub>m</sub>
V <sub>J</sub>	varijabilna fluorescencija na J stupnju; $V_J = (F_J - F_0) / (F_m - F_0)$
V <sub>I</sub>	varijabilna fluorescencija na I stupnju; $V_I = (F_I - F_0) / (F_m - F_0)$
Sm	normalizirana komplementarna površina iznad OJIP krivulje $Sm = AREA / (F_m - F_0)$
Mo	ukupna brzina zatvaranja reakcijskih centara $Mo = (TR_0 / RC) - (ET_0 / RC) = 4(F_{300\mu s} - F_0) / (F_m - F_0)$
N	prometni broj; $N = Sm \times [(dV/dt)_0] / V_J$



**Slika 4.** Lijevo - tipične promjene intenziteta fluorescencije (OJIPS) nakon osvjetljavanja fotosintetskog materijala prilagođenog uvjetima tame prikazane na logaritamskoj vremenskoj skali; desno - tipični OJIP porast fluorescencije prikazan na logaritamskoj vremenskoj skali. Umetnuti graf pokazuje promjenu relativne varijabilne fluorescencije u vremenu (Strasser i sur., 2004).



Tablica 5. Parametri OJIP testa

oznaka	značenje	izračun
$TR_0/ABS$ $= F_v/F_m$	maksimalni kvantni prinos fotosustava II	$[1 - (F_o/F_m)]$
$ET_0/ABS$	kvantni prinos elektronskog transporta	$1 - (F_o/F_m)$
$ET_0/TR_0$	učinkovitost kojom „uhvaćeni“ („trapped“) eksciton omogućava prijenos elektrona u elektron-transportnom lancu dalje od QA-	$(1 - VJ)$
$ABS/RC$	apsorpcija po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/VJ) \times [1/(F_v/F_m)]$
$TR_0/RC$	“trapping” po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/VJ)$
$ET_0/RC$	elektronski transport po aktivnom reakcijskom središtu	$M_o \times (1/VJ) \times (1-VJ)$
$RC/CS_0$	gustoća aktivnih reakcijskih središta	$F_v/F_m \times (VJ/M_o) \times ABS/CS_0$
$DI_0/RC$	disipacija po aktivnom reakcijskom središtu	$(ABS/RC) - (TR_0/RC)$
$ABS/CS_0$	apsorpcija po ekscitiranoj površini	$ABS/CS_0 \approx F_o$
$TR_0/CS_0$	“trapping” po ekscitiranoj površini	$[1 - (F_o/F_m)] \cdot F_o$
$ET_0/CS_0$	elektronski transport po ekscitiranoj površini	$[1 - (F_o/F_m)] \cdot (1 - VJ) \cdot F_o$
$DI_0/SC_0$	disipacija po ekscitiranoj površini	$(ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$
$RC/ABS$	omjer koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila	$[(FJ-F_o) / 4(F_{300\mu s}-F_o)] \times (F_v/F_m)$
$TR_0/DI_0$	omjer “trapping”-a i disipacije energije	$F_v/F_o$
$ET_0/(TR_0-ET_0)$	transport elektrona dalje od primarnog akceptora QA	$(F_m-FJ) / (FJ-F_o)$
$PI_{ABS}$	indeks fotosintetske učinkovitosti	$(RC/ABS) \times (TR_0/DI_0) \times [ET_0/(TR_0 - ET_0)]$

### 3.2.8. Određivanje sadržaja pigmenta

Sadržaj pigmenta određen je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena, Germany). Uzorci svježih listova mase 30 mg ekstrahirani su u 1,5 mL 80%-tnog hladnog acetona na ledu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 5 000 g, svakom uzorku je izmjeren volumen dobivenog supernatanta i zatim kvantitativno prenešen u kivetu. Mjeren je cijeli spektar apsorbancije za svaki uzorak te su zatim očitavani podaci na tri valne duljine:

663, 646 i 470 nm (Arnon, 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenta određen je prema sljedećim izrazima (Lichtenthaler, 1987):

a) za klorofil *a*:

$c_a$  = sadržaj klorofila *a* (mg g<sup>-1</sup> svježe tvari)

$$c_a = \frac{12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

b) za klorofil *b*:

$c_b$  = sadržaj klorofila *b* (mg / g svježe tvari)

$$c_b = \frac{20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

c) za ukupne karotenoide:

$c_k$  = sadržaj ukupnih karotenoida (mg / g svježe tvari)

$$c_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3,27 \times c_a - 104 \times c_b) / 198}{1 \times 1000 \times m} \times V$$

$A_x$  = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

$V$  = volumen uzorka (mL)

$l$  = dužina optičkog puta (1 cm)

$m$  = masa uzorka u g (0,03 g)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.9. Određivanje sadržaja malondialdehida

Sadržaj malondialdehida (MDA) određen je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena, Germany). Uzorci listova graha (400 mg) prelivevani su s tekućim dušikom i homogenizirani u 2 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH vrijednosti 7,0 koji je sadržavao 0,1 mM EDTA. Homogenat je centrifugiran 30 minuta u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4 °C i 25 000 g. Za određivanje sadržaja malondialdehida, krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješano je 200  $\mu$ L uzorka s 1300  $\mu$ L reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina (TBA) otopljene u 10%-tnoj trikloroetnoj kiselini). Za slijepu probu korišteno je 1,5 mL reakcijske smjese. Uzorci i slijepa proba su zagrijavani u sušioniku 30 min na 95 °C. Nakon toga su brzo

ohlađeni na ledu te centrifugirani 10 min na 10 000 g. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer, 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama  $\text{nmol g}^{-1}$  sv. t uz ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

$$[\text{MDA}] = \frac{A_x \times 1000}{m \times \epsilon \times l}$$

$A_x$  = apsorbancija pri određenoj valnoj duljini

$\epsilon_{520}$  = ekstinkcijski koeficijent =  $30,038 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$m$  = masa tkiva u gramima

$l$  = dužina optičkog puta = 1 cm

1000 = faktor kojim se množi  $A_x$  kako bi sadržaj bio izražen u nmol

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija.

#### 3.2.10. Određivanje sadržaja karbonila

Sadržaj reaktivnih karbonila (C=O) određen je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena, Germany). Uzorci listova mase 400 mg homogenizirani su u 2,0 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA. Homogenat je centrifugiran 20 minuta na 22 000 g. 200  $\mu\text{L}$  uzorka (supernatanta) koji sadrži najmanje 0,5 mg  $\text{mL}^{-1}$  proteina pomiješano je s 300  $\mu\text{L}$  dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepa proba korišten je alikvot istog uzorka (200  $\mu\text{L}$ ) pomiješan samo s 2 M HCl-om (300  $\mu\text{L}$ ). Pripremljeni uzorci inkubirani su jedan sat na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije je slijedila precipitacija proteina s 500  $\mu\text{L}$  10% trikloroetene kiseline, hlađenje uzoraka par minuta na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  te centrifugiranje 10 minuta na 12 000 g. Dobiveni talog je ispiran u smjesi etanola i etilacetata u omjeru 1:1 (3 x 500  $\mu\text{L}$ ) kako bi se uklonio nevezani reagens. Zatim je talog otopljen u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji oko 30 min. Sadržaj karbonila koji se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH određen je spektrofotometrijskim mjerenjem

otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur., 1990). Količina nastalih karbonila izražena je u nmol po po miligramu proteina (na sličan način kao i MDA) koristeći ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{370} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

#### 3.2.11. Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina

Sadržaj proteina kao i aktivnost svih mjerenih enzima određena je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena, Germany). Uzorci listova graha (400 mg) preliveni su tekućim dušikom i homogenizirani u 2 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH vrijednosti 7,0 koji je sadržavao 0,1 mM EDTA uz dodatak netopivog polivinilpirolidona. Homogenat je centrifugiran 30 minuta u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4 °C i 25000 g. Dobiveni supernatant korišten je kao sirovi ekstrakt za određivanje koncentracije proteina metodom Bradforda (1976) te za određivanje aktivnosti enzima. Ta se metoda temelji na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini 595 nm. Radna otopina po Bradfordu sastoji se od 15 mL etanola, 30 mL 88%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 30 mL Bradford matične otopine (100 mL 96%-tnog etanola, 200 mL 88%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i 350 mg Coomassie brillant blue G 250) i 450 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . U 1 mL radne otopine dodano je 50  $\mu\text{L}$  uzorka sirovog ekstrakta. Sadržaj proteina u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (0,1-0,8  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Sadržaj proteina izražena je kao mg proteina po gramu svježje mase biljnog tkiva.

#### 3.2.12. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Reakcijska otopina za mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) je sadržavala 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 mM kloridnu sol nitrotetrazolijevog plavila (NBT), 0,1 mM EDTA, 2  $\mu\text{M}$  riboflavin te ekstrakcijski pufer ili enzimsku otopinu (Giannopolitis i Ries, 1977). Na 890  $\mu\text{L}$  reakcijske otopine dodano je 100  $\mu\text{L}$  ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimske otopine koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (10, 20 i 50  $\mu\text{L}$ ). Riboflavin je dodan u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Uzorci su promiješani i stavljeni ispod izvora svjetlosti (30 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti te se nakon 10 min mjerenja svjetlost ugasi. NBT se reducira u

prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm.

Postotak inhibicije mjeri se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (\text{kontrola } A_{560} - \text{uzorak } A_{560}) / \text{kontrola } A_{560}$$

Jedna jedinica aktivnosti SOD-a izražava se kao ona količina enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina ( $\text{U mg}^{-1}$  proteina). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

### 3.2.13. Određivanje aktivnosti peroksidaza

Reakcijska otopina za askorbat peroksidazu (APOD) sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 0,2 mM askorbinsku kiselinu, 0,1 mM EDTA i 12 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nakano i Asada, 1981). Vodikov peroksid (10  $\mu\text{L}$ ) dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 980  $\mu\text{L}$  priređene otopine dodano je 10  $\mu\text{L}$  sirovog ekstrakta i mjenen je pad apsorbancije (zbog oksidacije askorbinske kiseline) svaku sekundu tijekom 15 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm. Aktivnost APOD izražena je kao količina potrošenog askorbata u jedinicama ( $1\text{U} = \mu\text{mol min}^{-1}$ ) po miligramu proteina ( $\text{U mg}^{-1}$  proteina) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

$$\text{APOD} = \frac{\Delta A_{\text{sv}} \times f \times V_{\text{r.s.}}}{V_{\text{uzor.}} \times m \times \epsilon \times l}$$

$$\frac{\text{aktivnost APOD} \left[ \frac{\Delta A \mu\text{mol}}{\text{min g}_{\text{sv.t.}}} \right]}{\text{sadržaj proteina} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g}_{\text{sv.t.}}} \right]}$$

$\Delta A_{\text{sv}}$  = srednja vrijednost promjene apsorbancije u određenom vremenskom intervalu (linearni dio)

$f$  = faktor kojim se množi  $\Delta A_{\text{sv}}$  kako bi se rezultat izrazio u minuti (60 u slučaju APOD)

$V_{\text{r.s.}}$  = ukupan volumen reakcijske smjese

$V_{\text{uzor.}}$  = volumen dodanog uzorka (sirovog ekstrakta)

$m$  = masa tkiva u gramima

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

Reakcijska otopina za nespecifične peroksidaze (POD) sadržavala je 50 mM kalij fosfatni pufer (pH 7), 18 mM gvajakol i 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chance i Maehly, 1955). Vodikov peroksid dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 990  $\mu$ L ove otopine dodano je 10  $\mu$ L sirovog ekstrakta te je mjeren porast apsorbancije (uslijed stvaranja tetragvajakola) svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 470 nm. Aktivnost POD izračunata je na isti način kao i aktivnost APOD a jedna jedinica POD izražena je kao količina nastalog tetragvajakola (1U= $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) po miligramu proteina (U mg<sup>-1</sup> proteina) uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent za gvajakol ( $\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika  $\pm$  standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

#### 3.2.14. Određivanje aktivnosti nitrat reduktaze

Za određivanje aktivnosti nitrat reduktaze (NR), svaki uzorak (60 mg svježeg biljnog tkiva) pripremljen je u dvije epruvete,  $t_0$  - uzorak u kojem se enzimska reakcija zaustavlja odmah i  $t_{30}$  - uzorak u kojem se enzimska reakcija zaustavlja nakon 30 min (Randall, 1969). Svaki uzorak lista je prethodno narezan na malene komadiće (na ledu). U svaki uzorak (u epruveti) dodano je po 2 mL 100 mM pufera (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH vrijednosti 7,4 koji sadrži 30 mM KNO<sub>3</sub> te 5%-tni propanol. Uzorci  $t_0$  odmah su stavljeni na 5 min u kipuću vodenu kupelj kako bi se zaustavila enzimska reakcija te su zatim ohlađeni na sobnu temperaturu. Uzorci  $t_{30}$  zajedno s ohlađenim uzorcima  $t_0$  inkubirani su tijekom 30 min na 30 °C u termobloku (uz povremeno miješanje). Nakon inkubacije, zaustavljena je reakcija i u uzorcima  $t_{30}$  (5 min u kipućoj vodenoj kupelji) koji su također ohlađeni na sobnu temperaturu. U sve uzorke je zatim dodano po 1 mL 1% sulfanilamida u 3M HCl te su uzorci miješani 15 sekundi. Nakon toga je u svaki uzorak dodano po 1 mL 0,02% N-(1-naftil)etilendiamina, uzorci su ponovno promiješani (15 sekundi) te inkubirani tijekom 20 min na sobnoj temperaturi. Cjelokupni postupak od vaganja do mjerenja apsorbancije rađen je u tami. Apsorbancija svih uzoraka je mjerena na 540 nm. Kako bi poništili obojenje koje nastaje u slučaju postojanja određene količine nitrita u inkubacijskoj otopini, apsorbancija  $t_0$  je oduzeta od  $t_{30}$ . Aktivnost NR u pojedinim uzorcima određena je očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina NaNO<sub>2</sub> u određenim koncentracijama (0,1-0,8 nmol mL<sup>-1</sup>). Aktivnost NR

izražena je kao količina HNO<sub>2</sub> nastalog u sat vremena po gramu svježje tvari ( $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) prema formuli:

$$\text{aktivnost NR} = \frac{\mu\text{mol NO}_2^- \times 2}{m(\text{g})} [\mu\text{mol NO}_2^- \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}]$$

2 = faktor kojim se množi  $\mu\text{mol}$  nitrita kako bi rezultat bio izražen po satu (h)

m = masa biljnog tkiva

### 3.3. Statistička obrada podataka

Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja replika dobivenih iz tri nezavisna pokusa. Usporedba kontrole i tretmana (pojedinačno i međusobno) provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) te primjenom "Duncan's New Multiple Range Test" tj. post hoc testa višestrukih usporedbi. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p < 0,05$ . Pri statističkoj obradi podataka korišten je računalni program STATISTICA 12.0 (Stat Soft Inc., SAD).

Većina odabranih pokazatelja praćena je tijekom tri vegetacijske sezone (2010, 2011 i 2012. g.) u stakleniku te tijekom dvije vegetacijske sezone (2011 i 2012. g.) na pokusnim poljima. Biljke su uzgajane u supstratu (pijeska ili vrtna zemlja) s dodatkom različitih količina troske (T1 - 10, T2 - 20, i T3 - 40 g /kg), s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK; pozitivna kontrola), s dodatkom 20 g troske i tekućeg gnojiva (NPKT; sezona 2012.g.) ili bez dodatka troske i tekućeg gnojiva (kontrola, K).

#### **4.1. Pokazatelji rasta graha**

##### **4.1.1. Visina, broj listova i mahuna graha - staklenik**

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

Biljke uzgajane s dodatkom troske (neovisno o njenoj količini) ili tekućeg gnojiva bile su statistički značajno više u usporedbi s kontrolom (Slika 5A), a biljke uzgajane s dodatkom 20 g troske bile su statistički značajno više i od biljaka uzgajanih uz dodatak tekućeg gnojiva (NPK). Broj listova pojedinih biljaka uzgajanih s dodatkom bilo troske ili tekućeg gnojiva također je bio statistički značajno veći nego u kontrolnim biljkama (Slika 5B). Broj mahuna pojedinih biljaka uzgajanih s dodatkom 20 ili 40 g troske bio je statistički značajno veći u usporedbi s kontrolnim biljkama no ne i u usporedbi s pozitivnom kontrolom (Slika 5B).

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

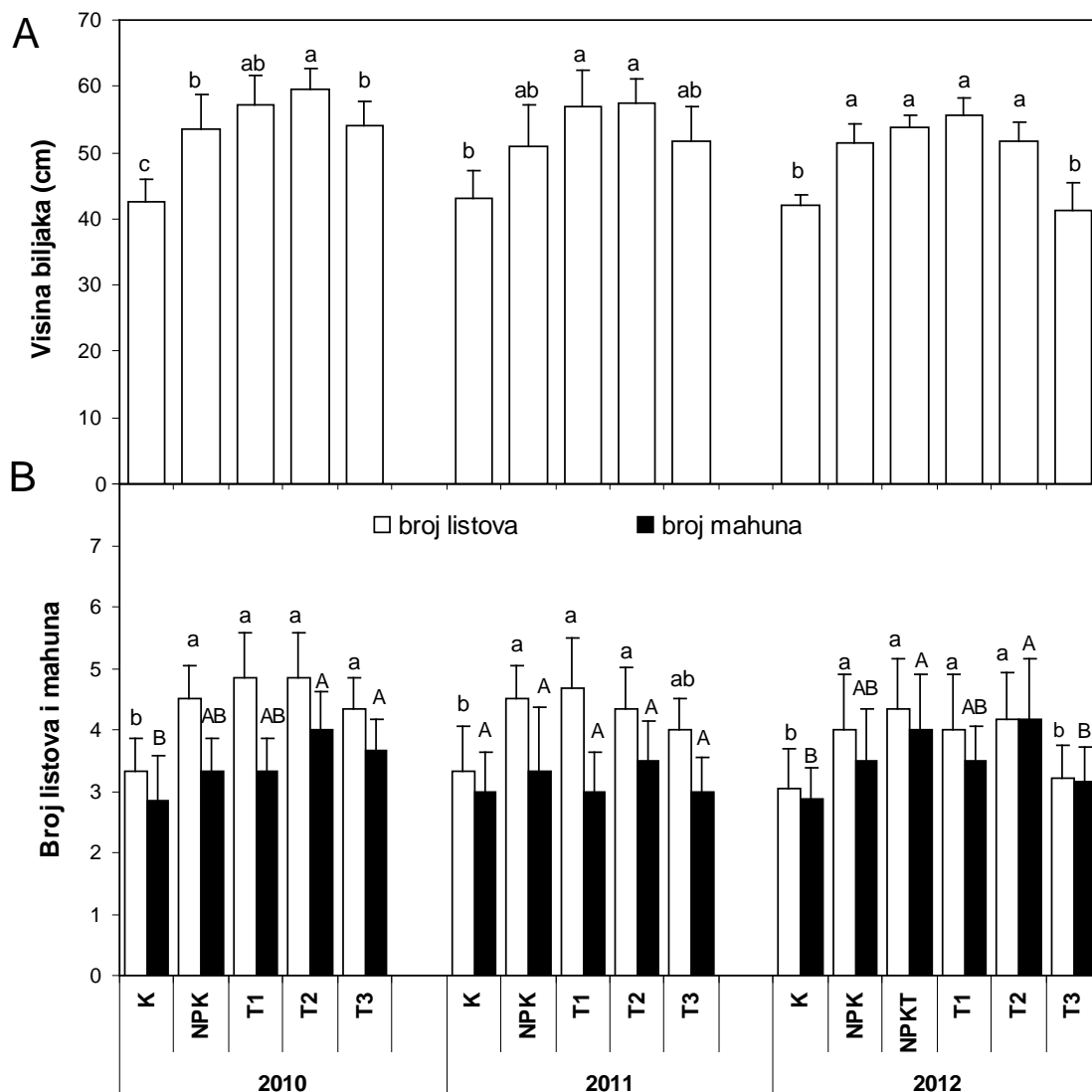
Nije utvrđena statistički značajna razlika u visini kontrolnih biljaka, biljaka uzgajanih s dodatkom NPK biljaka i biljaka uzgajanih s dodatkom 40 g troske (Slika 5A). Biljke uzgajane s dodatkom 10 ili 20 g troske bile su statistički značajno više u usporedbi s kontrolnim biljkama. Broj listova pojedinih biljaka uzgajanih s dodatkom 10 ili 20 g troske kao i s dodatkom NPK bio je statistički značajno veći nego u kontrolnim biljkama (Slika 5B). Broj mahuna pojedinih biljaka uzgajanih s dodatkom troske ili tekućeg gnojiva bio je sličan onome u kontrolnih biljaka (Slika 5B).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Obzirom na visinu, biljke graha su rasle bolje na svim tretmanima, izuzev T3, u usporedbi s kontrolom (Slika 5A). Broj listova kontrolnih biljaka i biljaka uzgajanih s dodatkom 40 g troske nije se statistički značajno razlikovao dok su biljke na drugim tretmanima razvile veći broj listova nego u kontrolnim biljkama (Slika 5B). Značajno veći broj mahuna u usporedbi s kontrolom zabilježen je u biljkama na tretmanu T2 i NPKT. Broj mahuna pojedinih biljaka uzgajanih na supstratu s dodatkom 20 g troske ili na kombiniranom supstratu bio je statistički



značajno veći u usporedbi s kontrolom no ne i u usporedbi s pozitivnom kontrolom (Slika 5B).



**Slika 5.** Visina (cm) (A), broj listova i mahuna graha (B) uzgajanog osam tjedana u: supstratu (pijesak) bez dodatka umjetnog gnojiva i troske (kontrola, K), supstratu s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (pozitivna kontrola, NPK), supstratu s dodatkom 20 g troske (T2) i NPK (NPKT) te supstratima s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g troske/kg supstrata. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.1.2. Prinos mase suhe tvari - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

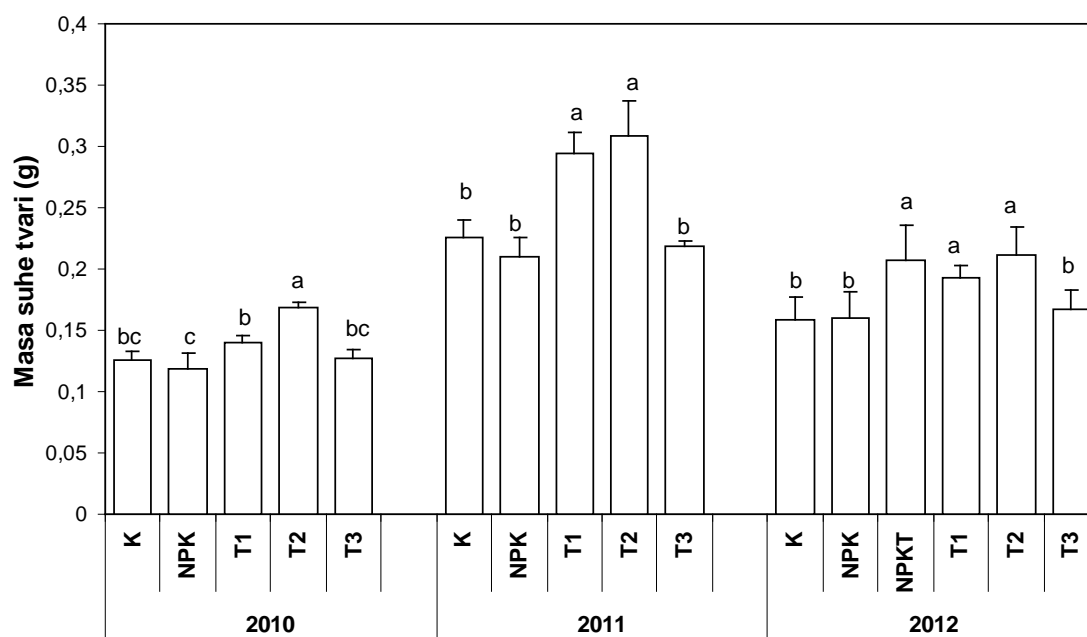
Povećani prinos mase suhe tvari u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgojene u supstratu NPK zabilježen je u biljkama uzgojenim u supstratima s troskom (Slika 6) a posebice s dodatkom 20 g troske (porast od 34% u odnosu na kontrolu).

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Masa suhe tvari listova biljaka uzgajanih s dodatkom 10 ili 20 g troske bila je između 30 i 37% povećana u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgojene s dodatkom NPK (Slika 6).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Masa suhe tvari listova biljaka uzgajanih s dodatkom 10 ili 20 g troske kao i u kombiniranom supstratu bila je statistički značajno povećana (22 do 33%) u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgojene s dodatkom NPK (Slika 6).



**Slika 6.** Masa suhe tvari (g) listova graha uzgajanog osam tjedana u: supstratu (pijesak) bez dodatka umjetnog gnojiva i troske (kontrola, K), supstratu s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (pozitivna kontrola, NPK), supstratu s dodatkom 20 g troske (T2) i NPK (NPKT) te supstratima s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g troske/kg supstrata. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

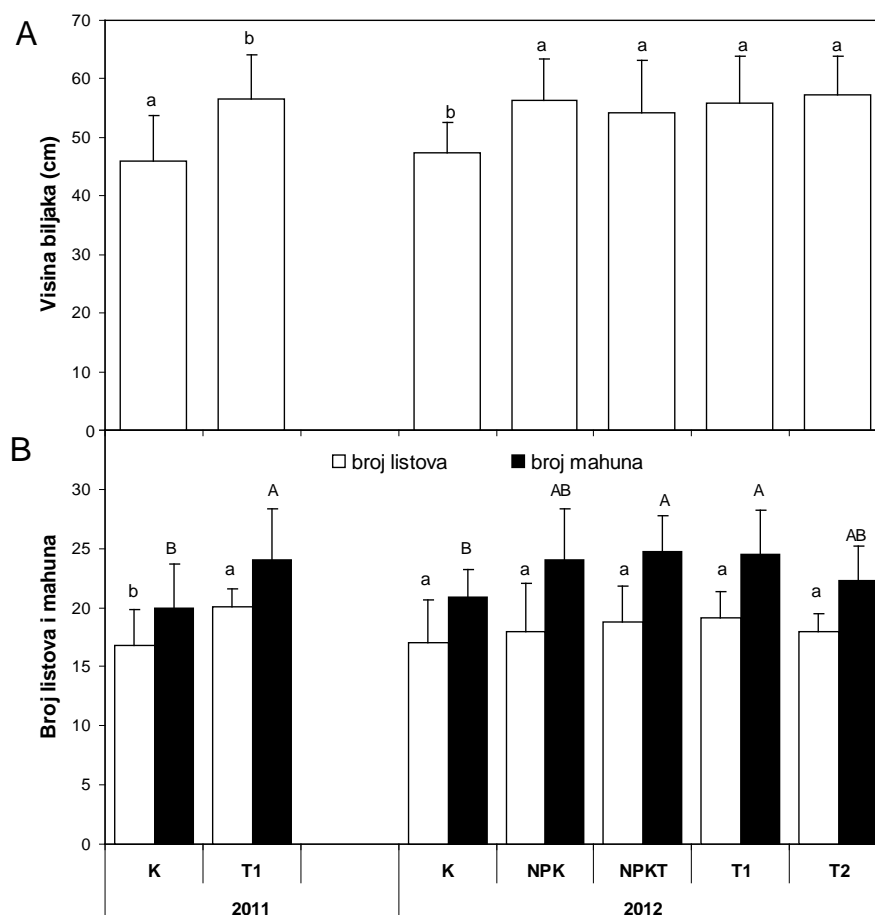
## 4.1.3. Visina, broj listova i mahuna graha - polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Biljke uzgajane na pokusnom polju s dodatkom 10 g troske bile su statistički značajno više (Slika 7A) te su razvile veći broj listova i mahuna u usporedbi s kontrolom (Slika 7B).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Obzirom na visinu, biljke graha su bolje rasle na svim tretmanima u usporedbi s kontrolnim biljkama (Slika 7A). Biljke uzgajane na pokusnim poljima s dodatkom 10 g troske te NPK i 20 g troske (NPKT) razvile su veći broj mahuna u odnosu na kontrolu (Slika 7B). Broj mahuna kontrolnih biljaka i biljaka uzgajanih s dodatkom 20 g troske ili s dodatkom NPK nije se međusobno razlikovao. S druge strane, dodatak troske i/ili NPK nije statistički značajno utjecao na broj listova u odnosu na kontrolne biljke.



**Slika 7.** Visina (cm) (A), broj listova i mahuna graha (B) uzgajanog osam tjedana na pokusnim poljima: 2011. g. - bez dodatka troske (kontrola, K) ili s dodatkom 10 g troske (T1); 2012. g. - bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT), s dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g troske. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

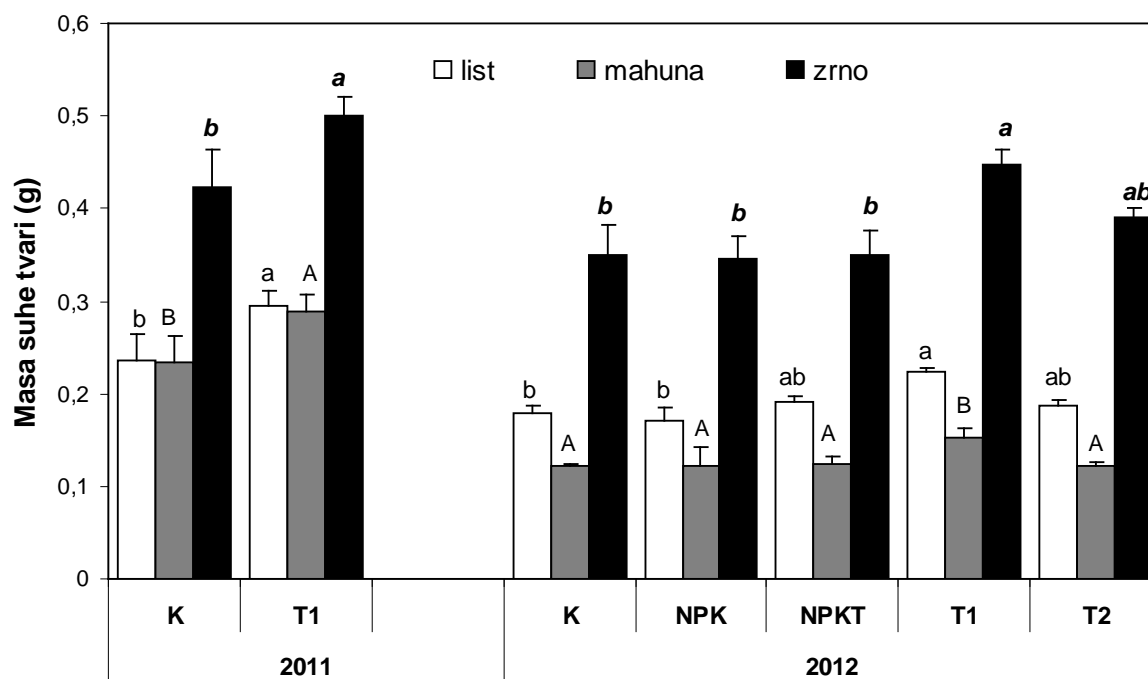
## 4.1.4. Prinos mase suhe tvari - polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Masa suhe tvari listova, mahuna i zrna biljaka uzgajanih na pokusnom polju s dodatkom 10 g troske bila je statistički značajno povećana (19 do 25%) u odnosu na kontrolne biljke (Slika 8).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Masa suhe tvari listova, mahuna i zrna biljaka uzgajanih na pokusnom polju s dodatkom 10 g troske bila je statistički značajno povećana (25 do 28%) u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgojene s dodatkom NPK (Slika 8). Dodatak 20 g troske i/ili NPK nije utjecao na masu suhe tvari mahuna u odnosu na kontrolne biljke ali je izazvao lagano povećanje mase suhe tvari listova i zrna u odnosu na kontrolu i NPK. Istovremeni dodatak troske i NPK (NPKT) neznatno je povećao mase suhe tvari listova no nije utjecao na suhu masu mahuna i zrna u odnosu na kontrolu i NPK.



**Slika 8.** Masa suhe tvari (g) listova, mahuna i zrna graha uzgajanog osam tjedana na pokusnim poljima: 2011. g. - bez dodatka troske (kontrola, K) ili s dodatkom 10 g troske (T1); 2012. g. - bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT), s dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g troske. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.2. Sadržaj makroelemenata i mikroelemenata

### 4.2.1. Sadržaj makro- i mikroelemenata u supstratu - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

U Tablici 6. prikazan je sadržaj pojedinih elemenata (Mn, Fe, Na, Mg, N, P, K) u supstratima (kvarcni pijesak i/ili dodaci troske ili NPK) u kojima su biljke uzgajane tijekom osam tjedana te pH vrijednost i električni konduktivitet (EC) otopina supstrata. Dodatak troske u supstrat doveo je do porasta pH vrijednosti otopina supstrata dok je dodatak NPK smanjio pH vrijednost otopine supstrata. Vrijednosti EC su bile povećane u svim supstratima u usporedbi s kontrolnim supstratom s time da su najviše vrijednosti bile zabilježene u supstratima T2 i T3. Najveći sadržaj Mg izmjeren je u supstratima s dodanom troskom, posebice u supstratu T2, u odnosu na ostale supstrate. U usporedbi s kontrolnim supstratom, sadržaj Fe, Na, Mn i N bio je veći u supstratima s dodanom troskom, a posebice u supstratu s 40 g troske/kg supstrata. Sadržaj P bio je najveći u supstratu T2 no i u svim ostalim supstratima su izmjerene veće vrijednosti P u odnosu na kontrolni supstrat. Najveći sadržaj K izmjeren je u supstratu NPK no vrlo slične vrijednosti su izmjerene i u supstratima T2 i T3 dok su u supstratu T1 zabilježene vrijednosti K sličnije onima u kontrolnom supstratu.

**Tablica 6.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
pH	7,15	5,97	9,95	10,11	10,71
EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	93	189	157	215	203
Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	93,2	89,5	120,3	127,3	157,0
Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	795	991	1167	2970	4800
Na ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	61,3	83,6	112,4	126,5	189,1
Mg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	290	262	775	1280	945
N ( $\text{g kg}^{-1}$ )	1,481	1,623	1,838	2,376	2,793
P ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,493	0,789	0,695	1,030	0,657
K ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,663	1,213	0,798	1,131	1,166

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dvije replike.

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Slično kao i 2010. g., pH vrijednosti i EC otopina supstrata su pokazale porast pod utjecajem troske (Tablica 7) dok je u otopini supstrata NPK izmjerena niža pH vrijednost nego u otopini kontrolnog supstrata. Također, sadržaj Fe, Na, Mn i N bio je povećan u supstratima s dodanom troskom, a porast je bio sukladan količini troske u supstratu. Povećani sadržaj Mg i P izmjeren je također u supstratima s dodanom troskom, posebice u supstratu T2, u odnosu na ostale supstrate. Sadržaj P bio je najveći u supstratu NPK no i u svim ostalim supstratima su izmjerene veće vrijednosti P u odnosu na kontrolni supstrat. Najveći sadržaj K izmjeren je u supstratu NPK, a povećane vrijednosti u usporedbi s kontrolnim supstratom izmjerene su i u supstratima T2 i T3.

**Tablica 7.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
pH	7,71	6,09	10,01	10,23	10,79
EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	98	201	124	245	271
Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	79,0	65,0	135,9	140,0	185,0
Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	905	1037	1400	4300	5900
Na ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	70,0	95,6	143,3	156,9	249,6
Mg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	138	216	451	1395	1196
N ( $\text{g kg}^{-1}$ )	1,648	1,865	2,115	2,595	2,718
P ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,939	1,546	1,086	1,438	1,087
K ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,911	1,520	0,923	1,189	1,329

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dvije replike.

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

U usporedbi s dvije prethodne vegetacijske sezone (2010. i 2011. g.), isti trend promjena u pH i EC vrijednostima kao i u sadržaju makro- i mikroelemenata zabilježen je i 2012. g. (Tablica 8). Odstupanje od prethodnih sezona zamjetljivo je u sadržaju K čiji je najveći sadržaj zabilježen u supstratu NPKT, a tek zatim supstratima NPK i T2.

Kako bi se utvrdio potencijalno sinergički utjecaj istovremenog dodatka troske i NPK na biljke 2012. g. dodatno je korišten i miješani supstrat troske i NPK (20g troske i NPK; NPKT). Taj je supstrat po svim mjerenim parametrima bio vrlo usporediv sa supstratom T2,

izuzev u sadržaju Mg čije su najveće vrijednosti zabilježene upravo u supstratu NPKT iako su i vrijednosti većine ostalih parametara bilo nešto više nego u supstratu T2.

Također je u ovoj sezoni izmjeren sadržaj pristupačnog P (pP) i N (pN) u supstratu gdje je vidljivo da su te vrijednosti u skladu sa sadržajem ukupnog P i N u supstratu.

**Tablica 8.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva NPK i Fe i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2	T3
pH	8,46	7,47	10,11	9,75	10,09	10,19
EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	88	150	258	136	253	288
Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	99,1	101,3	160,3	157,7	168,3	202,5
Fe ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	653	625	2450	987	2230	4170
Na ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	90,0	105,2	183,3	81,1	175,6	96,5
Mg ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	154	233	1780	605	1555	1496
N ( $\text{g kg}^{-1}$ )	1,264	1,293	1,872	1,397	1,712	1,618
pN ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,170	0,300	0,310	0,183	0,252	0,210
P ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,419	0,693	1,050	0,655	0,920	0,397
pP ( $\text{g kg}^{-1}$ )	0,206	0,372	0,553	0,293	0,481	0,193
K ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,572	1,056	1,386	0,813	1,237	0,993

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dvije replike. Kratica pN i pP odnose se na pristupačni N i P.

#### 4.2.2. Sadržaj makro- i mikroelemenata u listovima graha - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

U Tablici 9. prikazan je sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratu (kvarcni pijesak i/ili dodaci troske ili NPK). Sadržaj Mn u listovima graha uzgajanog u supstratu s 20 i 40 g troske bio je značajno povećan u odnosu na vrijednosti tog metala izmjerenog u kontrolnim biljkama (K) i biljkama uzgajanim u supstratu NPK. U biljkama uzgajanim u supstratu T2 zabilježen je statistički značajno povećan sadržaj Mg u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgajane u supstratu NPK u kojem je izmjeren i najniži sadržaj tog elementa. Biljke rasle u supstratu NPK nakupile su statistički značajno veće količine Fe u odnosu na biljke rasle u drugim supstratima. Sadržaj N u biljkama uzgajanim u supstratima T1, a posebice u supstratu T2 bio je znatno veći nego onaj u kontrolnim biljkama i onima uzgajanim s dodatkom NPK. Sadržaj P bio je najveći u listovima graha uzgojenog u supstratu T2 te značajno povećan u odnosu na kontrolne biljke, no ne i u

odnosu na biljke uzgajane u supstratu NPK. Sadržaj K i Na u biljkama uzgojenim u različitim supstratima nije se međusobno statistički značajno razlikovao.

**Tablica 9.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	49,7 b	52,7 b	51,7 b	67,8 a	71,1 a
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	113,1 b	293,4 a	153,7 b	157,7 b	130,0 b
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	200,0 a	197,3 a	203,7 a	215,0 a	226,7 a
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	3,58 bc	2,37 d	4,02 b	5,30 a	3,26 c
N (g kg <sup>-1</sup> )	10,42 c	10,91 c	14,13 b	16,24 a	9,75 c
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,60 b	1,81 ab	1,84 ab	2,14 a	1,43 b
K (g kg <sup>-1</sup> )	7,78 a	8,01 a	8,28 a	8,77 a	8,01 a

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu četiri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### *Vegetacijska sezona 2011.g*

Kao i 2010. g., sadržaj Mn u listovima graha uzgajanog u supstratu s 20 i 40 g troske bio je značajno povećan u odnosu na vrijednosti tog metala izmjenjenog u kontrolnim biljkama i biljkama uzgajanim u supstratu NPK (Tablica 10). Biljke rasle u supstratima T1 i T2 nakupile su bitno veće količine željeza u odnosu na kontrolne biljke, no ne i u odnosu na biljke uzgajane u supstratu NPK gdje su zabilježene najveće vrijednosti tog metala. U biljkama uzgajanim u supstratima T1 i T2 zabilježen je statistički značajno povećan sadržaj Mg u odnosu na biljke uzgajane u ostalim supstratima. Sadržaj Na u biljkama uzgojenim u supstratu s dodatkom 20 g troske bio je statistički značajno povećan u odnosu na sve ostale tretmane. Sadržaj N u biljkama uzgajanim u supstratima T1 i T2 bio je znatno veći nego onaj u kontrolnim biljkama i biljkama uzgajanim u supstratu NPK. Sadržaj P bio je najveći u listovima graha uzgojenog u supstratu T2 te značajno povećan u odnosu na kontrolne biljke no ne i u odnosu na biljke uzgajane u supstratu NPK. Sadržaj K u biljkama uzgojenim u supstratu T2 bio je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolne biljke no najveći sadržaj K izmjeren je u biljkama uzgajanim u supstratu NPK. Sadržaj tog elementa u biljkama uzgajanim u supstratu T3 bio je lagano povećan u odnosu na kontrolu.



**Tablica 10.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	52,8 c	49,4 c	56,7 bc	71,1 a	69,4 ab
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	119,1 c	354,1 a	171,0 b	229,7 b	127,3 bc
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	222,0 b	206,0 b	242,0 b	375,7 a	230,0 b
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	3,22 b	2,77 b	4,78 a	5,07 a	3,47 b
N (g kg <sup>-1</sup> )	9,52 c	10,93 c	15,60 b	18,76 a	10,85 c
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,46 b	1,75 ab	1,64 b	2,10 a	1,49 b
K (g kg <sup>-1</sup> )	8,08 c	12,91 a	8,44 c	10,10 b	9,18 bc

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu četiri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### *Vegetacijska sezona 2012. g.*

Sadržaj Mn u listovima graha uzgajanog u supstratu s dodatkom troske (neovisno o njenoj količini) kao i u listovima biljaka uzgajanih u kombiniranom supstratu (NPKT) bio je značajno povećan u odnosu na vrijednosti tog metala izmjenjenog u kontrolnim biljkama i biljkama uzgajanim u supstratu NPK (Tablica 11). Biljke rasle u supstratima T1 i T2, a posebice u supstratima NPKT i NPK nakupile su bitno veće količine željeza u odnosu na kontrolne biljke. U biljkama uzgajanim u supstratu T1 i posebice u supstratima T2 i NPKT zabilježene su statistički značajno povećane vrijednosti Mg u odnosu na biljke uzgajane u kontrolnom supstratu. Sadržaj Na u biljkama uzgojenim u supstratu s dodatkom 20 g troske bio je bitno povećan u odnosu na sve ostale tretmane. Sadržaj N u biljkama uzgajanim u supstratima T2 i NPKT bio je znatno veći nego onaj u kontrolnim biljkama i biljkama uzgajanim u supstratu NPK. Sadržaj N u biljkama uzgajanim u supstratu T1 bio je znatno veći nego onaj u kontrolnim biljkama. U listovima graha uzgojenog u supstratima T2 i NPKT izmjeren je statistički značajno veći sadržaj P u odnosu na listove biljaka raslih u drugim supstratima. Sadržaj K u biljkama uzgojenim u supstratima T2, NPKT i NPK bio je međusobno sličan te statistički značajno povećan u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgajane u supstratima T1 i T3.

**Tablica 11.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva NPK i Fe i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2	T3
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	76,2 c	79,7 c	97,8 b	96,7 b	119,2 a	104,8 b
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	93,1 d	190,8 ab	211,2 a	137,3 c	178,3 b	113,7 cd
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	135,3 b	158,0 ab	120,3 b	142,0 ab	189,0 a	156,7 ab
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	2,68 c	2,44 c	4,96 a	3,77 b	4,01 b	2,85 c
N (g kg <sup>-1</sup> )	8,78 c	13,27 b	19,10 a	17,52 b	13,10 a	10,93 bc
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,56 b	1,47 b	2,54 a	1,69 b	2,50 a	1,49 b
K (g kg <sup>-1</sup> )	8,34 b	14,91 a	13,14 a	9,34 b	15,32 a	9,48 b

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu četiri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.2.3. Sadržaj makro- i mikroelemenata u supstratu – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

U Tablici 12. prikazan je sadržaj pojedinih elemenata (Mn, Fe, Na, Mg, N, P, K) u supstratu (vrtna zemlja i/ili dodatak 10 g troske po kg supstrata) u kojem su biljke uzgajane tijekom osam tjedana te pH vrijednost i električni konduktivitet (EC) otopina supstrata. Dodatak troske u supstrat doveo je do porasta pH i EC vrijednosti otopine supstrata. U usporedbi s kontrolnim supstratom, sadržaj Mn, Fe, Na, Mg i K bio je veći u supstratu s dodanom troskom. Vrijednosti sadržaja P i N bile su slične u oba supstrata.

**Tablica 12.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1) g EAF troske ili bez dodatka troske (K, kontrola).

oznaka	K	T1
pH	7,81	7,95
EC (μS cm <sup>-1</sup> )	401	489
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	135,0	162,3
Fe (g kg <sup>-1</sup> )	4,99	6,57
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	147,8	168,0
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	2,97	4,15
N (g kg <sup>-1</sup> )	3,71	3,95
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,11	1,10
K (g kg <sup>-1</sup> )	1,40	1,60

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dvije replike.

##### *Vegetacijska sezona 2012.g*

U Tablici 13. prikazan je sadržaj pojedinih makro - i mikroelemenata te pojedinih neesencijalnih elemenata u supstratu (vrtna zemlja i/ili dodatak troske i/ili NPK i troske) u kojem su biljke uzgajane tijekom osam tjedana te pH vrijednost i električni konduktivitet (EC) otopina supstrata. pH vrijednosti i EC otopina supstrata pokazale su porast pod utjecajem troske i/ili NPK.

Sadržaji Mn, Fe, Mg i N u supstratima T1 i T2 bili su povećani u usporedbi s kontrolnim supstratom, a sadržaji Mn, Mg i N u supstratima T1 i T2 bili su povećani i u usporedbi sa supstratom NPK. Povećani sadržaj P, u usporedbi s kontrolnim supstratom, izmjeren je u svim ostalim supstratima.

Najveći sadržaj K izmjeren je u supstratu T2, a povećane vrijednosti u usporedbi s kontrolnim supstratom izmjerene su i u ostalim supstratima. Kao i u slučaju supstrata NPKT korištenog u stakleniku (kombinacija troske i NPK u pijesku), tako je i supstrat NPKT korišten u polju (kombinacija troske i NPK u zemlji) bio po svim mjerenim parametrima usporediv sa supstratom T2. No, za razliku od kombinacije NPKT u pijesku gdje su gotovo sve vrijednosti mjerenih elemenata poglavito Mg bile veće u usporedbi sa supstratom T2, u kombinaciji NPKT u zemlji najveće vrijednosti Mg zabilježene su u supstratu T2 iako su i vrijednosti većine ostalih parametara bilo nešto više nego u supstratu NPKT.

Najveći sadržaj Al izmjeren je u supstratu T2, ali taj je metal bio povećan i u supstratima T1 i NPKT u odnosu na K i NPK.

Vrijednosti Si bile su preko dva i pol puta veće u supstratu T1 u odnosu na sve ostale supstrate.

U supstratu NPKT zabilježen je najveći sadržaj Cr, a veći sadržaj tog elementa u odnosu na K i NPK bio je utvrđen i u supstratima s dodatkom troske.

Sadržaj Cd i Pb bio je veći u supstratima s dodatkom troske, posebice u supstratu T2, u odnosu na K i NPK. Sadržaj ostalih mjerenih elemenata (Zn, Ni, Cu, Tl, Sb i Ba) nije gotovo uopće odstupao od kontrolnih vrijednosti pa ovdje nije ni prikazan.

**Tablica 13.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva NPK i Fe i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2
pH	7,71	7,42	8,47	8,53	8,77
EC ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	398	494	595	473	464
Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	128,0	139,0	153,1	201,2	147,9
Fe ( $\text{g kg}^{-1}$ )	4,77	5,25	5,34	5,49	5,10
Na ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	432,7	444,4	480,5	441,1	441,3
Mg ( $\text{g kg}^{-1}$ )	6,86	6,61	8,32	8,70	9,25
N ( $\text{g kg}^{-1}$ )	7,01	7,22	8,05	7,84	7,57
pN ( $\text{g kg}^{-1}$ )	3,04	3,69	3,96	3,46	3,37
P ( $\text{g kg}^{-1}$ )	6,22	6,97	7,13	7,36	6,86
pP ( $\text{g kg}^{-1}$ )	3,86	4,01	4,17	4,30	4,00
K ( $\text{g kg}^{-1}$ )	5,56	5,61	5,85	6,07	6,11
Al ( $\text{g kg}^{-1}$ )	19,3	19,7	22,0	22,8	27,9
Si ( $\text{g kg}^{-1}$ )	1,20	1,42	1,56	3,38	1,78
Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	0,524	0,531	0,568	0,583	0,632
Cr ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	80	73,5	110,6	90,6	99,5
Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	520	516	499	592	602

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu dvije replike. Kratica pN i pP odnose se na pristupačni N i P.

#### 4.2.4. Sadržaj makro- i mikroelemenata u grahu – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2011.g*

U Tablici 14. prikazan je sadržaj pojedinih elemenata (Mn, Fe, Na, Mg, N, P, K) u listovima, mahunama i zrnu graha uzgajanog tijekom osam tjedana u vrtnoj zemlji s ili bez dodatka troske.

Sadržaj Mn, Fe, Mg i K u listovima graha uzgojenog u supstratu s dodatkom troske bio je statistički značajno povećan u odnosu na listove kontrolnih biljaka dok se vrijednosti ostalih elemenata nisu međusobno razlikovale.

U mahunama graha uzgojenog uz dodatak troske zabilježen je statistički značajno veći sadržaj svih mjerenih elemenata, izuzev Fe, u odnosu na mahune kontrolnih biljaka.

U usporedbi sa zrnima kontrolnog graha, zrna graha uzgojenog uz dodatak troske bila su bogatija s Fe, Na, Mg i P.

**Tablica 14.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u listovima, mahunama i zrnu graha uzgajanog u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1) g EAF troske ili bez dodatka troske (K, kontrola).

oznaka	list		mahuna		zrno	
	K	T1	K	T1	K	T1
<b>Mn (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	36,59	47,90 *	21,94	40,66 *	15,25	18,02
<b>Fe (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	350,9	448,7 *	191,9	211,3	118,5	155,67 *
<b>Na (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	101,5	111,5	38,45	141,0 *	14,00	21,38 *
<b>Mg (g kg<sup>-1</sup>)</b>	4,52	5,28 *	3,02	4,38 *	2,02	2,34 *
<b>N (g kg<sup>-1</sup>)</b>	14,36	14,05	28,09	34,09 *	24,48	24,42
<b>P (g kg<sup>-1</sup>)</b>	3,42	3,61	4,37	6,25 *	2,45	2,96 *
<b>K (g kg<sup>-1</sup>)</b>	15,77	18,35 *	23,97	37,25 *	23,14	23,77

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu četiri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%. Redovi označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju od kontrole ( $P \leq 0,05$ ).

#### *Vegetacijska sezona 2012. g.*

U Tablici 15. prikazan je sadržaj pojedinih elemenata (Mn, Fe, Na, Mg, N, P, K) u listovima, mahunama i zrnu graha uzgajanog tijekom osam tjedana u vrtnoj zemlji s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK.

Sadržaj Fe, Mg i P u listovima graha uzgojenog u supstratu s dodatkom troske bio je statistički značajno povećan u odnosu na listove kontrolnih biljaka dok se vrijednosti K nisu bitno razlikovale od kontrole. Neovisno o supstratu, u listovima graha su zabilježene slične vrijednosti Mn i Na. Najveći sadržaj Fe zabilježen je u listovima graha uzgajanog u supstratu NPK, a najveći sadržaj K i N u listovima graha uzgajanog u supstratima NPK i NPKT. U usporedbi s kontrolom, sadržaj N i K bio je povećan i u listovima biljaka raslih u supstratu T1. U mahunama graha uzgojenog uz dodatak troske zabilježen je statistički značajno veći sadržaj Mn, Fe i N u odnosu na mahune kontrolnih biljaka. Sadržaj K bio je najveći u mahunama graha uzgojenog u supstratu T1, a u tim su mahunama izmjerene i znatno veće količine N u odnosu na kontrolne mahune. Najveći sadržaj Na zabilježen je u mahunama graha raslog u supstratu NPKT, a u tim su mahunama izmjerene i statistički značajno veće količine Mn, Fe i N u odnosu na kontrolne mahune. Statistički značajno povećanje N u odnosu na kontrolu zabilježeno je i u mahunama graha uzgojenog u supstratu NPK. Sadržaj Mg i P u mahunama nije se statistički značajno razlikovao među različitim supstratima.

U usporedbi sa zrnima kontrolnog graha, zrna graha uzgojenog uz dodatak troske bila su bogatija s Mg i N, a u zrnu graha uzgojenog uz dodatak 10 g troske zabilježen je i statistički značajno veći sadržaj P u odnosu na zrna kontrolnih biljaka. Sadržaj Na u zrnima graha

uzgojenog u supstratima NPK i NPKT bio je statistički značajno povećan u odnosu na druge tretmane. Zrna graha raslog u supstratu NPKT su pokazivala i značajno veći sadržaj N u odnosu na zrna kontrolnih biljaka. Sadržaj Mn, Fe i K u zrnima graha nije se znatno razlikovao među različitim supstratima.

**Tablica 13.** Sadržaj pojedinih makro- i mikroelemenata u listovima, mahunama i zrnu graha uzgajanog u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva NPK i Fe i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2
<b>list</b>					
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	35,00 a	38,57 a	35,03 a	36,78 a	35,78 a
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	78,43 c	155,88 a	95,05 bc	115,72 b	109,72 b
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	51,16 a	56,26 a	51,41 a	59,30 a	60,63 a
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	3,49 c	4,27 b	4,38 b	4,47 b	5,04 a
N (g kg <sup>-1</sup> )	21,28 c	29,67 a	29,52 a	25,68 b	23,21 c
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,96 c	2,00 c	2,05 c	2,93 a	2,61 b
K (g kg <sup>-1</sup> )	15,57 c	20,63 a	17,99 b	18,19 b	15,92 c
<b>mahunama</b>					
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	35,01 d	40,26 cd	44,25 bc	56,69 a	51,65 ab
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	37,59 c	44,86 bc	57,02 a	48,96 ab	53,14 a
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	108,63 c	133,22 bc	205,41 a	104,25 c	170,50 ab
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	3,55 a	3,79 a	3,85 a	3,69 a	3,53 a
N (g kg <sup>-1</sup> )	17,47 b	20,80 a	21,20 a	20,98 a	20,96 a
P (g kg <sup>-1</sup> )	4,31 a	4,21 a	4,72 a	4,59 a	4,33 a
K (g kg <sup>-1</sup> )	30,71 b	35,40 ab	33,21 ab	37,58 a	35,22 ab
<b>zrno</b>					
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	30,03 a	22,92 b	29,10 a	31,32 a	31,36 a
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	82,17 a	84,14 a	88,47 a	90,22 a	88,93 a
Na (mg kg <sup>-1</sup> )	4,36 b	5,14 a	5,23 a	4,02 b	4,12 b
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	1,90 b	1,64 c	1,94 b	2,19 a	2,11 a
N (g kg <sup>-1</sup> )	30,14 c	32,94 bc	38,63 a	37,17 a	35,93 ab
P (g kg <sup>-1</sup> )	5,41 b	5,49 b	5,77 ab	6,48 a	5,53 b
K (g kg <sup>-1</sup> )	18,51 a	18,29 a	19,19 a	20,40 a	19,77 a

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu četiri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

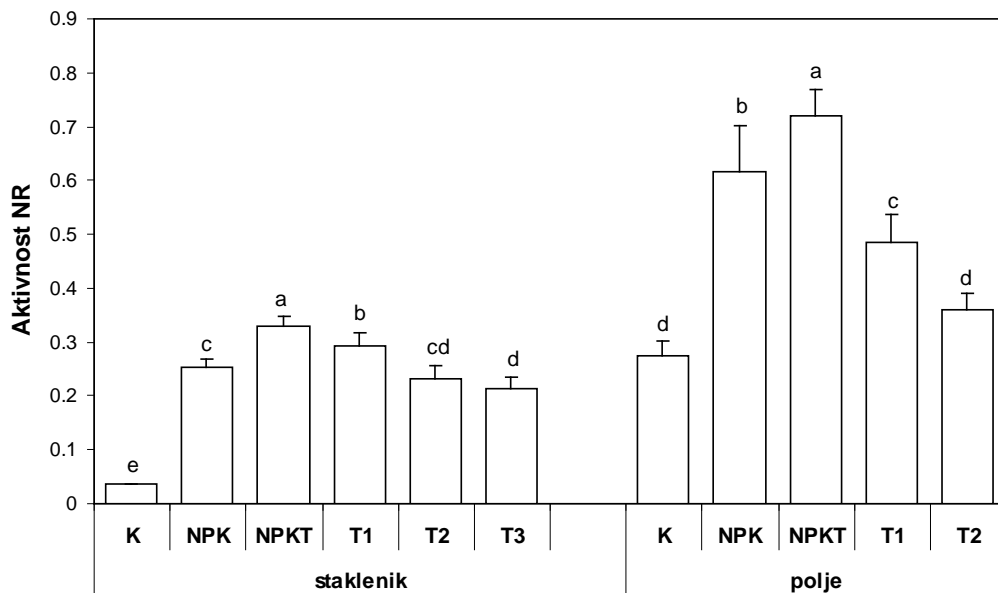
#### 4.2.5. Aktivnost nitrat reduktaze u listovima graha – staklenik i pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Na Slici 9. prikazana je aktivnost nitrat reduktaze (NR) u biljkama uzgojenim u stakleniku i na pokusnom polju koja je mjerena samo vegetacijske sezone 2012.g.

Aktivnost NR u biljkama uzgojenim u stakleniku u supstratima s dodatkom troske bila je između šest i osam puta veća u odnosu na aktivnost izmjerenu u kontrolnim biljkama s tim da je najbolja stimulacija aktivnosti tog enzima zabilježena u biljkama raslim uz dodatak 10 g troske, a s povećanjem količine troske ta se aktivnost smanjivala. Najveća aktivnost NR izmjerena je u listovima biljaka uzgojenim u supstratu NPKT (preko devet puta veća u odnosu na kontrolu), no sedam puta veća aktivnost tog enzima u odnosu na kontrolu zabilježena je i u listovima biljaka uzgojenih u supstratu NPK.

Aktivnost NR u biljkama uzgojenim na pokusnom polju u supstratu s dodatkom 10 g troske pokazala je porast od 73% dok je dodatak 20 g troske povećao aktivnost tog enzima za 31% u odnosu na kontrolu. Najveća aktivnost NR izmjerena je u listovima biljaka uzgojenim u supstratu NPKT, no dvostruko veća aktivnost tog enzima u odnosu na kontrolu zabilježena je i u listovima biljaka uzgojenih u supstratu NPK.



**Slika 9.** Aktivnost NR ( $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{sv.t}$ ) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u stakleniku ili na pokusnom polju u odgovarajućem supstratu (pijesak ili vrtna zemlja) bez dodatka umjetnog gnojiva i troske (K), supstratu s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), supstratu s dodatkom 20 g troske i NPK (NPKT) te supstratima s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g troske/kg supstrata. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

### 4.3. Funkcionalnost fotosintetskog aparata

#### 4.3.1. Fotosinteza – metoda izmjene plinova - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

U Tablici 14. prikazani su parametri fotosintetske aktivnosti izmjerene metodom izmjene plinova u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratu (kvarcni pijesak i/ili dodaci troske ili NPK). Prosječne vrijednosti intenziteta svjetlosti zabilježene pri mjerenjima fotosinteze na listovima biljaka uzgojenih u različitim supstratima bile su slične. Unutarstanična koncentracija CO<sub>2</sub> u listovima graha uzgojenim u supstratima T2 i NPK bila je statistički značajno povećana u odnosu na listove kontrolnih biljaka i biljaka uzgojenih u supstratu T3. Stopa transpiracije u listovima graha uzgojenim u supstratu T1, a posebice u supstratima NPK i T2 bila je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu (porast od 34 do 77%), dok su vrijednosti tog parametra u listovima graha uzgojenim u supstratu T3 bile slične vrijednostima zabilježenim u listovima kontrolnih biljaka. Provodljivost puči u listovima graha uzgojenim u supstratu s dodatkom 20 g troske bila je više nego dvostruko povećana u odnosu na kontrolu te za 35% veća u odnosu na pozitivnu kontrolu (NPK + Fe). Vrijednosti tog parametra u listovima graha uzgojenog u supstratima T1 i T3 bile su slične vrijednostima zabilježenim u listovima kontrolnih biljaka. Intenzitet fotosinteze u listovima graha uzgojenim u supstratima T1 i T2 bio je statistički značajno povećan u odnosu na kontrolu (porast između 40 i 50%) no ne i u odnosu na biljke uzgojene u supstratu NPK.

**Tablica 14.** Parametri fotosintetske aktivnosti (PAR – fotosintetski aktivno zračenje,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; koncentracija CO<sub>2</sub>, T – stopa transpiracije; gs – provodljivost puči, FS – intenzitet fotosinteze) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
<b>PAR</b>	110	128	124	120	109
<b>CO<sub>2</sub></b>	207 (20,3) b	253 (10,9) a	235 (27,0) ab	268 (23,9) a	209 (12,9) b
<b>T</b>	0,99 (0,04) c	1,66 (0,21) a	1,33 (0,08) b	1,76 (0,18) a	0,98 (0,01) c
<b>gs</b>	0,07 (0,006) cd	0,13 (0,02) b	0,11 (0,02) bc	0,17 (0,02) a	0,07 (0,00) d
<b>FS</b>	7,23 (0,55) b	8,11 (0,35) ab	8,61 (0,63) a	9,3 (1,03) a	7,04 (0,54) b

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je (vrijednost u zagradi) za sve parametre izuzev za PAR. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).



*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Prosječne vrijednosti intenziteta svjetlosti zabilježene pri mjerenjima fotosinteze na listovima biljaka uzgojenih u različitim supstratima bile su slične (Tablica 15).

Unutarstanična koncentracija CO<sub>2</sub> u listovima graha uzgojenim u supstratu T3 bila je statistički značajno smanjena u odnosu na listove biljaka uzgojenih u ostalim supstratima (smanjenje od 27% u odnosu na kontrolu).

Stopa transpiracije i provodljivost puči u listovima graha uzgojenim u supstratima T1 i T3 bile su statistički značajno smanjene u odnosu na listove biljaka uzgojenih u ostalim supstratima.

Intenzitet fotosinteze u listovima graha uzgojenim u supstratu T2 bio je lagano povećan a u listovima graha uzgojenim u supstratu T3 statistički značajno smanjen u odnosu na vrijednosti tog parametra izmjerenog u listovima kontrolnih biljaka.

**Tablica 15.** Parametri fotosintetske aktivnosti (PAR – fotosintetski aktivno zračenje,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; koncentracija CO<sub>2</sub>, T – stopa transpiracije; gs – provodljivost puči, FS – intenzitet fotosinteze) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
<b>PAR</b>	1362	1370	1279	1390	1257
<b>CO<sub>2</sub></b>	236 (3,2) a	233 (26,7) a	210 (9,6) a	234 (12,5) a	172 (14,5) b
<b>T</b>	1,43 (0,018) a	1,75 (0,22) a	0,94 (0,15) b	1,58 (0,28) a	0,78 (0,11) b
<b>gs</b>	0,04 (0,003) a	0,05 (0,008) a	0,03 (0,005) b	0,05 (0,008) a	0,03 (0,004) b
<b>FS</b>	3,61 (0,10) ab	3,98 (0,41) ab	3,33 (0,13) b	4,11 (0,37) a	2,57 (0,33) c

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija (vrijednost u zagradi) prikazana je za sve parametre izuzev za PAR. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

*Vegetacijska sezona 2012.g*

Prosječne vrijednosti intenziteta svjetlosti zabilježene pri mjerenjima fotosinteze na listovima biljaka uzgojenih u supstratima K, NPKT i T1 bile su slične, a nešto veće u listovima biljaka raslih u supstratima T2 i T3 te posebice NPK gdje je zabilježen 25% veći intenzitet svjetlosti nego u kontrolnim biljkama (Tablica 16).

Unutarstanična koncentracija CO<sub>2</sub> u listovima graha uzgojenog u supstratu NPK bila je statistički značajno smanjena u odnosu na listove biljaka uzgojenih u supstratu T1, dok se vrijednosti tog parametra među listovima biljaka uzgojenih u ostalim supstratima nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

U usporedbi s kontrolom, stopa transpiracije i provodljivost puči povećavala se u nizu: T3-T1-T2-NPK-NPKT.

Intenzitet fotosinteze u listovima graha uzgojenim u supstratima NPK, NPKT i T1 bio je dva i pol puta veći, a u listovima graha uzgojenog u supstratu T2 oko dva puta veći u odnosu na vrijednosti tog parametra izmjerenog u listovima kontrolnih biljaka. Vrijednosti tog parametra izmjerenog u listovima graha uzgojenog u supstratu T3 bile su slične kontrolnim.

**Tablica 16.** Parametri fotosintetske aktivnosti (PAR – fotosintetski aktivno zračenje,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; koncentracija CO<sub>2</sub>, T – stopa transpiracije; gs – provodljivost puči, FS – intenzitet fotosinteze) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2	T3
<b>PAR</b>	1247	1568	1339	1231	1495	1438
<b>CO<sub>2</sub></b>	311 (1,2) ab	285 (3,47) b	291 (2,31) ab	349 (35,2) a	303 (0,58) ab	306 (4,04) ab
<b>T</b>	1,88 (0,00) f	4,80 (0,04) b	5,31 (0,02) a	3,42 (0,00) d	4,04 (0,06) b	2,50 (0,35) e
<b>gs</b>	0,05 (0,001) f	0,13 (0,001) b	0,15 (0,001) a	0,10 (0,001) d	0,12 (0,00) c	0,06 (0,01) e
<b>FS</b>	2,50 (0,31) c	6,13 (0,10) a	6,68 (0,13) a	6,57 (0,18) a	5,08 (0,41) b	2,65 (0,33) c

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija (vrijednost u zagradi) prikazana je za sve parametre izuzev za PAR. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3.2. Fotosinteza – metoda izmjene plinova – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

U Tablici 17. prikazani su parametri fotosintetske aktivnosti izmjerene metodom izmjene plinova u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratu (vrtna zemlja s ili bez dodatka troske). Prosječne vrijednosti intenziteta svjetlosti zabilježene pri mjerenjima fotosinteze na listovima kontrolnih biljaka i biljaka uzgojenih s dodatkom troske bile su slične.

Vrijednosti unutarstanične koncentracije CO<sub>2</sub> u listovima kontrolnih biljaka i biljaka uzgojenih s dodatkom troske nisu se statistički značajno razlikovale.

S druge strane, vrijednosti stope transpiracije, provodljivosti puči te intenziteta fotosinteze bile su statistički značajno veće u listovima biljaka uzgojenih s dodatkom troske u odnosu na vrijednosti tih parametra izmjerenih u listovima kontrolnih biljaka (porast između 16 i 25% u odnosu na kontrolu).

**Tablica 17.** Parametri fotosintetske aktivnosti (PAR - fotosintetski aktivno zračenje,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; koncentracija CO<sub>2</sub>, T - stopa transpiracije; gs - provodljivost puči, FS - intenzitet fotosinteze) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1) g EAF troske ili bez njenog dodatka (K, kontrola).

oznaka	K	T1
PAR	1411	1400
CO <sub>2</sub>	285 (21,3) a	313 (17,3) a
T	8,32 (0,91) a	9,87 (0,57) a
gs	0,25 (0,04) b	0,29 (0,03) a
FS	8,62 (0,94) b	10,71 (1,03) a

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Standardna devijacija (vrijednost u zagradi) prikazana je za sve parametre izuzev za PAR. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Prosječne vrijednosti intenziteta svjetlosti zabilježene pri mjerenjima fotosinteze na listovima biljaka uzgojenim u supstratima K, NPK i T1 bile su slične (Tablica 18).

Vrijednosti unutarstanične koncentracije CO<sub>2</sub> kao i stope transpiracije u listovima biljaka uzgojenih u različitim supstratima nisu se međusobno statistički značajno razlikovale. Srednje vrijednosti provodljivosti puči bile su značajno veće u listovima graha uzgojenog u supstratu NPKT u odnosu na kontrolu i tretman NPK (porast od 19% u odnosu na kontrolu).

Intenzitet fotosinteze u listovima graha uzgojenog u supstratu NPKT bio je 72% veći, a u listovima graha uzgojenog u supstratima s dodatkom troske 29 do 40% veći u odnosu na vrijednosti tog parametra izmjenjenog u listovima kontrolnih biljaka. Vrijednosti tog parametra izmjenjenog u listovima graha uzgojenog u supstratu NPK bile su 20% veće u odnosu na kontrolu, ali taj porast nije bio statistički značajan.

**Tablica 18.** Parametri fotosintetske aktivnosti (PAR – fotosintetski aktivno zračenje,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; koncentracija CO<sub>2</sub>, T – stopa transpiracije; gs – provodljivost puči, FS – intenzitet fotosinteze) u listovima graha uzgajano osam tjedana u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2
<b>PAR</b>	1201	1393	1359	1302	1379
<b>CO<sub>2</sub></b>	239 (13,38) a	255 (11,68) a	271 (6,50) a	262 (23,13) a	249 (24,0) a
<b>T</b>	8,05 (0,30) a	8,06 (0,14) a	8,73 (0,63) a	8,06 (0,77) a	8,28 (0,54) a
<b>gs</b>	0,27 (0,026) b	0,27 (0,013) b	0,32 (0,014) a	0,29 (0,021) ab	0,28 (0,011) ab
<b>FS</b>	11,43 (1,66) c	13,77 (0,95) bc	19,68 (1,75) a	16,05 (1,49) b	14,71 (1,49) b

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu devet replika. Standardna devijacija (vrijednost u zagradi) prikazana je za sve parametre izuzev za PAR. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

### 4.3.3. Fluorescencija klorofila *a* – metoda saturacijskog pulsa - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

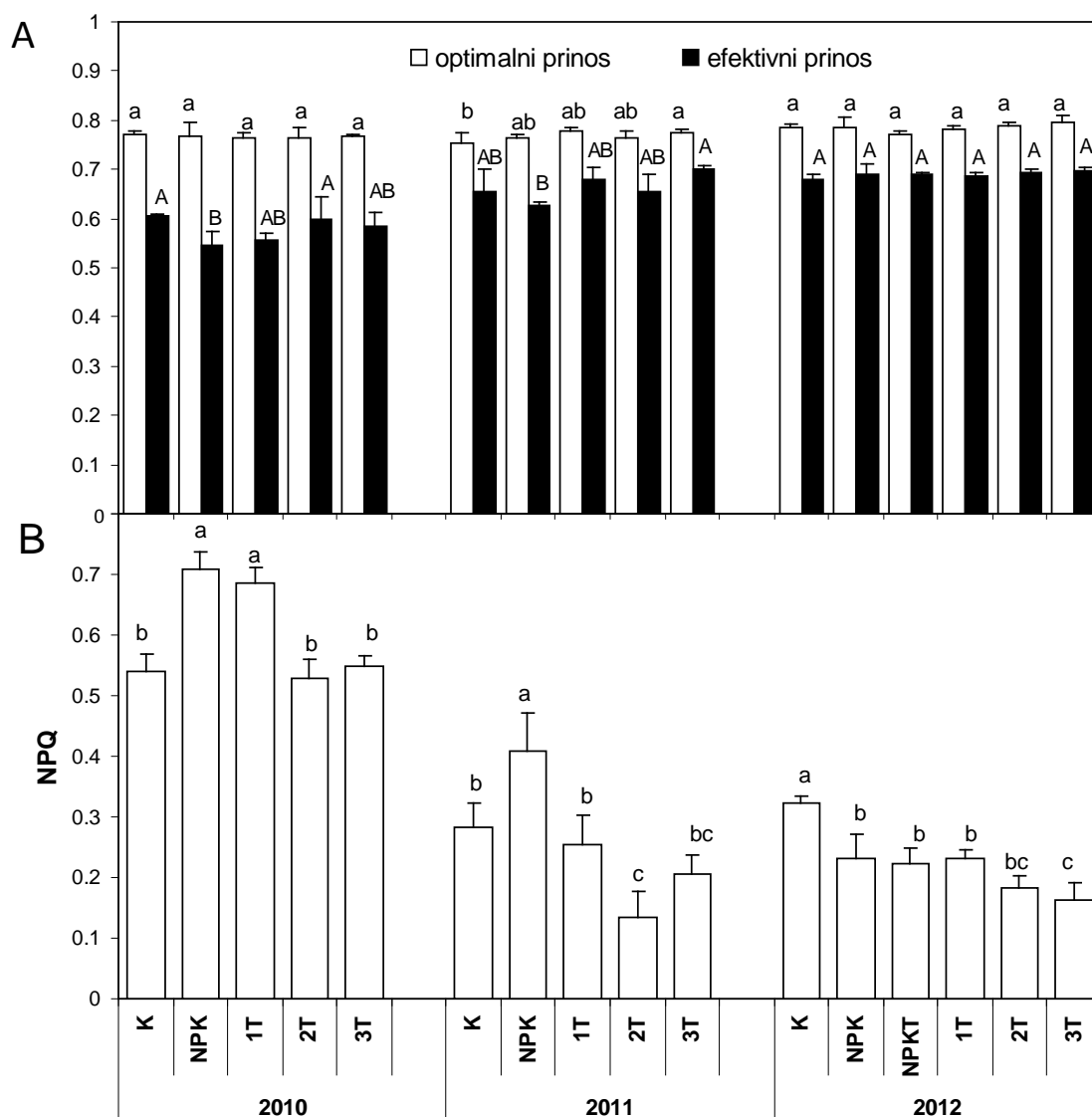
Vrijednosti optimalnog prinosa fotosustava II (PS II) u biljkama uzgojenim u supstratima s dodatkom troske bile su slične vrijednostima tog parametra u biljkama raslim u supstratu s ili bez dodatka gnojiva (Slika 10A). Efektivni prinos PSII u biljkama uzgojenim u supstratima uz dodatak troske nije se statistički značajno razlikovao od kontrole. U usporedbi s biljkama uzgojenim u supstratu s NPK, biljke uzgojene u supstratu T2 pokazale su statistički značajno povećanje efektivnog prinosa fotosustava II (Slika 10A). Nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) u biljkama uzgajanim u supstratima NPK i T1 bilo je statistički značajno povećano (porast od približno 30%) u odnosu na kontrolne biljke i biljke rasle u supstratima s 20 i 40 g troske (Slika 10B).

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Optimalni prinos PS II u listovima graha uzgojenog u supstratu T3 bio je statistički značajno povećan u odnosu na listove kontrolne biljke, no nije se znatno razlikovao od vrijednosti za taj parametar izmjeren u listovima biljaka raslih u drugim supstratima (Slika 10A). Efektivni prinos PSII u biljkama uzgojenim u supstratu T3 bio je statistički značajno povećan u odnosu na listove graha uzgojenog u supstratu NPK, no nije se statistički značajno razlikovao od vrijednosti za taj parametar izmjeren u listovima biljaka raslih u drugim supstratima (Slika 10A). Nefotokemijsko gašenje fluorescencije u biljkama uzgajanim u supstratu NPK bilo je statistički značajno povećano u odnosu na biljke rasle u ostalim supstratima (Slika 10B). Vrijednosti tog parametra u listovima biljaka uzgojenih uz dodatak troske se ili nisu statistički značajno razlikovale (u slučaju supstrata T1) ili su bile lagano smanjene (u slučaju supstrata T3) ili statistički značajno smanjene (u slučaju supstrata T2) u odnosu na vrijednosti izmjerene u listovima kontrolnih biljaka.

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Vrijednosti optimalnog i efektivnog prinosa PS II u listovima graha uzgojenog u različitim supstratima nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (Slika 10A). U usporedbi s vrijednostima izmjerenim u listovima kontrolnih biljaka, nefotokemijsko gašenje fluorescencije u biljkama uzgajanim u ostalim supstratima bilo je statistički značajno smanjeno posebice u listovima biljaka raslih u supstratu T3 (Slika 10B).



**Slika 10.** Optimalni i efektivni prinos PSII (A) i nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) (B) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u: supstratu (pijesak) bez dodatka umjetnog gnojiva i troske (kontrola, K), supstratu s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (pozitivna kontrola, NPK), supstratu s dodatkom 20 g troske (T2) i NPK (NPKT) te supstratima s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g troske/kg supstrata. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu tri replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

#### 4.3.4. Fluorescencija klorofila *a* – metoda saturacijskog pulsa - polje

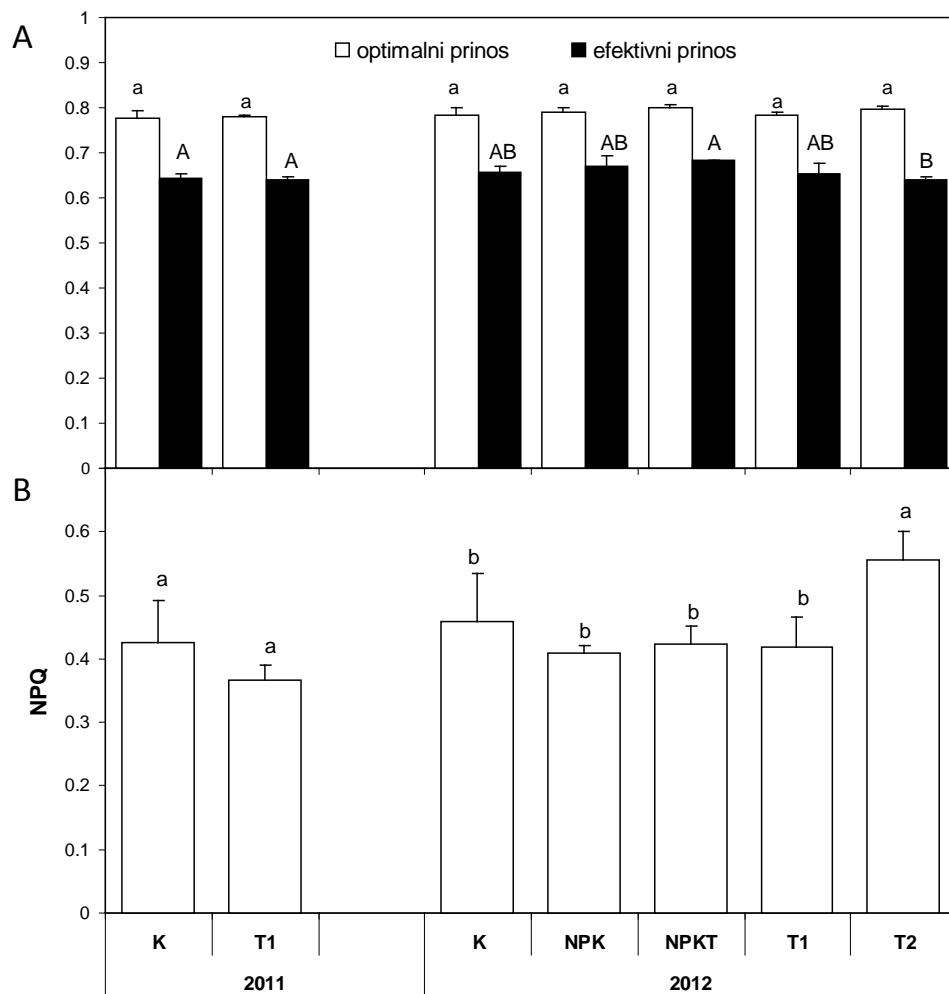
*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Vrijednosti optimalnog i efektivnog prinosa PS II te nefotokemijskog gašenja fluorescencije u listovima graha uzgojenog u kontrolnom supstratu i supstratu s dodatkom troske nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (Slika 11A, B).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Vrijednosti optimalnog PS II u listovima graha uzgojenog u različitim supstratima nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (Slika 11A). Efektivni prinos PS II u biljkama uzgajanim u supstratu T2 bio je statistički značajno smanjen u usporedbi s vrijednostima izmjerenim u listovima biljaka uzgojenih u supstratu NPKT, ali ne i u odnosu na vrijednosti izmjerene u listovima kontrolnih biljaka.

Nefotokemijsko gašenje fluorescencije u biljkama uzgajanim u supstratu T2 bilo je statistički značajno povećano u usporedbi s vrijednostima izmjerenim u listovima biljaka uzgojenih u ostalim supstratima (Slika 11B).



**Slika 11.** Optimalni i efektivni prinos PSII (A) i nefotokemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) (B) u listovima graha uzgajanog osam tjedana na pokusnim poljima: 2011. g. - bez dodatka troske (kontrola, K) ili s dodatkom 10 g troske (T1); 2012. g. - bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT), s dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g troske. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu tri replike. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.



#### 4.3.5. Fluorescencija klorofila *a* – polifazni rast i OJIP test – staklenik

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

U Tablici 19. prikazani su podaci dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u listovima graha uzgajanog tijekom osam tjedana u pijesku s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK.

Srednje vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII ( $F_v/F_m = TR_0/ABS$ ) u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT bile su statistički značajno povećane u odnosu na vrijednosti tog parametra u listovima biljaka raslih u supstratu T3 ali ne i u odnosu na listove biljaka raslih u drugim supstratima. Vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ), omjera hvatanja ekscitona i disipacije energije ( $TR_0/DI_0$ ) te omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila ( $RC/ABS$ ) bile su značajno povećane u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT u odnosu na vrijednosti tog parametra izmjerenog u listovima biljaka uzgojenih u drugim supstratima. Dodatak troske nije znatno utjecao na vrijednosti transporta elektrona dalje od primarnog akceptora QA ( $ET_0/(TR_0-ET_0)$ ) u odnosu na kontrolu dok su vrijednosti tog parametra u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT bile značajno povećane u odnosu na kontrolu. Dodatak 40 g troske u supstrat izazvao je povećanje vrijednosti apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu ( $ABS/RC$ ), disipacije po aktivnom reakcijskom središtu ( $DI_0/RC$ ) i hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu ( $TR_0/RC$ ), dodatak nižih količina troske nije statistički značajno utjecao na vrijednosti tih parametara dok je dodatak NPK i kombinacije NPK i troske izazvao statistički značajno smanjenje vrijednosti tih parametara u odnosu na kontrolu. Vrijednosti transporta elektrona po aktivnom reakcijskom središtu ( $ET_0/RC$ ) bile su značajno veće u listovima biljaka raslih uz dodatak 20 i 40 g troske u usporedbi s kontrolom, no ne i u usporedbi s ostalim tretmanima.

Dodatak nižih količina troske kao i NPK u supstrat nije znatno utjecao na gustoću aktivnih reakcijskih središta ( $RC/CS_0$ ), dodatak 40 g troske u supstrat izazvao je smanjenje tog parametra, a dodatak kombinacije NPK i troske izazvao je statistički značajno povećanje tog parametra u odnosu na kontrolne listove.

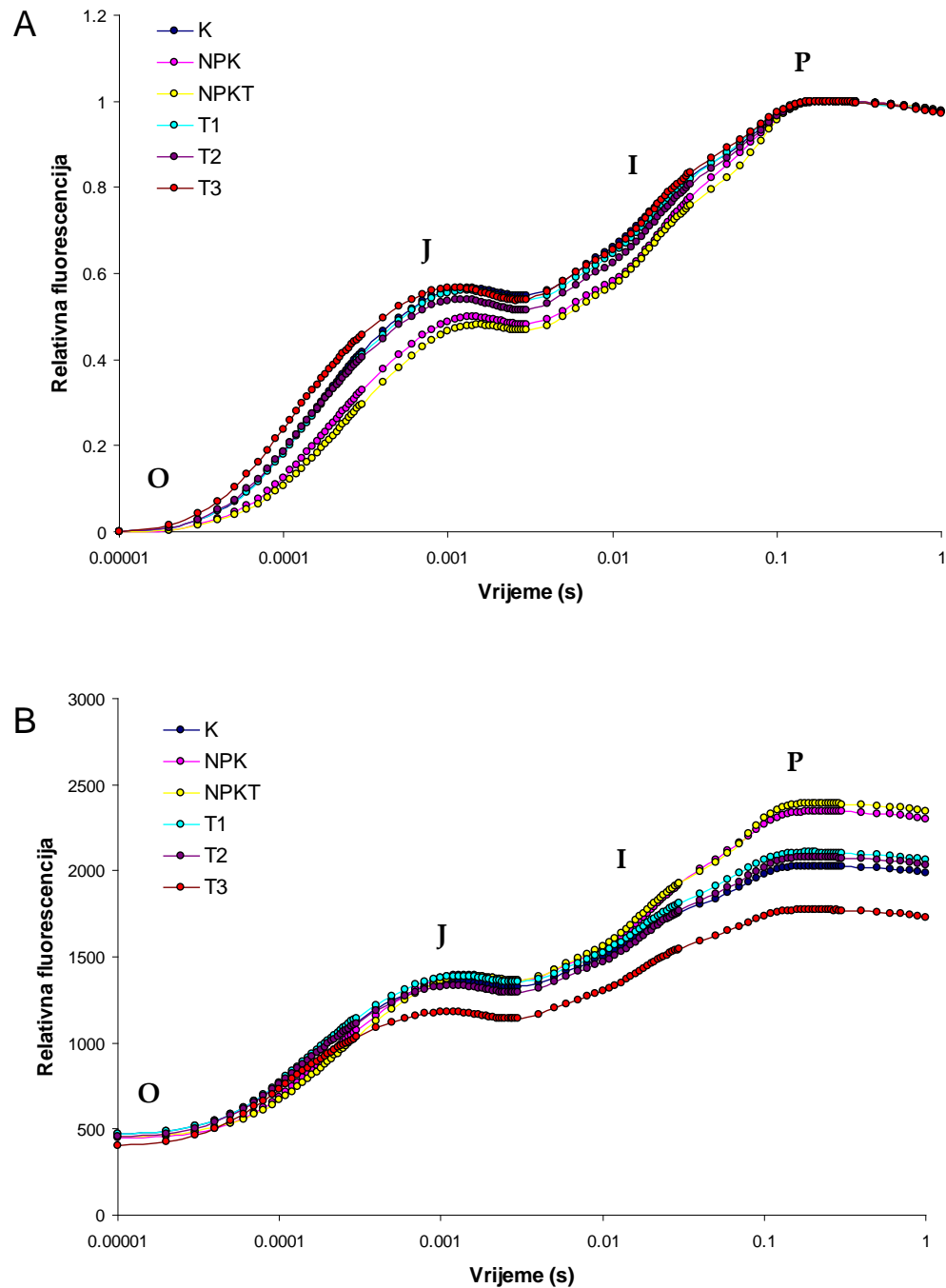
**Tablica 19.** Pokazatelji fluorescencije klorofila *a* mjerene polifaznim rastom u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratima (pijesak) s: dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske i gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2	T3
V <sub>j</sub>	0,569 a (0,044)	0,506 bc (0,013)	0,490 c (0,014)	0,559 ab (0,035)	0,550 ab (0,055)	0,532 abc (0,018)
V <sub>i</sub>	0,833 ab (0,053)	0,774 c (0,006)	0,766 c (0,021)	0,824 ab (0,005)	0,836 a (0,019)	0,810 b (0,022)
TR <sub>0</sub> /ABS	0,786 ab (0,018)	0,833 a (0,009)	0,830 a (0,006)	0,794 ab (0,020)	0,793 ab (0,012)	0,764 b (0,059)
PI <sub>ABS</sub>	0,744 b (0,104)	1,488 a (0,141)	1,642 a (0,083)	0,800 b (0,006)	0,865 b (0,113)	0,707 b (0,136)
TR <sub>0</sub> /DI <sub>0</sub>	3,706 b (0,387)	5,015 a (0,338)	4,895 a (0,191)	3,882 b (0,485)	3,855 b (0,292)	3,574 b (0,528)
ET <sub>0</sub> /(TR <sub>0</sub> -ET <sub>0</sub> )	0,766 c (0,143)	0,979 ab (0,054)	1,043 a (0,059)	0,793 c (0,111)	0,880 bc (0,061)	0,864 bc (0,114)
RC/ABS	0,259 b (0,017)	0,303 a (0,018)	0,322 a (0,007)	0,260 b (0,014)	0,253 b (0,015)	0,235 b (0,007)
ABS/RC	3,871 b (0,259)	3,308 c (0,191)	3,105 c (0,063)	3,845 b (0,204)	3,955 b (0,222)	4,601 a (0,063)
TR <sub>0</sub> /RC	3,041 b (0,155)	2,757 c (0,164)	2,578 c (0,070)	3,050 b (0,090)	3,137 b (0,133)	3,459 a (0,070)
ET <sub>0</sub> /RC	1,310 c (0,140)	1,363 bc (0,090)	1,315 bc (0,041)	1,345 bc (0,132)	1,466 ab (0,071)	1,556 a (0,048)
DI <sub>0</sub> /RC	0,830 b (0,119)	0,551 c (0,041)	0,527 c (0,008)	0,797 b (0,119)	0,819 b (0,092)	1,117 a (0,197)
RC/CS <sub>0</sub>	112,6 b (16,84)	118,7 ab (14,39)	130,8 a (7,17)	112,7 b (7,42)	112,2 b (13,56)	94,6 c (8,34)

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu 12 replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

Na Slici 12. prikazane su krivulje intenziteta fluorescencije (OJIP krivulje) na logaritamskoj vremenskoj skali prema podacima mjerenja fluorescencije klorofila *a* u listovima biljaka nakon osam tjedana rasta u pijesku s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK. Slika 12A prikazuje normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila iz kojega je vidljiv značajan pad intenziteta fluorescencije u koracima J i I (intenzitet fluorescencije nakon 30 ms) u listovima biljaka uzgojenim u supstratima NPK i NPKT u odnosu na ostale tretmane.

Odstupanje od tipičnog oblika krivulje u tretmanima NPK, NPKT i T3 vidljivo je i na Slici 12B na kojoj je prikazan porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije.



**Slika 12.** Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* (A) i porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije (B) izmjeren u listovima graha uzgajanog osam tjedana u pijesku bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT) te s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T2) g troske.

#### 4.3.6. Fluorescencija klorofila *a* – polifazni rast i OJIP test – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

U Tablici 20. prikazani su podaci dobiveni mjerenjem polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* u listovima graha uzgajanog tijekom osam tjedana u vrtnoj zemlji s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK.

Srednje vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII ( $F_v/F_m = TR_0/ABS$ ) u listovima biljaka uzgojenih uz dodatak troske i/ili NPK nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na kontrolu. Za indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) utvrđena je statistički značajna promjena jedino između vrijednosti tog parametra izmjenjenog u listovima biljaka uzgojenih u supstratima T1 i T2. Vrijednosti omjera hvatanja ekscitona i disipacije energije ( $TR_0/DI_0$ ) te transporta elektrona dalje od primarnog akceptora QA ( $ET_0/(TR_0-ET_0)$ ) bile su slične u listovima svih biljaka, neovisno o supstratu.

Dodatak 20 g troske u supstrat izazvao je smanjenje omjera koncentracije klorofila reakcijskih središta i koncentracije antena klorofila ( $RC/ABS$ ). Srednje vrijednosti apsorpcije po aktivnom reakcijskom središtu ( $ABS/RC$ ), disipacije po aktivnom reakcijskom središtu ( $DI_0/RC$ ), hvatanja ekscitona po aktivnom reakcijskom središtu ( $TR_0/RC$ ) i transporta elektrona po aktivnom reakcijskom središtu ( $ET_0/RC$ ) bile su značajno veće u listovima biljaka raslih uz dodatak 20 g troske u usporedbi s kontrolom i ostalim tretmanima (porast između 9 i 15% u odnosu na kontrolu).

Dodatak 20 g troske u supstrat nije statistički značajno utjecao na gustoću aktivnih reakcijskih središta ( $RC/CS_0$ ) u odnosu na kontrolne listove no bio je značajno niži u odnosu na listove biljaka raslih u supstratu NPKT.

**Tablica 20.** Pokazatelji fluorescencije klorofila *a* mjerene polifaznim rastom u listovima graha nakon osam tjedana rasta u supstratima (vrtna zemlja) s: dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK), tekućeg gnojiva i 20 g troske (NPKT) ili bez dodatka troske i gnojiva (K, kontrola).

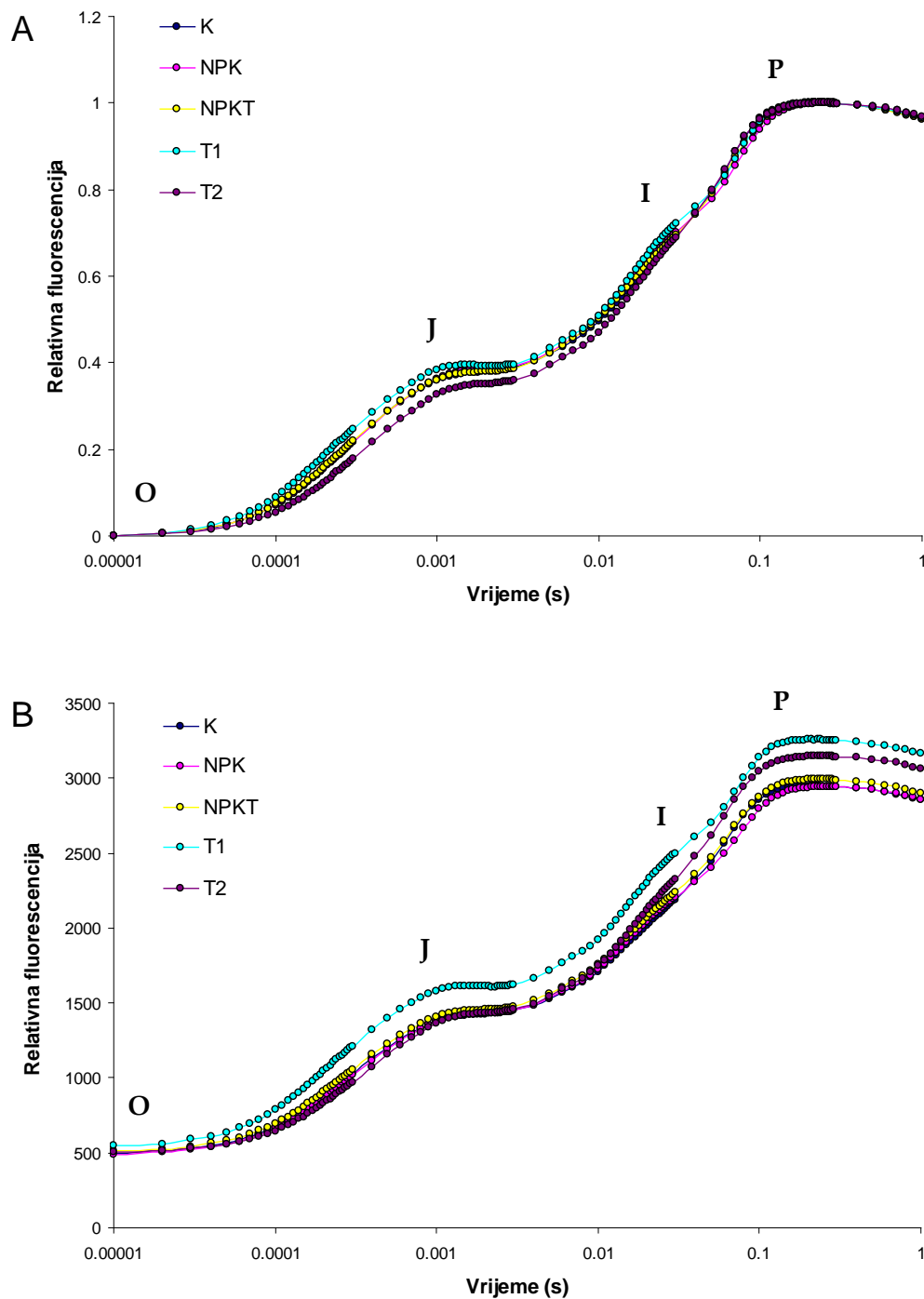
oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2
Vj	0,391 (0,050) a	0,379 (0,029) a	0,404 (0,025) a	0,380 (0,023) a	0,388 (0,041) a
Vi	0,695 (0,030) a	0,699 (0,040) a	0,724 (0,034) a	0,700 (0,029) a	0,698 (0,035) a
TR <sub>0</sub> /ABS	0,846 (0,010) a	0,848 (0,008) a	0,843 (0,009) a	0,848 (0,006) a	0,843 (0,011) a
PI <sub>ABS</sub>	3,146 (0,685) ab	3,269 (0,628) ab	3,080 (0,671) ab	3,492 (0,660) a	2,785 (0,772) b
TR <sub>0</sub> /DI <sub>0</sub>	5,527 (0,393) a	5,613 (0,315) a	5,399 (0,209) a	5,588 (0,263) a	5,393 (0,433) a
ET <sub>0</sub> /(TR <sub>0</sub> -ET <sub>0</sub> )	1,598 (0,317) a	1,572 (0,146) a	1,584 (0,266) a	1,729 (0,173) a	1,577 (0,253) a
RC/ABS	0,355 (0,018) a	0,368 (0,029) a	0,356 (0,023) a	0,359 (0,044) a	0,323 (0,025) b
ABS/RC	2,824 (0,143) a	2,734 (0,220) a	2,816 (0,172) a	2,843 (0,273) a	3,133 (0,285) b
TR <sub>0</sub> /RC	2,389 (0,115) a	2,319 (0,168) a	2,375 (0,140) a	2,413 (0,258) a	2,637 (0,227) b
ET <sub>0</sub> /RC	1,456 (0,175) a	1,410 (0,151) a	1,449 (0,124) a	1,488 (0,118) a	1,585 (0,165) b
DI <sub>0</sub> /RC	0,435 (0,040) a	0,416 (0,049) a	0,442 (0,046) a	0,436 (0,064) a	0,498 (0,078) b
RC/CS <sub>0</sub>	160,6 (13,11) ab	164,0 (13,07) a	166,7 (8,49) a	160,9 (17,63) ab	150,4 (17,62) b

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu 12 replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

Na Slici 13. prikazane su krivulje intenziteta fluorescencije (OJIP krivulje) na logaritamskoj vremenskoj skali prema podacima mjerenja fluorescencije klorofila *a* u listovima biljaka nakon osam tjedana rasta u vrtnoj zemlji s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK.

Slika 13A prikazuje normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila iz kojega je vidljiv blagi porast intenziteta fluorescencije u koraku J (intenzitet fluorescencije nakon 2 ms) u listovima biljaka uzgojenih u supstratu T1 te blagi pad intenziteta fluorescencije u koraku J u listovima biljaka uzgojenih u supstratu T2 u odnosu na kontrolu, te NPK i NPKT tretmane no te promjene nisu bile statistički značajne, a krivulja je pri svim tretmanima zadržala tipičan oblik.

Odstupanje od tipičnog oblika krivulje u tretmanima T1 i djelomice T2 vidljivo je i na Slici 13B na kojoj je prikazan porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije.



**Slika 13.** Normalizirani OJIP porast fluorescencije klorofila *a* (A) i porast fluorescencije klorofila *a* bez normalizacije (B) izmjeren u listovima graha uzgajanog osam tjedana na pokusnom polju bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT) te s dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g troske.

#### 4.3.7. Sadržaj klorofila i karotenoida – staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

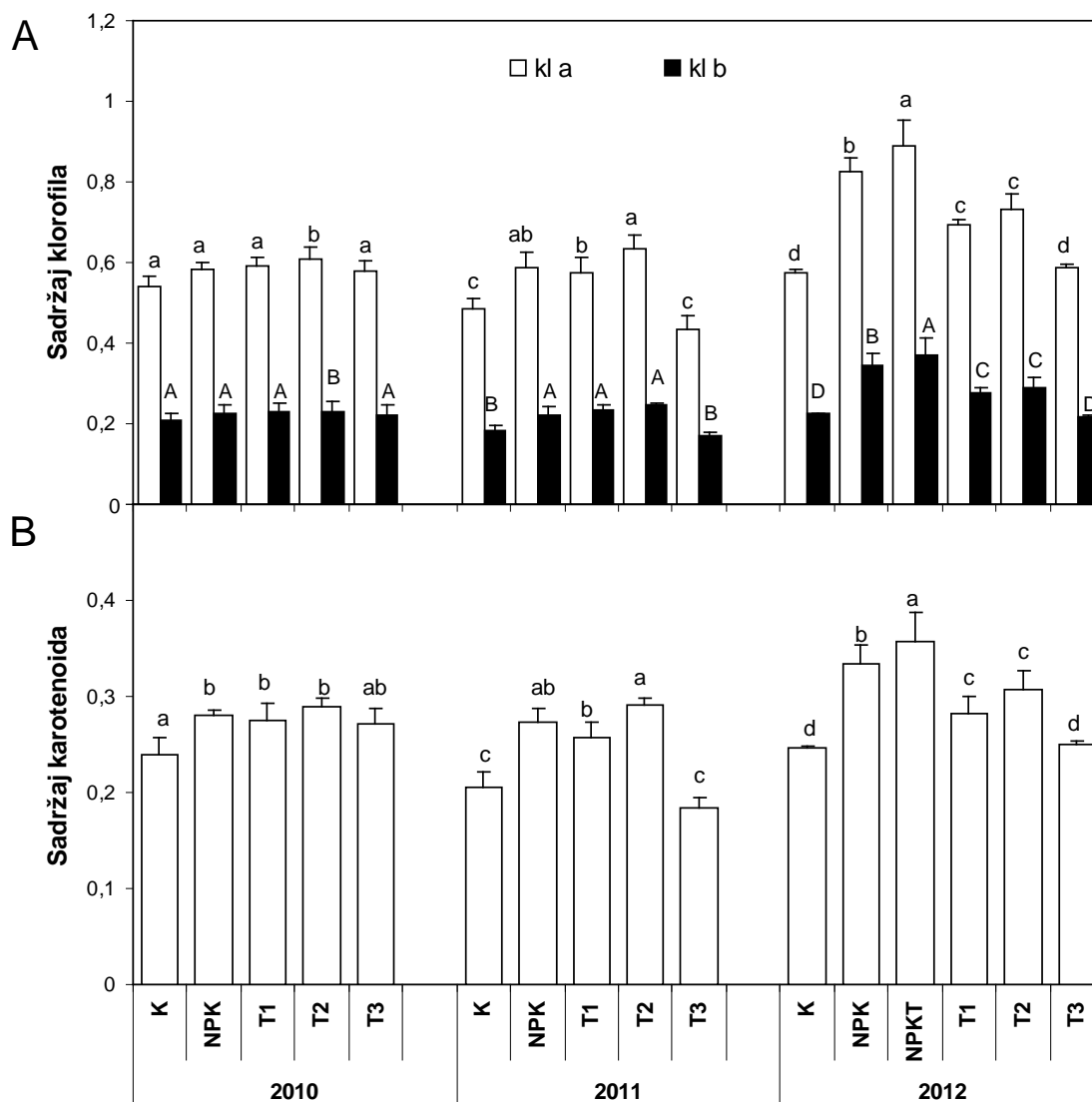
Sadržaj klorofila *a* (kl *a*) i *b* (kl *b*) u listovima biljaka uzgajanih u supstratu T2 statistički značajno se povećao u odnosu na kontrolu, ali se nije statistički značajno razlikovao u odnosu na vrijednosti izmjerene u ostalim supstratima uključujući i supstrat NPK (Slika 14A). Statistički značajno povećanje sadržaja ukupnih karotenoida bilo je vidljivo u biljaka uzgajanih u supstratima T1, T2 i NPK (porast od 17 do 21%) u odnosu na kontrolu, dok se vrijednost tog parametra u biljkama uzgojenim u supstratu T3 nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu (Slika 12B).

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Najveći sadržaj kl *a*, kl *b* i karotenoida (Slika 14A, B) zabilježen je u listovima biljaka uzgojenih u supstratu T2 (porast između 31 i 42% u odnosu na kontrolu). Sadržaj mjenjenih pigmentata u listovima biljaka uzgajanih u supstratima T1 i NPK također je bio statistički značajno povećan (u rasponu od 19 do 34%) u odnosu na kontrolu (Slika 14A, B). U odnosu na kontrolu, najveći dodatak troske u supstrat (supstrat T3) nije statistički značajno utjecao na sadržaj kl *a*, kl *b* i karotenoida (Slika 14A, B) u listovima graha.

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Najveći sadržaj kl *a*, kl *b* i karotenoida (Slika 14A, B) zabilježen je u listovima biljaka uzgojenih u supstratu NPKT, no znatno veći sadržaj tih fotosintetskih pigmentata u odnosu na kontrolu i supstrate s troskom izmjeren je i u listovima biljaka uzgojenih uz dodatak tekućeg gnojiva (supstrat NPK). U listovima biljaka uzgajanih u supstratu T2 izmjeren je oko 30% veći sadržaj kl *a* i *b* te oko 25% veći sadržaj ukupnih karotenoida u odnosu na vrijednosti tih pigmentata u listovima kontrolnih biljaka (Slika 14A, B). U listovima biljaka uzgojenih u supstratima T1 vrijednosti kl *a* i *b* bile su za 20% veće nego u kontroli dok su vrijednosti karotenoida bile slične kontrolnim vrijednostima. U listovima biljaka uzgojenih u supstratu T3 vrijednosti kl *a* i *b* te karotenoida bile su slične vrijednostima tih pigmentata zabilježenim u listovima kontrolnih biljaka (Slika 14A, B).



**Slika 14.** Sadržaj klorofila *a* (kl a) i *b* (kl b) ( $\text{mg g}^{-1}$  sv.t.) (A) i ukupnih karotenoida ( $\text{mg g}^{-1}$  sv.t.) (B) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u: supstratu (pijesak) bez dodatka umjetnog gnojiva i troske (kontrola, K), supstratu s dodatkom tekućeg gnojiva NPK i Fe (pozitivna kontrola, NPK), supstratu s dodatkom 20 g troske (T2) i NPK (NPKT) te supstratima s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g troske/kg supstrata. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.



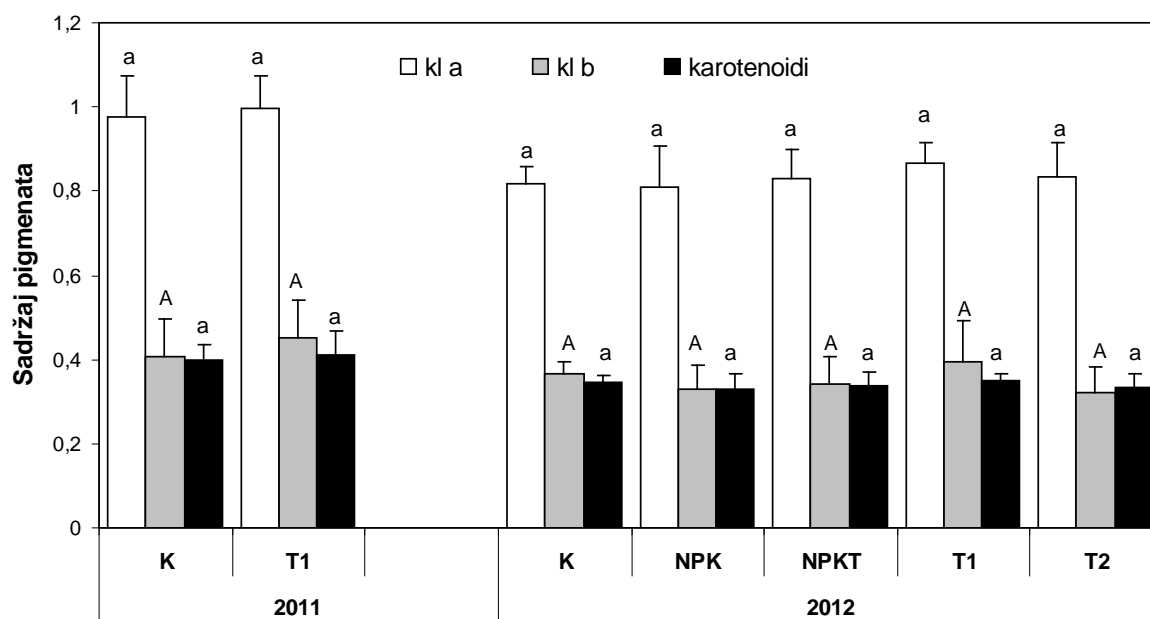
## 4.3.8. Sadržaj klorofila i karotenoida – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Na Slici 15. prikazan je sadržaj kl a, kl b i karotenoida u listovima graha uzgajanog tijekom osam tjedana u vrtnoj zemlji s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK. Vidljivo je da dodatak troske u vrtu zemlju nije statistički značajno utjecao na sadržaje mjerenih fotosintetskih pigmenata u usporedbi s vrijednostima tih pigmenata izmjerenim u listovima kontrolnih biljaka (Slika 15).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

Dodatak troske (supstrati T1-T3) ili tekućeg gnojiva (NPK) ili kombinacije troske i gnojiva (NPKT) nije izazvao promjene u sadržaju mjerenih fotosintetskih pigmenata u usporedbi s vrijednostima tih pigmenata izmjerenim u listovima kontrolnih biljaka (Slika 15).



**Slika 15.** Sadržaj klorofila *a* (kl a) i *b* (kl b) (mg g<sup>-1</sup> sv.t.) i ukupnih karotenoida (mg g<sup>-1</sup> sv.t.) u listovima graha uzgajanog osam tjedana na pokusnim poljima: 2011. g. - bez dodatka troske (kontrola, K) ili s dodatkom 10 g troske (T1); 2012. g. - bez dodatka troske (kontrola, K), s dodatkom gnojiva (NPK), s dodatkom NPK i 20 g troske (NPKT), s dodatkom 10 (T1) ili 20 (T2) g troske. Stupci predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ). Na stupcima je označena standardna devijacija.

#### 4.4. Pokazatelji oksidacijskog stresa

##### 4.4.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa - staklenik

*Vegetacijska sezona 2010. g.*

U Tablici 21. prikazani su pokazatelji oksidacijskog stresa u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratu (kvarcni pijesak i/ili dodaci troske ili NPK).

Sadržaj MDA bio je statistički značajno povećan u biljaka uzgajanih u supstratu s najvećim dodatkom troske i u supstratu NPK (porast od 19 do 21%) u odnosu na kontrolu, dok se vrijednost tog parametra u biljkama raslim u supstratima T1 i T2 nije statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolu (Tablica 21).

Dodatak troske ili NPK nije utjecao na sadržaj reaktivnih karbonila (C=O) koji ukazuju na oksidacijsko oštećenje proteina. Aktivnost enzima SOD u listovima graha nije se promijenila pod utjecajem troske, no dodatak troske u količini od 10 i 20 g statistički značajno je povećao aktivnost enzima APOD te istovremeno smanjio aktivnost enzima POD u listovima graha. Aktivnost mjerenih enzima bila je statistički značajno smanjena u listovima graha uzgojenih u supstratu NPK u usporedbi s enzimskom aktivnosti izmjerenoj u kontrolnom supstratu i supstratima s dodatkom troske.

**Tablica 21.** Pokazatelji oksidacijskog stresa (MDA – malondialdehid, nmol g<sup>-1</sup> sv.t.; C=O – reaktivni karbonili, nmol mg<sup>-1</sup> proteina; SOD – superoksid dismutaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; APOD – askorbat peroksidaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; POD – nespecifične peroksidaze, U mg<sup>-1</sup> proteina) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
<b>MDA</b>	14,2 (1,14) bc	17,2 (2,00) a	12,6 (1,51) c	15,8 (0,73) ab	16,9 (0,91) a
<b>C=O</b>	43,7 (2,54) a	45,8 (4,15) a	43,9 (3,10) a	44,9 (3,66) a	41,3 (2,42) a
<b>SOD</b>	14,4 (0,82) a	8,9 (1,19) b	14,3 (1,84) a	14,8 (1,69) a	15,0 (1,17) a
<b>APOD</b>	1,59 (0,25) b	0,96 (0,18) c	1,69 (0,34) b	2,33 (0,37) a	2,38 (0,31) a
<b>POD</b>	1,46 (0,10) a	0,88 (0,02) c	1,17 (0,10) b	1,19 (0,14) b	1,26 (0,17) b

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

Kao i u vegetacijskoj sezoni 2010. g., opseg lipidne peroksidacije izražene sadržajem MDA, statistički se značajno povećao u biljaka uzgajanih u supstratima T3 i NPK (porast od 46 do 52%) u odnosu na kontrolu, dok se vrijednost sadržaja MDA u biljkama raslim u supstratima T1 i T2 nije statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolu (Tablica 22).

Dodatak troske ili NPK nije utjecao na sadržaj reaktivnih karbonila (C=O). Aktivnost enzima SOD i APOD statistički se značajno promijenila u odnosu na kontrolu samo u listovima graha uzgojenog uz dodatak najveće količine troske. Aktivnost enzima POD u listovima graha uzgojenog s dodatkom troske bila je slična aktivnosti tog enzima u listovima kontrolnih biljaka. Aktivnost mjerenih enzima bila je statistički značajno povećana u listovima graha uzgojenih u supstratu NPK u usporedbi s enzimskom aktivnosti izmjerenoj u kontrolnom supstratu.

**Tablica 22.** Pokazatelji oksidacijskog stresa (MDA – malondialdehid, nmol g<sup>-1</sup> sv.t.; C=O – reaktivni karbonili, nmol mg<sup>-1</sup> proteina; SOD – superoksid dismutaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; APOD – askorbat peroksidaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; POD – nespecifične peroksidaze, U mg<sup>-1</sup> proteina) u listovima graha uzgajano osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	T1	T2	T3
<b>MDA</b>	12,1 (1,03) bc	18,4 (2,11) a	11,1 (1,66) c	14,2 (1,29) b	17,7 (2,00) a
<b>C=O</b>	44,8 (4,27) a	40,5 (5,21) a	42,3 (4,32) a	39,3 (2,62) a	40,2 (4,42) a
<b>SOD</b>	16,3 (0,76) c	20,0 (0,37) b	16,6 (1,99) c	18,4 (1,02) bc	28,5 (1,97) a
<b>APOD</b>	1,82 (0,12) c	3,95 (0,54) a	1,99 (0,24) c	2,47 (0,32) bc	2,58 (0,23) b
<b>POD</b>	1,39 (0,12) b	1,66 (0,09) a	1,56 (0,17) ab	1,34 (0,19) b	1,49 (0,13) ab

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### *Vegetacijska sezona 2012. g.*

Na temelju sadržaja C=O može se zaključiti da dodatak troske i/ili NPK nije povećao opseg oksidacijskog oštećenja proteina u listovima graha u odnosu na kontrolu (Tablica 23). No, dodatak NPK ili kombinacije troske i NPK kao i 40 g troske u supstrat statistički značajno je povećao opseg oksidacijskog oštećenja lipida u listovima graha u odnosu na kontrolu

Aktivnost enzima SOD u listovima graha uzgojenog u supstratima NPK, NPKT i T3 bila je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu dok dodatak nižih količina troske nije statistički značajno utjecao na aktivnost tog enzima u listovima graha. Aktivnost APOD bila je statistički značajno povećana u listovima graha uzgojenog u supstratu NPK i T3 u usporedbi s enzimskom aktivnosti izmjerenom u kontrolnom supstratu. S druge strane, aktivnost enzima POD bila je značajno povećana u odnosu na kontrolu samo u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT.

**Tablica 23.** Pokazatelji oksidacijskog stresa (MDA – malondialdehid, nmol g<sup>-1</sup> sv.t.; C=O – reaktivni karbonili, nmol mg<sup>-1</sup> proteina; SOD – superoksid dismutaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; APOD – askorbat peroksidaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; POD – nespecifične peroksidaze, U mg<sup>-1</sup> proteina) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (pijesak) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2	T3
<b>MDA</b>	16,7 (2,06) b	22,3 (1,05) a	21,7 (1,17) a	17,1 (1,89) b	18,5 (2,31) ab	19,9 (1,48) a
<b>C=O</b>	40,1 (0,97) a	43,9 (2,57) a	44,9 (3,33) a	42,5 (4,03) a	44,6 (3,67) a	42,9 (0,81) a
<b>SOD</b>	15,8 (1,01) b	20,9 (1,84) a	19,2 (2,09) a	16,1 (0,56) b	15,4 (1,62) b	19,7 (2,11) a
<b>APOD</b>	1,77 (0,10) b	2,73 (0,29) a	2,01 (0,19) ab	1,89 (0,27) b	2,12 (0,30) ab	2,91 (0,19) a
<b>POD</b>	1,59 (0,10) b	2,23 (0,37) a	2,44 (0,38) a	1,62 (0,12) b	1,66 (0,23) b	1,83 (0,19) ab

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.4.2. Pokazatelji oksidacijskog stresa – pokusno polje

*Vegetacijska sezona 2011. g.*

U Tablici 24. prikazani su pokazatelji oksidacijskog stresa u listovima graha nakon osam tjedana uzgoja u supstratu (vrtna zemlja s ili bez dodatka troske). Dodatak 10 g troske u supstrat nije utjecao na vrijednosti odabranih pokazatelja oksidacijskog stresa u odnosu na vrijednosti tih pokazatelja izmjerenim u kontrolnim listovima graha.

**Tablica 24.** Pokazatelji oksidacijskog stresa (MDA – malondialdehid, nmol g<sup>-1</sup> sv.t.; C=O – reaktivni karbonili, nmol mg<sup>-1</sup> proteina; SOD – superoksid dismutaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; APOD – askorbat peroksidaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; POD – nespecifične peroksidaze, U mg<sup>-1</sup> proteina) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1) g EAF troske ili bez njenog dodatka (K, kontrola).

oznaka	K	T1
<b>MDA</b>	15,7 (1,52) a	17,5 (1,53) a
<b>C=O</b>	54,2 (3,56) a	57,6 (4,81) a
<b>SOD</b>	11,5 (0,81) a	11,9 (1,02) a
<b>APOD</b>	3,00 (0,42) a	2,72 (0,32) a
<b>POD</b>	4,95 (0,40) a	4,93 (0,51) a

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

*Vegetacijska sezona 2012. g.*

U Tablici 25. prikazani su pokazatelji oksidacijskog stresa u listovima graha uzgajanog tijekom osam tjedana u vrtnoj zemlji s dodatkom troske, NPK, NPK i troske ili bez dodatka troske i NPK. Dodatak troske i/ili NPK nije statistički značajno utjecao na sadržaj C=O te

aktivnost enzima SOD i POD. Sadržaj MDA bio je statistički značajno povećan u listovima graha uzgojenom u kombiniranom supstratu (NPKT) dok je aktivnost APOD bila značajno povećana u odnosu na kontrolu u listovima graha uzgojenog u supstratima NPK i NPKT. Vrijednost tih dvaju pokazatelja oksidacijskog stresa (sadržaj MDA i aktivnost APOD) nije se promijenila pod utjecajem troske.

**Tablica 25.** Pokazatelji oksidacijskog stresa (MDA – malondialdehid, nmol g<sup>-1</sup> sv.t.; C=O – reaktivni karbonili, nmol mg<sup>-1</sup> proteina; SOD – superoksid dismutaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; APOD – askorbat peroksidaza, U mg<sup>-1</sup> proteina; POD – nespecifične peroksidaze, U mg<sup>-1</sup> proteina) u listovima graha uzgajanog osam tjedana u supstratu (vrtna zemlja) s dodatkom 10 (T1), 20 (T2) ili 40 (T3) g EAF troske, tekućeg gnojiva NPK i Fe (NPK) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

oznaka	K	NPK	NPKT	T1	T2
<b>MDA</b>	17,6 (1,91) b	19,2 (2,17) ab	21,0 (0,88) a	17,2 (0,86) b	17,4 (0,81) b
<b>C=O</b>	40,8 (4,77) a	45,3 (5,28) a	40,6 (2,55) a	42,1 (3,88) a	42,7 (1,27) a
<b>SOD</b>	10,9 (0,70) a	9,7 (0,21) a	10,4 (0,94) a	11,0 (0,42) a	10,8 (0,83) a
<b>APOD</b>	2,67 (0,13) b	3,45 (0,37) a	3,37 (0,38) a	2,83 (0,31) ab	2,79 (0,20) ab
<b>POD</b>	2,73 (0,10) a	2,56 (0,28) a	2,38 (0,13) a	2,36 (0,13) a	2,41 (0,07) a

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu šest replika. Standardna devijacija prikazana je u zagradi. Redovi označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $P \leq 0,05$ ).

Industrija proizvodnje čelika ima sve veću obavezu recikliranja svojih otpadnih produkata nastalih tijekom proizvodnje čelika te iznalaženja rješenja za zbrinjavanje ove vrste otpada na ekološki prihvatljiv i ekonomski opravdan način. Osim toga, sve je manja dostupnost sirovina pa su i pritisci na industriju proizvodnje čelika sve veći. U prošlosti se proizvodnja čelika temeljila isključivo na kvaliteti samog proizvoda, dok se danas naglasak sve više stavlja i na kvalitetu otpada, odnosno troske, koja će se ovisno o svom sastavu i kvaliteti koristiti u razne svrhe. Osmišljavanje novih tehnologija te unaprjeđenje starih sve se više proučava i usavršava kako bi u narednim godinama sav otpad iz takve industrije postao upotrebljiv. Na taj bi se način sačuvali prirodni izvori sirovina ali i smanjila emisija CO<sub>2</sub> te razvijala praksa recikliranja.

Visokopećna troska našla je važnu primjenu u cestogradnji i graditeljstvu, kao izolacijski materijal i u proizvodnji obojenog ambalažnog stakla, no ipak najveća njena primjena je u industriji cementa kao sirovina za proizvodnju klinkera ili kao dodatak cementu te predstavlja potencijalnu zamjenu za portland cement u betonu. Zadnjih trideset godina i elektropečna troska nalazi sve više svoju primjenu u raznim djelatnostima. Rezultati ispitivanja elektropečne troske (Regelja, 2002) pokazuju da troska nije kemijski inertna i da se može koristiti kao adsorbens za uklanjanje teških metala (bakra, kadmija, cinka i olova) iz onečišćenih voda. Rastovčan-Mioč i sur., (2006) navode da se elektropečna troska može upotrijebiti kao izvor metalnog željeza, kao taljivo u metalurgiji te kao zamjena za neke mineralne sirovine u proizvodnji stakla i staklene vune. Rezultati ispitivanja fizikalno-kemijskih osobina elektropečne troske pokazuju mogućnost primjene elektropečne troske za izradu kolničkih konstrukcija u cestogradnji ili kao poboljšivača tla u poljoprivredi. Naime, prema rezultatima kemijska analiza elektropečne troske provedene na Agronomskom fakultetu u Zagrebu (Anonymus, 2005) utvrđeno je da ova troska sadrži veće količine spojeva željeza te manju količinu mangana, kalija i fosfora koji mogu biti potencijalni izvor minerala za biljke posebice one koje rastu u tlima siromašnim željezom. Povećani sadržaj CaCO<sub>3</sub> može imati povoljan utjecaj na korekciju pH vrijednosti kiselih tala. Izuzev vrijednih minerala, utvrđeno je da troska korištena u ovom radu ima vrlo nizak sadržaj toksičnih teških metala kao što su Pb, Hg i Cd. Stoga se troska može primijeniti u poljoprivredi kao anorganski poboljšivač tla, poglavito u tlima siromašnim željezom (Rastovčan-Mioč i sur., 2009). U nekoliko je istraživanja utvrđeno da troska kao anorganski poboljšivač tla može zamijeniti umjetna gnojiva (Liu i sur., 2008; Zhang i sur., 2007; Yang i Zhang, 2005).

U ovom je radu istraživana učinkovitost elektropećne troske iz CMC Valjaonica cijevi Sisak d.o.o. kao potencijalnog izvora hranjivih elemenata za biljke graha što je procijenjeno na osnovu pokazatelja rasta (prinos mase suhe tvari, visina biljaka, broj listova, broj mahuna), pokazatelja fotosinteze (metodom izmjene plinova), fluorescencije klorofila *a* (metodom saturacijskog pulsa i OJIP testom), sadržaja fotosintetskih pigmenata te sadržaja hranjivih tvari u listovima, mahunama i zrnu graha te u supstratu. Također su praćeni pokazatelji oksidacijskog stresa u listovima - enzimi superoksid dismutaza (SOD), askorbat (APOD) i nespecifične peroksidaze (POD), sadržaj malondialdehida (MDA) kao pokazatelja oštećenja lipida staničnih membrana te proteinskih karbonila (CO) koji nastaju uslijed oštećenja proteina u stanici. Dobiveni rezultati su također uspoređeni s rezultatima dobivenim s dodatkom klasičnog gnojiva NPK (s dodatkom tekućeg željeza). Istraživanje je provedeno u stakleniku i u polju u Botaničkom vrtu PMF-a u Zagrebu. Količina eksperimentalno primijenjene troske odabrana je djelomično na temelju istraživanja Wang i Cai (2006) koji su pratili utjecaj elektropećne troske (10 i 20 g/kg supstrata) na kukuruz te su zaključili da bi se troska mogla koristiti kao izvrstan izvor Fe za poljoprivredne biljke koje rastu na tlima siromašnim tim mikroelementom. U ovom je istraživanju praćen utjecaj troske u količinama od 10 (T1), 20 (T2) ili 40 g/kg supstrat (T3) kao i kombinacije troske i NPK (NPKT) na rast i fiziološke procese biljaka graha.

### 5.1. Pokazatelji rasta graha

Na osnovu praćenih pokazatelja rasta u stakleniku tj. visine biljaka i mase suhe tvari, vidljiv je pozitivan učinak troske u odnosu na kontrolu (K) i pozitivnu kontrolu (NPK). Naime, visina biljaka i masa suhe tvari bile su značajno veće u biljkama uzgojenim uz dodatak 10 i 20 g troske u odnosu na kontrolne biljke. Troska je u nižim količinama statistički značajno povećala i broj listova u odnosu na kontrolu (K) u gotovo svim vegetacijskim sezonama. Usporedbom biljaka koje su rasle na supstratu uz dodatak troske i biljaka uzgojenih uz dodatak NPK te kontrolnim biljkama, vidljivo je da je troska u količini od 10 g povećala prinos mase suhe tvari za 22 do 30%, a dvostruko veća količina troske povećala je prinos mase suhe tvari za čak 37% u odnosu na NPK i K.

Visina biljaka na pokusnom polju, neovisno o vegetacijskoj sezoni, bila je statistički značajno veća na supstratima s dodatkom troske, NPK i NPKT u odnosu na kontrolu. Veći broj mahuna, listova i veću masu suhe tvari lista, mahuna i zrna imale su biljke na supstratu T1 u usporedbi s kontrolom sezone 2011. g. U drugoj vegetacijskoj sezoni (2012. g.) biljke

uzgajane na pokusnim poljima s dodatkom 10 g troske te s istovremenim dodatkom troske i NPK razvile su veći broj mahuna u odnosu na kontrolu. Dodatak 10 g troske također je značajno povećao masu suhe tvari lista, mahuna i zrna u odnosu na sve tretmane, a masa suhe tvari listova bila je bitno povećana, u odnosu na K i NPK, i na pokusnom polju s dodatkom 20 g troske. Suprotno tome, u radu Gašpar (2010), elektropečna troska u količini od 20 g troske / kg supstrata dodana u supstrat u kojem su uzgajane biljke suncokreta tijekom dva mjeseca nije bitno utjecala na masu suhe tvari listova. No, treba uzeti u obzir da, u usporedbi s grahom, suncokret ima dulje generacijsko vrijeme i biljke su nakon dva mjeseca pokusa bile tek u fazi formiranja cvjetova pa je moguće da je potreban dulji vremenski period da se primijeti pozitivan utjecaj troske na prinos mase suhe tvari. Pozitivan učinak elektropečne troske iz CMC Valjaonica cijevi Sisak d.o.o na prinos mase suhe tvari kukuruza utvrđen je i u istraživanju Radić i sur. (2013) gdje je količina od 10 i 20 g troske statistički značajno povećala masu suhe tvari. U istraživanju Wang i Cai (2006) te Abbaspour i sur. (2004) također je zabilježeno bitno povećanje mase suhe tvari biljaka kukuruza uzgojenih bilo uz dodatak 10 ili 20 g troske / kg supstrata) dok je troska u količini od 40g / kg tla uzrokovala lagano smanjenje mase suhe tvari u odnosu na kontrolne biljke. U ovom istraživanju prinos mase suhe tvari u listovima graha uzgojenog u pijesku obogaćenom s 40 g troske / kg supstrata bio je sličan vrijednostima tog parametra zabilježenog u listovima kontrolnih biljaka.

### **5.2. Sadržaj makro- i mikroelemenata**

Neovisno o tome da li su biljke uzgajane u pijesku (staklenik) ili vrtnoj zemlji (pokusno polje), zamijećeno je da dodatak troske u supstrat uzrokuje povećanje pH vrijednosti otopine supstrata i to sukladno količini troske dodane u supstrat. Vrijednosti konduktiviteta (EC) također su bile povećane u svim supstratima s dodanom troskom u usporedbi s kontrolnim supstratom. Torkashvand i Shahram (2007) te Torkashvand i sur. (2012) su u svojim istraživanjima dobili identične rezultate, odnosno porast pH vrijednosti bio je proporcionalan količini troske dodane u supstrat. Vrijednost EC također je bila u linearnom porastu u odnosu na dodanu količinu troske. Poboljšanje kiselih tala dodatkom alkalnih industrijskih nusprodukata može poboljšati kvalitetu tala podizanjem pH vrijednosti tla (Alva i Sumner, 1990). Dodatkom NPK u supstrat, pH vrijednost otopine supstrata se smanjila dok se EC vrijednost povećala u odnosu na kontrolu i supstrat T1. Suprotno tome, supstrat NPKT (kombinacija tekućeg gnojiva i troske) pokazivao je povećane vrijednosti pH i EC u odnosu



na kontrolu i supstrat NPK. Negim i sur. (2010) te Radić i sur. (2013) dobili su slične rezultate odnosno utvrdili su da dodatak troske u kiselo tlo, neovisno o dodatku NPK, uvijek povećava pH vrijednost tla. Takav učinak na vrijednosti pH i EC tla troska ima zahvaljujući svom sastavu prije svega visokom udjelu kalcijevih iona. Kalcij oksid (CaO) iz troske otapa se u vodi tla te se otpuštaju ioni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{OH}^-$  što rezultira stvaranjem kalcijevog hidroksida i povećanjem pH vrijednosti tla čime se neutralizira njegova kiselost, a prema istraživanjima Khan i sur. (2007) navedeni ioni polagano se otpuštaju tijekom nekoliko godina.

U ovom je radu utvrđeno da troska utječe na povećanje sadržaja Fe, Na, Mn, N, Mg, P i K u supstratima (pijesak ili vrtna zemlja) s dodanom troskom u usporedbi s kontrolnim supstratom, a pozitivan utjecaj troske na sadržaj pojedinih mineralnih elemenata u supstratu i biljkama dokazan je u brojnim istraživanjima (Abbaspour i sur. 2004; Khan i sur., 2007; Negim i sur., 2010; Radić i sur., 2013; Torkashvand, 2011; Wang i Cai, 2006). Najveće količine Fe utvrđene su u pijesku s 40 g / kg dodane troske (T3) što je i očekivano zbog velike količine željeza u troski. No istovremeno, u listovima biljaka koje su rasle na supstratu T3 nije zabilježena i najveća količina željeza već na supstratima s manjim količinama troske (10 i 20 g) kao i supstratima NPK i NPKT. Poznato je da je željezo biljkama najdostupnije u blago kiselim tlama, dok je najmanje topivo a time i manje dostupno u tlama u kojima je pH vrijednost između 7,4 i 8,5. Pri toj pH vrijednosti, željezo je prisutno u tlu u gotovo netopivom obliku. Budući da je veća količina troske uzrokovala razmjerno povećanje pH vrijednosti tla što je moglo ograničiti dostupnost pojedinih hranjivih tvari iz tla, uključujući željezo, bilo je očekivano da će listovi graha biti siromašniji željezom. No, sadržaj Fe u listovima biljaka uzgojenih u pijesku (staklenik) s dodatkom 10 i 20 g troske bio je bitno povećan. Ti bi se rezultati mogli objasniti činjenicom da povećanjem pH vrijednosti tla iznad 8,5 željezo prelazi u anionski oblik  $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$  koji ponovno ima dobru topivost (Norvell i Lindsay, 1982). Mjerenjem pH vrijednosti u supstratima s dodanom EAF troskom zabilježene su vrijednosti više od 9. Pri tim pH vrijednostima željezo je upravo u spomenutom dostupnom obliku za biljku što je vjerojatno rezultiralo povećanjem količine željeza u listovima graha uzgojenog u pijesku s dodatkom 10 i 20 g troske. S druge strane, biljke graha uzgojene u pijesku s 40 g troske (staklenik) slabije su rasle (niža visina, manja masa suhe tvari, manji broj listova), u listovima je izmjerena manja količina klorofila i karotenoida, intenzitet fotosinteze bio je niži u odnosu na supstrate s nižom koncentracijom troske (T1 i T2), a pokazatelji oksidacijskog stresa bili su statistički značajno povećani u odnosu na kontrolu. Ti rezultati upućuju na zaključak da ta količina troske nije optimalna za uzgoj graha u smislu povećanja prinosa suhe tvari. Elektropečna troska sadrži 1,8% aluminija koji se u alkalnim

tlima nalazi u obliku različitih specija aluminijevog hidroksida a porastom pH vrijednosti iznad 9, u otopini tla prevladavaju aluminatni ioni  $(\text{AlOH})_4^-$  (Parker i sur., 1988). U nekoliko je istraživanja (Parker i sur., 1988; Brautigan i sur., 2012) utvrđeno fitotoksično djelovanje (smanjen rast stabljike i korijena) navedenih iona čija je koncentracija vjerojatno povećana u tlu obogaćenom s 40 g troske / kg supstrata, te je i to mogao biti razlog slabijem rastu graha pod utjecajem te količine troske.

Pri uzgoju graha u vrtnoj zemlji (pokusno polje), sadržaj željeza u supstratima T1 i T2 je, kao što je već spomenuto, također bio veći u usporedbi sa sadržajem tog mikroelementa u kontrolnom supstratu, no ta razlika nije bila tako izražena kada je kao supstrat korišten pijesak. Što se tiče sadržaja Fe u biljkama uzgojenim na polju, prve vegetacijske sezone sadržaj željeza bio je statistički značajno veći u listu i zrnu, a druge sezone u listu i mahuni u usporedbi s kontrolom. pH vrijednosti vrtno zemlje bile su upravo u problematičnom rasponu od 7,4 do 8,5 pri kojem je topivost željeza u tlu najmanja. No, iz rezultata je vidljivo da je troska ipak pozitivno utjecala na količinu tog mikroelementa u biljci. Abou Seeda i sur. (2002) su utvrdili da prisutnost organske tvari uz trosku u tlu povećava pH vrijednost tla, ali može pospješiti i stvaranje dostupnog oblika željeza ukoliko je istovremeno prisutan i  $\text{CaCl}_2$ . Količina mangana u pijesku (supstrat u stakleniku) a tako i u listovima graha bila je povećana uz dodatak troske. Poznato je da mangan i željezo djeluju antagonistički no rezultati ovog istraživanja to ne potvrđuju jer uz povećanu količinu željeza u biljci nije utvrđena niža količina mangana u listovima biljaka. Također, povećanje pH vrijednosti nije negativno utjecalo na količinu Mn u grahu, iako je pri nižim pH vrijednostima potaknuta redukcija mangana iz Mn (IV) u Mn (II) koji je topiviji te dostupniji biljkama (Lindsay, 1979). No, Kobayashi i sur. (2003) su, proučavajući manjak mikroelemenata Fe, Mn i Zn u duhanu, uočili da su simptomi manjka jednog elementa daleko drastičniji nego kad u supstratu postoji manjak sva tri elementa. Čini se da kombinirani manjak mikroelemenata može smanjiti fiziološku kompeticiju između željeza i nekih drugih metala, a to može povećati mogućnost stvaranja više kelatnih molekula s atomima željeza te smanjenje kloroze. Velike količine Mn u EAF troski (1-8%) su očito pozitivno utjecale na povećanu dostupnost tog mikroelementa biljkama neovisno o visokoj pH vrijednosti otopine supstrata (Torkshvande i sur., 2012). Kada je kao supstrat korištena vrtna zemlja (pokusno polje), troska je također povećala količinu Mn u vrtnoj zemlji i u biljkama (list i mahuna), no razlike u količini mangana u supstratu i biljkama nisu bile tako izražene kao kada je kao supstrat korišten silicijski pijesak (staklenik). Moguće je da organska tvar prisutna u vrtnoj zemlji pomiješanoj s troskom

pozitivno utječe na stvaranje kompleksa s manganom te njegovim boljom dostupnošću biljkama (Abbaspour i sur., 2004).

Dodatkom troske u supstrat povećala se i količina magnezija u usporedbi s kontrolnim supstratom što je i očekivano jer EAF troska sadrži između 4 i 13% magnezija. Posebice je zabilježena velika količina magnezija u supstratu pri dodatku 20 g troske (T2) što se odrazilo i u količini Mg iona izmjerenih u listovima, mahuni i zrnu. U istraživanju Khan i sur. (2007) bazična troska uzrokovala je dvostruko povećanje sadržaja magnezija i četverostruko povećanje sadržaja kalcija u dvije vrste tla kao i njihovu pH vrijednost nakon dva mjeseca inkubacije. Zaključeno je da je veća količina Mg u supstratu s dodanom troskom rezultat dobrog omjera drugih dostupnih kationa iz troske, kao što su ioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Međutim, ukoliko je omjer Ca:Mg iona jako nerazmjernan ( $\text{Ca:Mg} > 20$ ), biljci Mg postaje manje dostupan, posebice ako je tlo bogato sedrom ( $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) jer je tada Mg prisutan u obliku  $\text{MgSO}_4$  iz kojeg je nedostupan biljkama što u konačnici uzrokuje slabiji rast biljaka i manji urod (Bohn i sur., 2001; Carran, 1991; Peregrina i sur., 2008). S druge strane, u kiselim tlima dostupnost Mg je jako velika, a dostupnost iona Ca jako mala. Dodatkom troske u tlo, pH vrijednost tla se povećava što poboljšava omjer Ca:Mg iona te veću dostupnost kalcijevih iona čija nedostupnost je jedan od glavnih problema u kiselim tlima (Khan i sur., 2007). Poboľšan rast graha u oba supstrata (pijesku i vrtnoj zemlji) s dodatkom troske, te veće količine iona Mg u usporedbi s kontrolom govore u prilog dobrog omjera Ca:Mg u ovom istraživanju.

Kada je kao supstrat korišten pijesak (staklenik), sadržaj natrija (Na) u usporedbi s kontrolom bio je povećan u gotovo svim supstratima s dodatkom troske, no to se nije odrazilo i na povećanje tog elementa u listovima graha. U slučaju vrtne zemlje, sadržaj Na je bio nešto viši u tlu s dodanom troskom, osobito na kombiniranom supstratu (NPKT) što se odrazilo i na veći sadržaj istoga u mahuni i zrnu, ali ne i u listu. Istraživanja su pokazala da se količina biljkama dostupnog natrija u tlu s vremenom smanjuje, vjerojatno zbog dodatka kalijevog gnojiva te izmjene iona K s ionima Mg i Na, što u ovom istraživanju nije vidljivo zbog kraćeg vremenskog perioda pokusa (Peregrina i sur., 2008; Khan i sur., 2006).

Sadržaj fosfora, neovisno o vegetacijskoj sezoni, bio je najveći u silicijskom pijesku s dodatkom 20 g troske (T2), no i u pijesku s dodatkom drugih količina troske izmjerene su veće količine fosfora u usporedbi s kontrolom. Kristen i Erstad (1996) utvrdili su da je za povećanje fosfora u tlu obogaćenom troskom zaslužna prisutnost silicija u troski. Naime, silicij se u tlu može zamijeniti s fosforom koji je u otopini tla dostupan biljkama. Do sličnih su zaključaka došli Subramanian i Copalswamy (1990) koji su utvrdili da je povećanje fosfora vjerojatno povezano s njegovim otpuštanjem zbog specifičnog adsorpcijskog djelovanja

silicija. U ovom je istraživanju zamijećeno da se povećanjem količine troske, ali samo do količine od 20 g troske / kg supstrata, povećava i količina fosfora dostupnog biljkama. Veća količina dostupnog fosfora pri dodatku 20 g troske u pijesak odrazila se i na povećanje sadržaja fosfora u listovima graha. Suprotno tome, u pijesku s dodatkom 40 g troske pH vrijednost se povećala a količina dostupnog fosfora se smanjila. Najvjerojatniji razlog tome je da je u tim uvjetima fosfor ponovo prisutan u obliku netopivog kalcijevog fosfata (Torkashvand i Shahram, 2007). Također je za očekivati da će se količina fosfora u supstratu s dodatkom troske vremenom smanjivati jer su dugogodišnja istraživanja (Karimian i sur., 2012) pokazala upravo tendenciju smanjenja biljci dostupnog fosfora iz tla, odnosno njegovo taloženje u netopivom obliku kalcijeva fosfata. Troska dobivena iz elektropeći bogata je Fe i Ca oksidima, a za oba ta oksida poznato je da imaju važnu ulogu u vezanju P na čestice tla. Fosfatni ioni mogu se vezati na željezni oksid izmjenom liganada te stvaranjem kompleksnih spojeva (Parfitt, 1978). Prisutnost Ca pospješuje stvaranje Ca-P spojeva koji pri visokim pH vrijednostima (10,6-11,4) uglavnom formiraju stabilan hidroksiapatit iz kojeg je P manje dostupan biljci (House, 1999) pa je i to jedan od mogućih uzroka smanjenja biljkama dostupnog fosfora u pijesku obogaćenom s 40g troske. Takva svojstva troske koriste se za vezanje a time i uklanjanje velike količine fosfora iz tla i vode (Drizo i sur., 2006). Što se tiče vrtne zemlje, prve vegetacijske sezone nije bilo razlike u sadržaju P između vrtne zemlje s dodatkom ili bez dodatka troske dok je druge vegetacijske sezone (2012. g.) količina P u vrtnoj zemlji obogaćenoj troskom (posebice s 20 g troske / kg supstrata) ili kombinacijom troske i NPK bila veća u odnosu na kontrolni supstrat. Sukladno tome, sadržaj P u listu, mahuni ili zrnu biljaka uzgajanih uz dodatak troske ili troske i NPK bio je veći u odnosu na kontrolu. Roy i sur. (1971) su već prije nekoliko desetljeća uočili pozitivan utjecaj troske na količinu P u tlu, u biljci i prinosu šećerne trske. Prema njihovim istraživanjima količina P bila je najveća u metabolički aktivnijim dijelovima biljke. Autori su zaključili da je Si zaslužan za povećanje mobilnosti P iz manje metabolički aktivnih dijelova biljke u one aktivnije. Najveći prinos mase suhe tvari šećerne trske u usporedbi s kontrolom i umjetnim gnojivom utvrđen je u biljaka uzgojenih u tlu s dodatkom Si i s relativno niskom razinom P. I u ovom je istraživanju količina P u supstratu bila veća uz dodatak 10 g troske nego uz dodatak NPK gnojiva.

Sadržaj dušika (neovisno o vrsti supstrata), bio je veći u supstratima s dodanom troskom ili troskom i NPK u usporedbi s kontrolnim supstratom. Izmjerena količina pristupačnog N (pN) u skladu je s vrijednostima ukupnog N u supstratu. U tlu se dušik uglavnom nalazi u obliku kompleksnih organskih molekula koje mikroorganizmi putem mineralizacije razgrađuju na

$\text{NH}_4^+$  ione koji nitrifikacijom prelaze u  $\text{NO}_3^-$  ione. Ta dva ionska oblika dušika dostupna su biljkama u različitim količinama ovisno o njihovoj ukupnoj količini u tlu, pH vrijednosti tla, ispiranju iz tla i temperaturi tla (Miller i Cramer, 2004). Amonijevi ioni se slabije ispiru iz tla nego nitratni te se stoga mogu više nakupljati u tlu. Osim toga, biljke uzimaju  $\text{NH}_4^+$  ione u većim količinama pri višim pH vrijednostima (Findenegg, 1987). Supstrati s dodanom troskom pokazali su puno više pH vrijednosti nego kontrolni supstrati pa se veća količina N u njima može objasniti povećanjem pH vrijednosti supstrata (pijesak ili vrtna zemlja). Na veću količinu N u supstratima obogaćenim troskom mogla je utjecati i veća količina kalija u troski koji, kada se otpusti u tlo, može povećati dostupnost  $\text{NH}_4^+$  iona u procesu izmjene kationa u tlu (Haynes i Goh, 1978). Troska sadrži oko 0,06%  $\text{K}_2\text{O}$  i njezinim dodavanjem u tlo povećava se količina dostupnih  $\text{K}^+$  iona u supstratu, a procesom izmjene kationa i veća dostupnost  $\text{NH}_4^+$  iona. Istraživanja su pokazala da postoji izravna povezanost između uzimanja i provođenja  $\text{NO}_3^-$  iona i metabolizma ugljika (Lejay i sur., 2003). Naime, boljom i produktivnijom fotosintezom proizvodi se više šećera koji stimuliraju aktivnost membranskih prenosioca u korijenu za ione  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{SO}_4^{2-}$  te se na taj način poboljšava uzimanje dušika od strane korijena (Lejay i sur., 2003). U ovom istraživanju, povećani intenzitet fotosinteze izmjeren je u listovima graha uzgojenih na gotovo svim supstratima s dodatkom troske ili troske i NPK.

Kalij je esencijalni makroelement koji ima važnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima u biljkama. Iako troska sadrži relativno male količine kalija (>1%), sadržaj kalija u većini supstrata (pijesak ili vrtna zemlja) obogaćenim troskom, kao i u listovima, mahunama ili zrnu graha bio je povećan u odnosu na odgovarajuće kontrole. Povećanje sadržaja kalija u listovima graha uz dodatak 4% troske utvrdili su i Negim i sur. (2010). Nadalje, u istraživanju Samui i sur. (1981) utvrđeno je da dodatak željeza i bakra u tlo povećava primanje kalija kod žitarica. Dodatkom troske povećava se i pH vrijednost tla, a time i primanje mnogih oblika spojeva s fosforom, kalijem, kalcijem i magnezijem (Abou Seeda i sur., 2002). No, pri određenim pH vrijednostima tla smanjuje se količina kalija što se povezuje s njegovom fiksacijom u netopive aluminosilikate (Malakouti i Afkhami, 1999; Torkashvand i Shahram, 2007).

Usporedbom učinka troske i umjetnog gnojiva s Fe (NPK) na sadržaj određivanih mineralnih tvari u korištenim supstratima (pijesak ili vrtna zemlja) kao i u biljkama graha može se zaključiti da troska poboljšava kvalitetu tla te da je podjednako dobar izvor makro- i mikroelemenata kao i NPK. Štoviše, sadržaj pojedinih mineralnih elemenata (Mg, Mn i N) u listovima i zrnu biljaka raslih koje su rasle u supstratima s dodatkom NPK pojedinih

vegetacijskih sezona bio je niži u usporedbi s onim u listovima i zrnu biljaka u supstratima T1 i T2.

Povećana aktivnost nitrat reduktaze (NR) izmjerena je u listovima biljaka uzgojenih u pijesku s dodanom troskom (neovisno o njenoj količini) te u listovima biljaka uzgojenih u vrtnoj zemlji s 10 g troske. Supstrati NPK i NPKT također su bitno povećali aktivnost NR u listovima graha. Povećana aktivnost nitrat reduktaze dovodi do poboljšane asimilacije dušika, što je utjecalo na bolji i produktivniji rast graha, posebice u supstratima T1 i T2. Nitrat reduktaza katalizira prijelaz (redukciju) nitrata u nitrite pri čemu elektroni potječu od NAD(P)H. U grahu su identificirana dva različita genska koda za NADH:NR što je i slučaj kod većine biljaka u kojima NR koristi NADH kao donor elektrona (Lillo i sur., 2001). Osim metaboličkog i fiziološkog statusa biljke, na ekspresiju tog enzima utječe i svjetlost u čemu fitokromi potencijalno igraju važnu ulogu (Jones i Sheard, 1972; Lillo i Appenroth, 2001). Naime, primijećeno je da tamnocrvena svjetlost (koja aktivira sistem fitokroma) vodi ka povećanju razine mRNA za NR i posljedično aktivnosti enzima NR u biljaka opskrbljenim nitratima, no te su promjene primijećene i onda kada su biljke bile osvijetljene bijelom svjetlošću. Smatra se da nitrati potiču ekspresiju gena za NR i vjerojatno nitrit reduktazu dok svjetlost utječe na razinu ekspresije tih gena (Campbell, 1999; Lillo, 2004). Također se čini da NR ima ulogu u asimilaciji Fe u biljku što predstavlja jedan od ključnih aspekata u izgradnji učinkovitih fotosintetskih jedinica (Campbell, 1999).

### 5.3. Funkcionalnost fotosintetskog aparata

U ovom je istraživanju funkcionalnost fotosintetskog aparata mjerena pomoću nekoliko metoda. Metodom izmjene plinova utvrđeno je povećanje intenziteta fotosinteze (FS), unutarnje koncentracije CO<sub>2</sub>, stope transpiracije i provodljivosti puči u listovima graha uzgojenog u pijesku uz dodatak nižih količina troske u vegetacijskim sezonama 2010. i 2012. g. Ti rezultati upućuju na pozitivan učinak troske na proces fotosinteze. U vegetacijskoj sezoni 2011. g. utvrđen je nešto slabiji stimulativni učinak troske na intenzitet fotosinteze u listovima graha u odnosu na ostale vegetacijske sezone što se vjerojatno može pripisati ubrzanom starenju, gubitku klorofila, smanjenoj provodljivosti puči, oštećenosti fotosustava i inhibiciji Calvinovog ciklusa (Reynolds i sur., 1990) uslijed visokih temperatura u stakleniku te vegetacijske sezone (prema Državnom hidrometeorološkom zavodu višim za 30% od prijašnjih godina). Utvrđeno je da visoke temperature mogu smanjiti intenzitet fotosinteze u pamuku i pšenici na način da smanjuju aktivaciju enzima RuBisCO putem inhibicije

RuBisCO-aktivaze (Law i Crafts-Brandner, 1999). Povećanje intenziteta fotosinteze i provodljivosti puči pod utjecajem troske zamijećeno je i u listovima biljaka uzgajanih u vrtnoj zemlji s dodatkom troske. Taj se stimulativni učinak troske na fotosintezu može objasniti njenim mineralnim sastavom odnosno može se povezati s pozitivnim učinkom troske na bolju dostupnost N, P, K, Mg i Fe biljkama graha. Bolja dostupnost N biljkama graha vjerojatno je pridonijela i boljoj učinkovitosti fotosintetskog aparata a poznato je da enzim RuBisCO sadrži između 20 i 30% ukupnog N u listovima C<sub>3</sub> biljaka (Feller i sur., 2008). Izuzev na koncentraciju enzima RuBisCO, veći sadržaj N utječe i na koncentraciju drugih proteina uključenih u fotosintezu (ostali proteini Calvinovog ciklusa, proteini tilakoidnih membrana) kao i na koncentraciju fotosintetskih pigmenata (Evans, 1983, 1989; Olensinki i sur., 1989). Ti se rezultati djelomice podudaraju s rezultatima ovog istraživanja budući su koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* te karotenoida u listovima graha uzgojenog u pijesku obogaćenom s 10 i 20 g troske bile uglavnom povećane u odnosu na odgovarajuće kontrole. No, troska dodana u vrtnu zemlju nije utjecala na sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima graha iako je istovremeno u tim biljkama zabilježen bitno povećan intenzitet fotosinteze u odnosu na kontrolu.

U istraživanju Sinclair i Horie (1989) utvrđena je pozitivna korelacija između sadržaja N u listu i asimilacije CO<sub>2</sub> u tri poljoprivredne vrste (soja, riža i kukuruz). Autori su također utvrdili povezanost između sadržaja dušika i akumulacije biomase te su zaključili da dušik može utjecati na fotosintezu jer povećava lisnu površinu te time indirektno količinu apsorbirane svjetlosne energije (Sinclair i Horie, 1989). Osim dušika, na intenzitet fotosinteze utječe i pristupačnost drugih mineralnih tvari. U listovima biljaka uzgojenih uz manjak nitrata, fosfata i iona kalija utvrđena je znatno niža asimilacija CO<sub>2</sub> u odnosu na kontrolne biljke (Longstreth i Nobel, 1980). Makroelementi dušik, fosfor i kalij (NPK) nisu jedini elementi koji pozitivno utječu na proces fotosinteze. Poznato je da i premale količine željeza drastično smanjuju učinkovitost fotosinteze i PSII u soji (Jiang i sur., 2007). Magnezij je sastavni dio molekule klorofila, kofaktor je gotovo svih enzima koji kataliziraju reakcije fosforiliranih supstrata, aktivator je velikog broja enzima, uključujući i enzima RuBisCO te utječe na protonski gradijent između tilakoida i strome (Vukadinović i Lončarić, 1998). U istraživanju Terry i Ulrich (1974) utvrđeno je da povećanjem koncentracije magnezija dolazi do povećanja intenziteta fotosinteze u listovima šećerne repe, a Liu i sur. (2008) su utvrdili da nedostatak magnezija uzrokuje smanjenje sadržaja klorofila i intenziteta fotosinteze u listu kupusa te time negativno utječe na rast i prinos mase kineskog kupusa. Mangan sudjeluje u oksidoredukcijskim procesima, sastavni je dio i aktivator brojnih enzima, ima ulogu u

fotosintetskom prijenosu elektrona fotosustava II u procesu fotolize vode (Vukadinović i Lončarić, 1998). Efikasnost mangana u povećanju stope fotosinteze u listu kukuruza navode i Wei i sur. (2004).

Vrijednosti intenziteta fotosinteze u listovima graha uzgojenog u supstratima (neovisno o vrsti supstrata) s dodatkom umjetnog gnojiva (NPK) uglavnom su bile podjednake ili nešto niže u usporedbi s vrijednostima tog parametra izmjenjenog u listovima graha uzgojenog u supstratima s dodatkom nižih količina troske. Slabiji intenzitet fotosinteze u listovima graha uzgajanog u pijesku s dodatkom NPK vegetacijske sezone 2010. g. u odnosu na trosku (T1 i T2) mogao bi se bar djelomice pripisati visokim koncentracijama Fe (prooksidans u Fentonovoj reakciji) i posljedičnom oksidacijskom oštećenju membranskih lipida i inhibiciji antioksidacijskih enzima (Tablica 21) utvrđenom u listovima tih biljaka. Tu pretpostavku potvrđuje izostanak oksidacijskog stresa u listovima biljaka uzgojenih u supstratima T1 i T2. Prednost troske u usporedbi s NPK je u njenom polaganom otpuštanju mineralnih tvari u tlo čime se postupno povećava količina željeza i ostalih minerala u tlu. No, izgleda do iskoristivost pojedinih mineralnih tvari iz troske dodane u pijesak i njen pozitivan utjecaj na rast biljaka graha ovise o njenoj količini budući da dodatak troske u količini od 40 g / kg supstrata (T3) u pijesak nije utjecao na sadržaj mineralnih tvari u listovima biljaka kao ni na prinos mase suhe tvari.

U ovom je istraživanju simultani dodatak troske i NPK (neovisno o vrsti supstrata) uzrokovao najveći porast intenziteta fotosinteze u listovima graha u odnosu na sve ostale supstrate. Ti rezultati ukazuju na sinergički učinak troske i umjetnog gnojiva NPK na fotosintezu. No povećani intenzitet fotosinteze u tim biljkama nije doveo i do najvećeg prinosa mase suhe tvari (lista, mahune i zrna) u odnosu na supstrate s dodanom troskom što navodi na zaključak da se produkti fotosinteze troše drugdje, moguće da se dio asimiliranog CO<sub>2</sub> izgubio pojačanom fotorespiracijom. Naime, parametri fotosinteze prikazani u rezultatima izmjereni su u prijepodnevnim satima, a mjerenje parametara fotosinteze provedeno u poslijepodnevnim satima (nije prikazano u rezultatima) pokazalo je smanjenje intenziteta fotosinteze i smanjenu provodljivost puči upravo u listovima biljaka uzgojenih u supstratu obogaćenom troskom i NPK (NPKT) u odnosu na ostale tretmane. Takvi bi se rezultati možda mogli objasniti i činjenicom da višak dušika kao i drugih mineralnih tvari u biljkama u odnosu na optimalne koncentracije (karakteristične za pojedine biljne vrste) može rezultirati izostankom najveće akumulacije biomase (Hossain i sur., 2010; Li i sur., 2001).

Učinkovitost fotosintetskog sustava praćena je i mjerenjem polifaznog porasta fluorescencije klorofila *a*. Što se tiče mjerenja u stakleniku, vrijednost maksimalnog kvantnog prinosa



fotosustava II ( $F_v/F_m = TR_0/ABS$ ) u listovima biljaka uzgojenih na supstratima NPK i NPKT bile su statistički značajno povećane u odnosu na T3 supstrat, ali ne i u odnosu na biljke koje su rasle na drugim supstratima (T1, T2 i K). Dodatkom 40g / kg troske (T3) smanjio se maksimalni prinos kvanta PSII, ali ne značajno u odnosu na kontrolu. To može biti posljedica inaktivacije određenog broja reakcijskih središta fotosustava II što potvrđuje smanjena gustoća reakcijskih središta ( $RC/CS_0$ ) koji su u tretmanu T3 značajno smanjeni u odnosu na kontrolni tretman te one s dodatkom NPK, NPKT, T1 i T2. Smanjenje gustoće reakcijskih središta ne mora nužno biti trajno oštećenje nego može biti reverzibilna strategija biljke u odgovoru na stres jer je dokazano da je moguć oporavak tj. povratak aktivnosti reakcijskih središta (De Ronde i sur., 2004; Bertamini i sur., 2007). Najinformativniji parametar OJIP testa je indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) koji se često naziva indeksom vitalnosti budući da reflektira funkcionalnost oba fotosustava i kvantificira trenutnu učinkovitost u stresnim uvjetima (Strasser i sur., 2004). Indeks fotosintetske učinkovitosti ( $PI_{ABS}$ ) bio je bitno povećan u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT u odnosu na sve ostale tretmane (K, T1 i T2). Indeks fotosintetske učinkovitosti obuhvaća tri ključna događaja u reakcijskom središtu fotosustava II o kojima ovisi fotosintetska aktivnost: apsorpciju energije ( $RC/ABS$ ), omjer „trapping“-a ekscitona i disipacije ( $TR_0/DI_0$ ) i pretvorbu ekscitacijske energije uslijed odvajanja naboja što pokreće elektronski transport ( $ET_0/(TR_0-ET_0)$ ) (Strasser i sur., 2004). Kao što je već spomenuto za parametar  $PI_{ABS}$ , biljke uzgojene u supstratima s dodatkom troske nisu se značajno razlikovale u odnosu na kontrolne biljke a nije zamijećeno ni smanjenje fotosintetske učinkovitosti u parametrima OJIP testa  $RC/ABS$  i  $TR_0/DI_0$ .

Pod utjecajem stresa smanjuje se parametar  $TR_0/RC$  što se objašnjava smanjenjem  $TR_0/DI_0$  što direktno utječe na  $PI_{ABS}$  odnosno funkcioniranje PSII. Lepeduš i sur. (2009) također navode da na smanjenje  $TR_0/DI_0$  značajnije može utjecati veliki porast disipacije energije ( $DI_0/RC$ ) od „trapping“ elektrona po aktivnom reakcijskom središtu. Povećanje disipacije energije vidljivo je biljkama uzgojenim u pijesku s dodatkom 40g/kg (T3) što može ukazivati na neki oblik stresa zbog veće količine troske u supstratu.

Parametar prijenosa elektrona u listovima biljaka uzgojenih u supstratima s troskom nije pokazao utjecaj dalje od primarnog akceptora QA ( $ET_0/(TR_0-ET_0)$ ) u odnosu na kontrolu, dok su te vrijednosti bile značajno povećane u listovima biljaka uzgojenih u supstratima NPK i NPKT. Iz ovoga se može zaključiti da i pretvorba ekscitacijske energije u prijenos elektrona nije utjecala na smanjenje indeksa fotosintetske učinkovitosti što je moguće budući da je veza između prijenosa elektrona i fiksacije  $CO_2$  dokazana (Krall i Edwards, 1992), a time i veza

indeksa fotosintetske učinkovitosti sa fiksacijom CO<sub>2</sub> (Van Heerden i sur., 2007). Protok energije kroz fotosintetski sustav je promijenjen u stresnim uvjetima (Force i sur., 2003) što u ovom istraživanju nije slučaj.

Parametar ABS/RC predstavlja funkcionalnu veličinu antena kompleksa odnosno daje podatak o prosječnoj količini apsorbirajućih molekula klorofila, stoga povećanje ovoga parametra ukazuje na smanjenje broja aktivnih reakcijskih središta. Povećanje tog parametra vidljivo je u listovima biljaka uzgojenih u T3 supstratu. Naime, uslijed visokog protonskog gradijenta kroz tilakoidne membrane, dio aktivnih reakcijskih središta dobiva disipacijsku ulogu („utišana reakcijska središta“) pretvarajući violaksantin u zeaksantin i pri tome emitiraju energiju u obliku topline stoga DI<sub>0</sub>/RC raste (Critchley, 2000). Jednak protok energije kroz fotosustav u vidu povećanja ABS/RC i DI<sub>0</sub>/RC utvrđen je i pri stresu uzrokovanom kromom (Appenroth i sur., 2001) te u listovima osiromašenim fosforom (Lin i sur., 2009).

Iz prikazanih OJIP krivulja nisu vidljive promjene fluorescencije između kontrolnih biljaka i biljaka uzgojenih na troski, no vidljiv je statistički značajan pad intenziteta fluorescencije u koracima J i I na NPK i NPKT u odnosu na ostale supstrate. Porast fluorescencije u stupnjevima J i I zabilježen je i u odgovoru biljke na stres uzrokovanom kromom (Appenroth i sur., 2001), na stres zbog pomanjkanja fosfora (Lin i sur., 2009) te u listovima mutanta *Arabidopsis thaliana* s eliminiranim proteinom CYP38 (Lepeduš i sur., 2009).

Vrijednosti maksimalnog prinosa kvanta PSII u listovima biljaka uzgojenih na pokusnom polju nisu se međusobno bitno razlikovale. Kod indeksa fotosintetske učinkovitosti utvrđena je statistički značajna razlika jedino između T1 i T2 tretmana.

Usporedbom vrijednosti indeksa fotosintetske učinkovitosti (PI<sub>ABS</sub>) izmjerenih metodom polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* i vrijednosti intenziteta fotosinteze (FS) izmjerenih metodom izmjene plinova vidljivo je djelomično nepodudaranje rezultata o funkcionalnosti fotosinteze. Raskorak između rezultata dobivenih na temelju parametara PI<sub>ABS</sub> i FS posebice je vidljiv u biljkama uzgajanim u pijesku; parametar FS ukazuje na stimulativan učinak troske (posebice nižih količina troske) na fotosintezu u listovima biljaka uzgojenih u pijesku pri čemu je taj učinak sličan učinku NPK i NPKT. S druge strane, parametar PI pokazuje da troska nema utjecaj na fotosintezu za razliku od stimulativnog utjecaja NPK i posebice NPKT. To neslaganje rezultata manje je izraženo u slučaju biljaka uzgojenih u zemlji. Pri interpretaciji rezultata dobivenih pomoću te dvije metode treba uzeti u obzir da se one djelomice nadopunjavaju budući da indeks fotosintetske učinkovitosti odražava funkcionalnost fotosustava dok intenzitet fotosinteze odražava brzinu asimilacije CO<sub>2</sub>.

Razlog neslaganju rezultata je najvjerojatnije vremenski okvir izvođenja mjerenja na listovima graha. Parametri dobiveni metodom izmjene plinova mjereni su neposredno nakon isteka osam tjedana, a parametri dobiveni metodom polifaznog rasta fluorescencije klorofila *a* mjereni su tri tjedna kasnije odnosno nakon 11 tjedana (zbog nemogućnosti ranijeg mjerenja) te je moguće da je u biljkama uzgojenim uz dodatak troske već započeo proces starenja.

### 5.4. Pokazatelji oksidacijskog stresa

U biljkama izloženim stresnim uvjetima mijenja se aktivnost antioksidacijskih enzima koji uklanjaju suvišak reaktivnih oblika kisika i slobodnih radikala (ROS) iz stanice. ROS mogu prouzročiti oksidacijska oštećenja važnih biomolekula i struktura u biljnoj stanici što u konačnici oslabi rast i obranu biljke (Mittler, 2006; Lu i sur., 2007). Jedan od čestih stresora u biljci su povećane ili smanjene količine pojedinog makro- ili mikroelementa. U ovom istraživanju takav stresor su mogle predstavljati povećane količine željeza i drugih metala iz troske. Opseg oštećenja koji nastaje zbog utjecaja stresa ovisi o ravnoteži između oštećenja i procesa popravka tijekom stresa. Procesi popravka, točnije sinteza proteina *de novo*, najčešće je inhibirana zbog povećane količine ROS-a. Povećana količina željeza može potaknuti stvaranje singletnog kisika, superoksidnog radikala, vodikovog peroksida te hidroksilnog radikala, a najčešći je simptom peroksidacija membranskih lipida (Halliwell i Gutteridge, 1993). Kako bi smanjile i eliminirale nastala oštećenja stanice su 'opremljene' enzimskim i neenzimskim mehanizmima. Glavni zaštitni antioksidacijski enzimi su superoksid dismutaza (SOD), peroksidaze (POD) i katalaza (KAT).

Malondialdehid (MDA) je produkt lipidne peroksidacije i indikator je prisutnosti slobodnih radikala odnosno oksidacijskog stresa te pokazatelj oštećenja staničnih lipida (Ohkawa i sur., 1979). Istraživanja koja pokazuju utjecaj troske iz elektropeći na oksidacijski stres u biljci su malobrojna (Radić i sur., 2013). Autori tog istraživanja su utvrdili da dodatak troske u količini od 10 i 20 g / kg supstrata (mješavina pijeska i zemlje) ne uzrokuje lipidnu peroksidaciju u listovima kukuruza nakon osam tjedana tretmana. Ti su rezultati sukladni s rezultatima ovog istraživanja jer dodatak troske do količine od 20 g/kg supstrata (neovisno o vrsti supstrata) nije uzrokovao oštećenja lipidne komponente biomembrana u listovima graha nakon podjednakog razdoblja izlaganja (osam tjedana) što je vjerojatno povezano s činjenicom da se ioni iz troske sporo otpuštaju u tlo. No, sadržaj MDA bio je značajno povećan u listovima graha uzgajanim u supstratima s dodanim NPK, NPKT i T3 u odnosu na kontrolu. U

usporedbi s drugim tretmanima, u supstratu T3 (pijesak s najvećom količinom elektropećne troske) utvrđene su najveće količine željeza i ostalih metala iz troske, no obzirom da istovremeno nije utvrđen povećan sadržaj željeza u listovima graha, taj metal vjerojatno nije pridonio povećanju sadržaja MDA. Razlog povećanju lipidne peroksidacije pod utjecajem najveće količine upotrijebljene troske mogla bi biti povećana koncentracija aluminatnih aniona u tim supstratima čija je fitotoksičnost dokazana (Brautigam i sur., 2012). Povećani sadržaj MDA pod utjecajem najveće količine troske mogao bi biti i rezultat skupnog djelovanja teških metala (Cd, Pb, Cr) prisutnih u malim količinama u troski. Povećana količina teških metala dovodi do povećanja MDA što je slično rezultatima drugih autora (Sinha i Saxena, 2006; Singh i sur., 2006; Zhang i sur., 2007). Istraživanja Schalscha i sur. (1982) je pokazalo da metali iz tla tretiranog otpadnom vodom bogatom metalima s vremenom (tijekom niza godina) postaju manji dostupni biljkama jer se vežu s organskim tvarima ili precipitiraju u obliku metalnih oksida. Velika je vjerojatnost da bi se i veće količine željeza oslobođene u tlo tretirano s 40 g/kg troske (supstrat T3) vremenom vezale na organsku i/ili anorgansku tvar u tlu te na taj način postale manje dostupne za biljku.

Dodatak troske, NPK ili istovremeni dodatak troske i NPK u supstrat nije uzrokovao oksidacijsko oštećenje proteina u listovima graha, budući su vrijednosti sadržaja karbonila, (indikatora oksidacijskog oštećenja proteina) bile slične kontrolnim tijekom svih vegetacijskih sezona.

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji se smatra prvom linijom obrane od ROS, a Također se smatra najbržim enzimom, a njegova uloga je uklanjanje superoksidnog radikala te se na taj način smanjuje opasnost od nastanka mnogo reaktivnijeg hidroksilnog radikala (Arora i sur., 2002; Gill i Tuteja, 2010). Troska, izuzev u najvećoj količini (supstrat T3 tijekom dvije vegetacijske sezone), nije utjecala na aktivnost enzima SOD u listovima biljaka uzgojenih u pijesku u usporedbi s kontrolom. Iako je najveći sadržaj željeza izmjeren baš u supstratu T3, to se nije odrazilo i na sadržaj Fe u listovima graha (sličan kontrolnim vrijednostima) pa se može zaključiti da taj metal nije pridonio povećanoj aktivnosti SOD. Elektropećna troska sadrži 1,8% aluminija za kojeg je poznato da inducira aktivnost SOD (Subrahmanyam, 1998; Cakmak i Horst, 1991). Kao i u slučaju sadržaja MDA, povećana aktivnost SOD pod utjecajem najveće količine troske vjerojatno se, osim aluminiju, može pripisati sinergičkom djelovanju teških metala prisutnih u troski. Aktivnost enzima SOD bila je statistički značajno povećana (osim prve sezone) u listovima graha uzgojenog u pijesku s dodatkom NPK i dodatkom NPK i troske (NPKT). Ti se rezultati podudaraju s istraživanjem Zhou i sur. (2007) u kojem je utvrđen porast aktivnosti SOD, KAT i POD te intenziteta

fotosinteze u listovima kikirikija pod utjecajem NPK. Zanimljivo je da u pokusu na polju na aktivnost tog enzima nije utjecao dodatak troske ni umjetnog gnojiva ili njihove kombinacije. Sastojci umjetnog gnojiva s dodatkom Fe (NPK) a posebice troske u zemlji se vjerojatno vežu odnosno kompleksiraju s različitim organskim i anorganskim ligandima u tlu.

Ukoliko se superoksidni radikali ne uklone, u reakciji s  $H_2O_2$  nastaju iznimno reaktivni hidroksilni radikali, odgovorni za oštećenja lipida i proteina koji se nalaze u blizini njegove produkcije (Rinalducci i sur., 2008; Gill i Tuteja, 2010). Askorbat peroksidaza (APOD) je enzim s vrlo visokim afinitetom za  $H_2O_2$ . Smatra se da ima primarnu ulogu u prilagodbi biljaka na promjene intenziteta stresnih čimbenika te se uključuje u odgovor na stres već kod nižih koncentracija  $H_2O_2$  (Mittler i sur., 2004). Aktivnost APOD bila je povećana u biljkama uzgajanim u supstratu T2 prve sezone te biljkama u supstratu T3 svih sezona. To može ukazati da postoji učinkovit sustav za uklanjanje  $H_2O_2$  koji je pak produkt aktivnosti SOD. Povećanje aktivnosti APOD uslijed teških metala opisano je kod mnogih biljaka npr. kod medicinske biljke brahmi (Sinha i Saxena, 2006), uljane repice (Vansuyt i sur., 1997), špinata (Yoshimura i sur., 2000) i graha (Pekker i sur., 2002). Aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (POD) su se značajno smanjile u listovima graha s dodanom troskom u odnosu na kontrolne biljke prve godine pokusa te se nisu mijenjale u odnosu na kontrolu idućih godina niti u stakleniku niti na pokusnom polju. Ti enzimi osim u uklanjanju  $H_2O_2$  mogu sudjelovati i u uklanjanju ostalih radikala (superoksidnih i hidroksilnih), akumulacije teških metala, uklanjanja otrovnih spojeva tijekom ranjavanja i napada patogena i dr. (Passardi i sur., 2005). Zbog brojnih uloga nespecifične peroksidaze se smatraju multifunkcionalnim enzimima koji zbog mnogih specifičnih izoformi imaju ulogu u biljnoj stanici u fiziološkim procesima vezanim za rast i razvitak, ali i procesima aklimatizacije na stres. Sinha i Saxena (2006) su u svom istraživanju na biljci brahmi (*Bacopa monnieri*) ustanovili povećanje aktivnosti POD u korijenu, a smanjenje aktivnosti istog enzima u listu te zaključili da postoje potpuno drugi mehanizmi koje biljka koristi kao odgovore na uklanjanje ROS. Isti rezultati potvrđeni su i na korijenu i listu vodenog zumbula (Satyakala i Jamil, 1992) pod utjecajem kroma.

Na temelju pokazatelja oksidacijskog stresa može se zaključiti da troska u količinama od 10 i 20 g/kg supstrata (neovisno o vrsti supstrata) ne izaziva oksidacijski stres u listovima graha.

Na temelju rezultata izmjerenih fizioloških parametara u listovima, mahunama i zrnu graha uzgojenom uz dodatka troske i/ili umjetnog gnojiva ili bez njihova dodatka može se utvrditi:

- ❖ elektropečna troska u količini 10 i 20 g po kg supstrata poboljšava rast graha (visina, broj listova, broj mahuna, prinos mase suhe tvari) neovisno u supstratu
- ❖ elektropečna troska povećava električni konduktivitet i pH vrijednost tla te se može koristiti kao neutralizator kiselosti tla
- ❖ elektropečna troska poboljšava mineralne značajke tla te povećava sadržaj mjerenih hranjivih tvari u listovima, mahuni i zrnu (posebice u količini od 10 i 20 g troske/kg supstrata)
- ❖ dodatak elektropečne troske u supstrat povećava fotosintetsku aktivnost
- ❖ na temelju istraženih pokazatelja oksidacijskog stresa - indikatora oksidacijskog oštećenja lipida i proteina i aktivnosti antioksidacijskih enzima - nije utvrđena potencijalna fitotoksičnost elektropečne troske (u količini od 10 i 20 g troske/kg supstrata)
- ❖ usporedbom učinaka troske i NPK na rast i razvoj graha vidljivo je da je troska i učinkovitija od umjetnog gnojiva ili bar podjednako učinkovita kao umjetno gnojivo

Ukupni rezultati navode na zaključak da:

- se elektropečna troska može koristiti kao učinkovit anorganski poboljšivač tla
- je izvrstan i jeftin izvor makro- i mikroelemenata neophodnih za rast i razvoj biljaka te da može povećati prinos poljoprivrednih kultura
- se upotrebom troske u uzgoju poljoprivrednih kultura može smanjiti količina troske na deponijima gdje kao sekundarna sirovina (karakterizirana kao neopasan otpad) zauzima veliku površinu kao i upotreba primarne sirovine (gnojiva) čime bi se smanjila emisija CO<sub>2</sub> i ostalih štetnih tvari

- Abadia J (1992) Leaf responses to Fe deficiency: a review. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1699-1713.
- Abbaspour A, Kalbasi M, Shariatmadari H (2004) Effect of steel converter sludge as iron fertilizer and amendment in some calcareous soils. *Journal of Plant Nutrition* 27(2): 377-394.
- Abou Seeda M, EI-Aila HI, EI-Ashry S (2002) Assessment of basic slag as soil amelioration and their effects on the uptake of some nutrient elements by radish plants. *Bulletin of the National Research Centre (Egypt)* 27: 491-506.
- Adams F (1981) Nutritional imbalances and constraints to plant growth on acid soils. *Journal of Plant Nutrition* 4: 81-87.
- Adetunji MT (1994) Nitrogen application and underground water contamination in some agricultural soils of south western Nigeria. *Fertilizer Research* 37(2): 159-163.
- Alam S, Kamei S, Kawai S (2001) Amelioration of manganese toxicity in barely with iron. *Journal of Plant Nutrition* 24(9): 1421-1433.
- Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA, Quarmby C (1974) *Chemical analysis of ecological materials*. Blackwell Scientific Publications, Osney Mead, Oxford.
- Alva AK, Sumner ME (1990) Amelioration of acid soil infertility by phosphogypsum. *Plant and Soil* 128(2): 127-134.
- Anderson DL, Jones DB, Snyder GH (1987) Response of a rice-sugarcane rotation to calcium silicate slag on everglades histosols. *Agronomy Journal* 79(3): 531-535
- Anderson WB, Parkpian P (1984) Plant availability of an iron waste product utilized as an agricultural fertilizer on calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition* 7(1): 223-233.
- Anonymus (2005) Interno Izvješće Agronomskog fakulteta o rezultatima kemijske analize elektropećne troske kao poboljšivača tla. Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Sisak.
- Appenroth KJ, Stöckel J, Srivastava A, Strasser RJ (2001) Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements. *Environmental Pollution* 115: 49-64.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.
- Asada K (1992) Ascorbat peroxidase - a hydrogen peroxid-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.
- Baker NR, Oxborough K (2004) Chlorophyll fluorescence as a probe. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, Vol 19, str. 65-82.

- Baricova D, Pribulova A, Demeter P, Bul'ko B, Rosova A (2006) Utilizing of the metallurgical slag for production of cementless concrete mixtures. *Metalurgija* 45(3): 163-168.
- Belay A, Claassens AS, Wehner FC (2002) Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties, microbial components and maize yield under long-term crop rotation. *Biology and Fertility Soils* 35: 420-427.
- Bertamini M, Zulini L, Zorer R, Muthuchelian K, Nedunchezian N (2007) Photoinhibition of photosynthesis in water deficit leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) plants. *Photosynthetica* 45(3): 426-432.
- Bjorkman O, Demmig B (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.
- Bogdanović M, Velikonja N, Racz Z (1966) Priručnik za ispitivanje zemljišta. Knjiga I. Hemijske metode ispitivanja zemljišta. Jugoslavensko društvo za proučavanje zemljišta. Beograd.
- Bohn HL, McNeal BL, O'Connor GA (2001) Soil chemistry, 3rd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Boisvert S, Joly D, Carpentier R (2006) Quantitative analysis of the experimental O-J-IP chlorophyll fluorescence induction kinetics. Apparent activation energy and origin of each kinetic step. *FEBS Journal* 273: 4770-4777.
- Bradaškja B, Triplat J, Dobnikar M, Mirtič B (2004) A mineralogical characterization of steel-making slag. *Materials and Technology* 38(3-4): 205-208.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brautigan DJ, Rengasamy P, Chittleborough DJ (2012) Aluminium speciation and phytotoxicity in alkaline soils. *Plant Soil* 360(1): 187-196.
- Cakmak I (2005) The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 521-530.
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83(3): 463-468.
- Campbell WH (1988) Nitrate reductase and its role in nitrate assimilation in plants. *Physiologia Plantarum* 74(1): 214-219.



Campbell WH (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 277-303.

Carran RA (1991) Calcium magnesium imbalance in clovers: A cause of negative yield response to liming. *Plant and Soil* 134: 107-114.

Carrow RN, Waddington DV, Rieke PE (2001) Turfgrass soil fertility and chemical problems – assessment and management. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Castiglione S, Franchin C, Fossati T, Lingua G, Torrigiani P, Biondi S (2007) High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* L. cv. Villafranca). *Chemosphere* 67: 1117-1126.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.

Chaney R (1993) Zinc phytotoxicity. U: Robson, AD (ur.) Zinc in soils and plants: Proceedings of the International symposium on zinc in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, str. 135-150.

Cheng T, Allen HE (2001) Prediction of uptake of copper from solution by lettuce (*Lactuca sativa* Romance). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(11): 2544-2551.

Christen D, Schonmann S, Jermini M, Strasser RJ, Defago G (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 60: 504–514.

Coelho RG, Sgarbieri VC (1995) Nutritional evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) protein. In vivo versus in vitro procedures. *Journal of Food Biochemistry* 18: 297-309.

Cordell D, Drangert JO, White S (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* 19(2): 292-305.

Critchley C (2000) Photoinhibition. U: Raghavendra AS (ur.) Photosynthesis: A comprehensive treatise. Cambridge University Press, Cambridge, UK, str. 264-272.

De Ronde JA, Cress WA, Krüger GHJ, Strasser RJ, Van Staden J (2004) Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 1211-1224.

Drizo A, Forget C, Chapuis RP, Comeau Y (2006) Phosphorus removal by electric arc furnace steel slag and serpentinite. *Water Research* 40: 1547-1554.

Evans JR (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Physiology* 72: 297-302.

Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78: 9-19.

- European Slag Association (2006) Legal status of slags. Position paper. [http://www.euroslag.org/fileadmin/\\_media/images/Status\\_of\\_slag/Position\\_paper\\_Jan\\_2006.pdf](http://www.euroslag.org/fileadmin/_media/images/Status_of_slag/Position_paper_Jan_2006.pdf).
- Fauteux F, Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 249: 1-6.
- Feller U, Anders I, Mae T (2008) Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59(7): 1615-1624.
- Fernandez V, Del Rio V, Pumarino L, Igartua E, Abadia J, Abadia A (2008). Foliar fertilization of peach (*Prunus persica* L.) with different iron formulations: Effects on re-greening, iron concentration and mineral composition in treated and untreated leaf surfaces. *Scientia Horticulturae* 117(3): 241-248.
- Findenegg GR (1987) A comparative study of ammonium toxicity at different constant pH of the nutrient solution. *Plant and Soil* 103: 239-243.
- Flowers MD, Fiscus EL, Burkey KO, Booker FL, Dubois J-JB (2007) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. *Environmental and Experimental Botany* 61: 190-198.
- Fodor F (2002) Physiological responses of vascular plants to heavy metals U: Prasad MNV, Strzatkan K (ur.) *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands, str. 149-177.
- Force L, Critchley C, van Rensen JJS (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research* 78: 17-23.
- Gašpar J (2010) Učinak troske na rast i fiziološke procese suncokreta (*Helianthus annuus* L.). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59(2): 309-314.
- Ghanmi D, McNally DJ, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR (2004) Powdery mildew of *Arabidopsis thaliana*: a pathosystem for exploring the role of silicon in plant-microbe interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 189-199.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.
- Gojić M (2006) *Metalurgija čelika*. Denona d.o.o., Zagreb. Metalurški fakultet, Sisak.
- Govindjee (2004) Chlorophyll *a* fluorescence: A bit of basics and history U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, Vol.19, str.1-42.

- Griffin JJ, Ranney TG, Pharr DM (2004) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and carbohydrate content of *Illicium* taxa grown under varied irradiance. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(1): 46-53.
- Hagen SF, Solhaug KA, Bengtsson, Borge GIA, Bilger W (2006) Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. *Postharvest Biology and Technology* 41: 156-163.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1993) *Free radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hannam RJ, Ohki K (1988) Detection of manganese deficiency and toxicity in plants. U: Graham RD, Hannam RJ, Uren NC (ur.) *Manganese in Soils and Plants*. Proceedings of an International Symposium, University of Adelaide, South Australia, Kluwer Acad. Publ. 37-58.
- Haynes R, Goh K M (1978) Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews* 53: 465-510.
- He JZ, Zheng Y, Chen CR, He YQ, Zhang LM (2008) Microbial composition and diversity of an upland red soil under long-term fertilization treatments as revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Journal of Soils Sediments* 8: 349-358.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Heenan DP, Campbell LC (1981) Influence of potassium and manganese on growth and uptake of magnesium by soybeans (*Glycine max* L. Merr. cv. Bragg). *Plant and Soil* 61: 447-456.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiology* 100: 1547-1553.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42: 462-468.
- Hossain MD, Musa MH, Talib J, Jol H (2010) Effects of nitrogen, phosphorus and potassium levels on kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) Growth and photosynthesis under nutrient solution. *Journal of Agricultural Science* 2(2): 49-57.
- House WA (1999) The physico-chemical conditions for the precipitation of phosphate with calcium. *Environmental Technology* 20: 727-733.
- Huang ZA, Jiang DA, Yang Y, Sun JW, Jin SH (2004) Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* 42(3): 357-364.

- Inanaga S, Okasaka A, Tanaka S (1995) Does silicon exist in association with organic compounds in rice plant? *Soil Science and Plant Nutrition* 41 (1): 111-117.
- Jiang CD, Gao HY, Zou Q, Shi L (2007) Effects of iron deficiency on photosynthesis and photosystem II function in soybean leaf. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 33(1): 53-60.
- Japan Iron and Steel Federation (2011) World steel Annual Production. <http://www.jisf.or.jp/en/statistics/IISI/documents/annualtables2002-11.pdf>
- Joly D, Carpentier R (2007) The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 88: 43-59.
- Jones RW, Sheard RW (1972) Nitrate reductase activity: phytochrome mediation of induction in etiolated peas. *Nature* 238: 221-222.
- Kalyoncu RS (1997) Slag - Iron and Steel. United States Geological Survey Minerals Year Book, Annual Report 1997, str. 70.1-70.8.
- Karimian N, Kalbasi M, Hajrasouliha S (2012) Effect of converter sludge, and its mixtures with organic matter, elemental sulfur and sulfuric acid on availability of iron, phosphorus and manganese of 3 calcareous soils from central Iran. *African Journal of Agricultural Research* 7(4): 568-576.
- Khan Md. HR, Mukaddas AB, Syed MK, Blume H-P, Yoko O, Tadashi A (2007) Consequences of basic slag on soil pH, calcium and magnesium status in acid sulfate soils under various water contents. *Journal of Biological Sciences* 7: 896-903.
- Knezović Z, Matotan Z, Bevanda I, Sefo E, Majić A (2008) Korelacije između nekih gospodarski važnijih svojstava graha mahunara (*Phaseolus vulgaris* L.). *Sjemenarstvo* 25(2): 81-90.
- Kobayashi T, Yoshihara T, Jiang T (2003): Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* 119: 400-408.
- Kojima S, Bohner A, von Wirèn N (2006) Molecular mechanisms of urea transport in plants. *Journal of Membrane Biology* 212: 83-91.
- Kovacheva T, Pandev S, Jancheva D (1999) Promeni v aktivnostta na nitrarreduktazata pri orientalski tyutyun tertian s Tabex and Lactofol. U: Ignatov G (ur.) Postigenia i perspektivi na mineralnoto hranene i vodniya regim na rasteniayata. Bulgarian Academy of Science, Sofia, Vol. 1, str. 36-39.
- Krall JP, Edwards GE (1992) Relationship between photosystem II activity and CO<sub>2</sub> fixation in leaves. *Physiologia Plantarum* 86(1): 180-187.
- Kristen M, Erstad KJ (1996) Converter slag as a liming material on organic soils. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 10: 83-93.

- Kummerová M, Váňová L (2007) Chlorophyll fluorescence as an indicator of fluoranthene phototoxicity. *Plant Soil and Environment* 53(10): 430-436.
- Kumpiene J, Lagerkvist A, Maurice C (2008) Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments - a review. *Waste Management* 28: 215-225.
- Kurvits A, Kirkby EA (1980) The uptake of nutrients by sunflower plants (*Helianthus annuus*) growing in continuous flowing culture system, supplied with nitrate or ammonium as nitrogen source. *Zeitschrift für Pflanzenernährung Bodenkunde* 143: 140-149.
- Kühn M, Spiegel H, Lopez AF, Rex M, Erdmann R (2006) Sustainable agriculture using blast furnace and steel slags as liming agents. European Commission, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- Law RD, Crafts-Brandner SJ (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiology* 120: 173-182.
- Lazár D, Ilík P, Kruk J, Strzałka K, Nauš J (2005) A theoretical study on the effect of the initial redox state of cytochrome *b559* on maximal chlorophyll fluorescence level (*FM*): implications for photoinhibition of photosystem II. *Journal of Theoretical Biology* 233: 287-300.
- Lazcano C, Gómez-Brandón M, Revilla P, Domínguez J (2012) Short-term effects of organic and inorganic fertilizers on soil microbial community structure and function. *Biology and Fertility of Soils* 49(6): 723-733.
- Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Muller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F and Gojon A (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: Functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15: 2218-2232.
- Lepeduš H, Gaća V, Viljevac M, Kovač S, Fulgosi H, Šimić D, Jurković V, Cesar V (2011) Changes in photosynthetic performance and antioxidative strategies during maturation of Norway maple (*Acer platanoides* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 368-376.
- Lepeduš H, Hoško M, Žuna Pfeiffer T, Skenderović Babojelić M, Žanić M, Cesar V (2010) Preliminary study on the photosynthesis performance in leaves of two olive cultivars. *Periodicum Biologorum* 112(3): 259-261.
- Lepeduš H, Tomašić A, Jurić S, Katanić Z, Cesar V, Fulgosi H (2009) Photochemistry of PSII in CYP38 *Arabidopsis thaliana* deletion mutation. *Food Technology and Biotechnology* 47(3): 275-280.
- Lepeduš H, Viljevac M, Cesar V, Ljubešić N (2005) Functioning of the photosynthetic apparatus under low and high light conditions in chlorotic spruce needles as evaluated by *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Russian Journal of Plant Physiology* 52(2): 165-170.

- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478.
- Li L, Ana FT, Revel SM, Richard CG, Luan S (2001) A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2761-2775.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lillo C (2004) Light regulation of nitrate uptake, assimilation and metabolism. U: Amancio S, Stulen I (ur.) Nitrogen acquisition and assimilation in higher plants, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, str. 149-184.
- Lillo C, Appenroth K-J (2001) Light regulation of nitrate reductase in higher plants: Which photoreceptors are involved? *Plant Biology* 3: 455-465.
- Lillo C, Mayer C, Ruoff P (2001) The nitrate reductase circadian system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology* 125: 1554-1557.
- Lin ZH, Chen LS, Chen RB, Zhang FZ, Jiang HX, Tang N (2009) CO<sub>2</sub> assimilation, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. *BMC Plant Biology* 9: 43.
- Lin XG, Yin R, Zhang HY, Huang JF, Chen RR, Cao ZH (2004) Changes of soil microbiological properties caused by land use changing from rice-wheat rotation to vegetable cultivation. *Environmental Geochemistry and Health* 26 (2): 119-128.
- Lindsay WL (1979). *Chemical equilibria in soils*. John Wiley & Sons Inc. Wiley-Interscience Eds, New York, str. 41-43.
- Liu HC, Chen XM, Chen RY, Song SW, Sun GW (2008) Effects of magnesium deficiency on growth and photosynthesis of flowering Chinese cabbage. *Acta Horticulturae* 767: 169-174.
- Loneragan JF, Snowball K, Simmons WJ (1968) Response of plants to calcium concentration in solution culture. *Australian Journal of Agricultural Research* 19: 845-857.
- Long SP, Farage PK, Garcia RL (1996) Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in the field. *Journal of Experimental Botany* 47: 1629-1642.
- Long SP, Hällgren JE (1993) Measurement of CO<sub>2</sub> assimilation by plants in the field and laboratory. U: Hall DO, Scurlock JMO, Bolhar-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP (ur.) *Photosynthesis and productivity in a changing environment: a field and laboratory manual*. London, Chapman and Hall, str. 129-167.
- Longstreth DJ, Nobel PS (1980) Nutrient influences on leaf photosynthesis. Effect of nitrogen, phosphorus and potassium for *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiology* 65: 541-543.

- Lu P, Sang W-G, Ma K-P (2007) Activity of stress-related antioxidative enzymes in the invasive plant crofton weed (*Eupatorium adenophorum*). *Journal of Integrative Plant Biology* 49(11): 1555-1564.
- Malakouti MJ, Afkhami M (1999) The necessity to prevent potassium depletion in rice fields of northern regions. Soil and Water Research Institute. Technical publication, No. 62, Tehran, Iran.
- Marinari S, Masciandaro G, Ceccanti B, Grego S (2000) Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresource Technology* 72: 9-17.
- Marschner H (2012) Mineral nutrition of higher plants. 3rd edition. Academic Press, London.
- Marschner H, Dell B (1994) Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159: 89-102.
- Martinez M, Bernal P, Almela C, Velez D, Garcia-Agustin P, Serrano R, Navarro-Avino J (2006) An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere* 64: 478-485.
- Matijašić G, Žižek K (2009) Mikrovalna predobrada elektropećne troske u procesu usitnjavanja. U: Pičuljan K, Smolec S (ur.) XXI. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Knjiga sažetaka, Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, str. 234.
- Matković T, Matković P (2009) Fizikalna metalurgija I, Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Sisak.
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-662.
- Milford GFJ, Johnston AE (2007) Potassium and nitrogen interactions in crop production. International Fertiliser Society, Proceedings 615, York, UK.
- Miller AF (2004) Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology* 8: 162-168.
- Miller AJ, Cramer MD (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil* 274: 1-36.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11(1): 15-19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9(10): 490-498.
- Motz H, Geiseler J (2001) Products of steel slags an opportunity to save natural resources. *Waste Management* 21(3): 285-293.

- Murphy K, Hoagland L, Reeves P, Jones S (2008) Effect of cultivar and soil characteristics on nutritional value in organic and conventional wheat. Cultivating the future based on science, 2nd conference of the international society of organic agriculture research ISOFAR, Modena, Italy.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Narodne Novine (2003) Zakon o gnojivima i poboljšivačima tla. NN 163/03.
- Narodne novine (2000) Pravilnik o uvjetima i mjerama zaštite od ionizirajućih zračenja za obavljanje djelatnosti s radioaktivnim izvorima, članak 2., 140. i 141. NN 84/2000.
- Negim O, Eloifi B, Mench M, Bes C, Gaste H, Montelica-Heino M, Le Coustumer P (2010) Effect of basic slag addition on soil properties, growth and leaf mineral composition of beans in a Cu-contaminated soil. *Journal Soil and Sediment Contamination* 19(2): 174-187.
- Norvell WA, Lindsay WL (1982) Effect of ferric chloride additions on the solubility of ferric iron a near-neutral soil. *Journal of Plant Nutrition* 5: 1285-1295.
- Nowak O, Kuehn V, Zessner M (2003) Sludge management of small water and wastewater treatment plants. *Water Science and Technology* 48(11-12): 33-41.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry* 95: 351-358.
- Olensinki AA, Wolf S, Rudich J, Marani A (1989) The effect of nitrogen fertilization and irrigation frequency on photosynthesis of potato (*Solanum tuberosum*). *Annals of Botany* 64: 651-657.
- Owen AG, Jones DL (2001) Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 651-657.
- Papageorgiou GC, Tsimilli-Michael M, Stamatakis K (2007) The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: a viewpoint. *Photosynthesis Research* 94: 275-290.
- Parfitt RL (1978) Anion adsorption by soils and soil materials. *Advances in Agronomy* 30: 1-49.
- Parker DR, Zelazny LW, Kinraide TB (1988) Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxy-aluminum solutions. *Soil Science Society of America Journal* 52(2): 438-444.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24: 255-265.
- Pekker I, Tel-Or E, Mittler R (2002) Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Molecular Biology* 49(5): 429-438.



- Peregrina F, Mariscal I, Ordóñez R, González P, Terefe T, Espejo R (2008) Agronomic implications of converter basic slag as a magnesium source on acid soils. *Soil Science Society of America Journal*: 72(2): 402-411.
- Perl-Treves R, Perl A (2002) Oxidative stress: an Introduction. U: Inze D, Van Montagu M (ur.) *Oxydative Stress in Plants*. Taylor and Francis, London, str. 1-32.
- Pevalek-Kozlina B (2003) *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb.
- Prabhu AS, Fageria ND, Huber DM, Rodrigues FA (2007) Potassium and plant disease. U: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (ur.). *Mineral Nutrition and Plant Disease*. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, str. 57-78.
- Pszczolkowska A, Olszewski J, Plodzien K, Lapinski M, Fordonski G, Zuk-Golaszewska K (2002) Effect of mineral stress on productivity of selected genotypes of pea (*Pisum sativum* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 5(2): 1-7.
- Radić S, Crnojević H, Sandev D, Jelić S, Sedlar Z, Glavaš K, Pevalek-Kozlina B (2013) Effect of electric arc furnace slag on growth and physiology of maize (*Zea mays* L.). *Acta Biologica Hungarica* 64(4): 490-499.
- Randall PJ (1969) Changes in nitrate and nitrate reductase levels on restoration of molybdenum to molybdenum-deficient plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 20: 635-642.
- Ranjbarfordoei A, Samson R, van Damme P (2006) Chlorophyll fluorescence performance of sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] in response to salinity stress induced by NaCl. *Photosynthetica* 44(4): 513-522.
- Ranjbarfordoei A, Samson R, van Damme P (2011) Photosynthesis performance in sweet almond [*Prunus dulcis* (Miller) D. Webb] exposed to supplemental UV-B radiation. *Photosynthetica* 49(1): 107-111.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180: 169-181.
- Rastovčan-Mioč A (1996) *Efekti aktivacije troske elektropeći*. Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Rastovčan-Mioč A, Sofilić T, Grahek Ž (2002) Radioaktivne tvari u elektropečnoj troski. U: Koprivanac N (ur.), *Knjiga sažetak. I. Hrvatska konferencija. Ekoinženjerstvo 2002*. Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb 155-155.
- Rastovčan-Mioč A, Sofilić T, Mioč B (2006) Ispitivanje mogućnosti primjene elektropečne troske. U: Unkić F (ur.). *Proceedings Book of the 7<sup>th</sup> International Foundrymen Conference-Advanced Foundry Materials and Technology*. Faculty of Metallurgy, University of Zagreb, Sisak 1-9.

- Rastovčan-Mioč A, Sofilić T, Mioč B (2009) Application of electric arc furnace slag. U: Grilec K, Marić G (ur.) Proceedings matrib Vela luka otok / island Korčula, Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, Zagreb, Hrvatska, 436-444.
- Reddy KJ, Munn LC, Wang L (1997) Chemistry and mineralogy of molybdenum in soils. U: Gupta UC (ur.) Molybdenum in agriculture. Cambridge: Cambridge University Press, str.4-22.
- Regelja M (2002) Određivanje metala u eluatima troske. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Reynolds MP, Ewing EE, Owens TG (1990) Photosynthesis at high temperature in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology* 93: 791-797.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L (2008) Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 59 (14): 3781-3801.
- Rout G-R, Das P (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3-11.
- Roy AC, Ali MY, Fox RL, Silva JA (1971) Influence of calcium silicate on phosphate solubility and availability in Hawaiian latosols. *Proceedings of the International Symposium on Soil Fertility Evaluation, New Delhi, Vol 1, 757-765.*
- Samui RC, Bhattacharyya P, Dasgupta SK (1981) Uptake of nutrients by mustard (*Brassica juncea* L.) as influenced by zinc and iron application. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 29: 101-106.
- Sanchez PA, Swaminathan MS (2005) Cutting world hunger in half. *Science* 307: 357-359.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- Satyakala G, Jamil K (1992) Chromium induced biochemical changes in *Eichornia crassipes* (Mart) Solms and *Pistia stratiotes* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 48 921-928.
- Savant NK, Korndörfer GH, Datnoff LE, Snyder GH (1999) Silicon nutrition and sugarcane production: a review. *Journal of Plant Nutrition* 22(12): 1853-1903.
- Savci S (2012) An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development* 3(1): 77-80.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.
- Schalscha EB, Morales M, Vergara I, Chang AC (1982) Chemical fractionation of heavy metals in wastewater-affected soil. *Journal of the Water Pollution and Control federation* 54: 175-180.

- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2005) Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. *Biochimica and Biophysica Acta* 1706: 250-261.
- Schlegel T, Schönherr J, Schreiber L (2006) Rates of foliar penetration of chelated Fe(III): role of light, stomata, species and leaf age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 6809-6813.
- Schmidt W (1999) Review - Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 144: 1-26.
- Schock I, Gregan J, Steinhauser S, Schweyen R, Brennicke A, Knoop V (2000) A member of a novel *Arabidopsis thaliana* gene family of candidate Mg<sup>2+</sup> ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. *Plant Journal* 24: 489-501.
- Schreiber U (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) fluorimetry and saturation pulse method: An overview U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) Chlorophyll *a* fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration. Vol 19, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 279-319.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. U: Schulze i sur. (ur.) Ecophysiology of photosynthesis. Springer Study Edition Vol. 100. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 49-70.
- Shacter E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 32: 307-326.
- Shamim AH, Khan HR, Akae T (2008) Neutralizing capacity of basic slag in acid sulfate soils and its impacts on the solubility of basic cations under various moisture regimes. *Journal of the Faculty of Environmental Science and Technology Okayama University* 13(1): 67-74.
- Shao G, Chen M, Wang W, Mou R, Zhang G (2007) Iron nutrition affects cadmium accumulation and toxicity in rice plants. *Plant Growth Regulation* 136: 191-198.
- Shen J, Lixing Y, Junling Z, Haigang L, Zhaohai B, Xinping C, Weifeng Z, Fusuo Z (2011) Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* 156: 997-1005.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53; 1305-1319.
- Sinclair TR, Horie T (1989) Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop Science* 29: 90-98.
- Singh S, Eapen S, D'souza SF (2006) Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62: 233-246.

Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(8): 1340-1350.

Smethurst CF, Garnett T, Shabala S (2005) Nutritional and chlorophyll fluorescence responses of lucerne (*Medicago sativa*) to waterlogging and subsequent recovery. *Plant Soil* 270: 31-45.

Sofilić T, Brnardić I. (2013) *Gospodarenje otpadom*. Metalurški fakultet, Sisak, Sveučilište u Zagrebu.

Sofilić T, Merle V, Rastovčan-Mioč A, Ćosić M, Sofilić U (2010) Steel slag instead natural aggregate in asphalt mixture. *Archives of Metallurgy and Material* 55(3): 657-668.

Sofilić T, Mladenović A, Sofilić U (2009) Defining of EAF steel slag application possibilities in asphalt mixture production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management* 19(2): 148-157.

Sofilić T, Rastovčan-Mioč A, Cerjan-Stefanović Š (2004) Sorption of metal ions and thermodynamic parameters for the system electric arc furnace slag - metal ions. *Ljevarstvo* 45(3): 103-113.

Sönmez İ, Kaplan M, Sönmez S (2007) An investigation of seasonal changes in nitrate contents of soils and irrigation waters in greenhouses located in antalya-demre region. *Asian Journal of Chemistry* 19(7): 5639-5646.

Stancheva I, Mitova I, Petkova Z (2004) Effects of different nitrogen fertilizer sources on the yield, nitrate content and other physiological parameters in garden beans. *Environmental and Experimental Botany* 52: 277-282.

Stefanov D, Petkova V, Denev ID (2011) Screening for heat tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) lines and cultivars using *JIP*-test. *Scientia Horticulturae* 128: 1-6.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2000) The fluorescent transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. U: Yunus M, Pathre U, Mohanty P (ur.) *Probing photosynthesis: Mechanisms, regulation and adaptation*, Taylor and Francis, London, 445-483.

Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M (2004) Analysis of chlorophyll *a* fluorescence transient. U: Papageorgiou GC, Govindjee (ur.) *Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis: Advances in photosynthesis and respiration*. Vol 19, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 321-362.

Stribret A, Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 104(1-2): 236-257.

Sturgul SJ, Bundy LG (2004) *Understanding soil phosphorous: an overview of phosphorous, water quality and agricultural management practices*. Nutrient and Pest Management Program, University of Wisconsin-Madison, Madison WI.

Subramanian S, Copalswamy A (1990) Influence of silicate and phosphate materials on availability and uptake of silicon and phosphorous in acid soils. *Oryza* 27: 267-273.

Subrahmanyam D (1998) Effect of aluminium on growth, lipid peroxidation, superoxide dismutase and peroxidase activities in rice bean and French bean seedlings. *Indian Journal of Plant Physiology* 3(3): 240-242.

Tambussi EA, Bartoli CG, Guamet JJ, Beltrano J, Araus JL (2004) Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Science* 167: 19-26.

Terry N, Ulrich A (1974) Effects of magnesium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. *Plant Physiology* 54: 379-381.

Tiquia SM, Tam NFY (2000) Co-composting of spent pig litter and sludge with forcedaeration. *Bioresource Technology* 72: 1-7.

Torkashvand AM (2011) Effect of steel converter slag as iron fertilizer in some calcareous soils. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science* 61(1): 14-22.

Torkashvand MA, Kalbasi M, Shariatmadari H (2005) Effects of converter slag on some chemical characteristics of acid soils. *Journal of Science and Ttechnology of Agriculture and Natural Resources* 8: 55-62.

Torkashvand MA, Shadparvar S, Haghghat N (2012) The effect of two industrial by-products as liming factor on chemical properties of an acid soil. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences* 3(3): 654-659.

Torkashvand MA, Shahram SH (2007) Converter slag as a liming agent in the amelioration of acidic soils. *International Journal of Agriculture and Biology* 9(5): 715-720.

Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.

Van Heerden PDR, Swanepoel JW, Krüger GHJ (2007) Modulation of photosynthesis by drought in two desert scrub species exhibiting C3-mode CO<sub>2</sub> assimilation. *Environmental and Experimental Botany* 61: 124-136.

Vansuyt G, Lopez F, Inzé D, Briat JF, Fourcroy P (1997) Iron triggers a rapid induction of ascorbate peroxidase gene expression in *Brassica napus*. *FEBS Letters* 410: 195-200.

Vouk D, Malus D, Tedeschi S (2011) Muljevi s komunalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. *Građevinar* 63(4): 341-349.

Vukadinović V, Lončarić Z (1998) Ishrana bilja. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.

Walker D (1987) Fluorescence. U: The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxgraphics, Hill Institute, The University of Sheffield, Sheffield, UK, str. 17-46.

Wallace A, Frolich E, Lunt OR (1966) Calcium requirements of higher plants. *Nature* 209: 634.

Wang X, Cai Q-S (2006) Steel slag as an iron fertilizer for corn growth and soil improvement in a pot experiment. *Pedosphere* 16: 519-524.

Warman PR, Termeer WC (2005) Evaluation of sewage sludge, septic waste and sludge compost applications to corn and forage: Yields and N, P and K content of crops and soils. *Bioresource Technology* 96: 955-961.

Wei X-R, Hao M-D, Oiu L-P (2004) Effect of manganese fertilizer on photosynthesis of maize under soil drought condition. *Plant Nutrition and Fertilizer Science* 10(3): 255-258.

Welch RM (2002) The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant and Soil* 247: 83-90.

White PJ, Broadley MR (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* 92: 487-511.

Wintenborn JL, Green JJ (1998) Steelmaking slag: a safe and valuable product. The Steel Slag Coalition, National Slag Association, Washington, D.C.

Witte CP (2011) Urea metabolism in plants. *Plant Science* 180: 431-438.

Yan X, Wu P, Ling H, Xu G, Xu F, Zhang Q (2006) Plant nutriomics in China: an overview. *Annals of Botany* 98: 473-482.

Yang D, Zhang YL (2005) Effect of applied blast furnace slags on pH and silicon in rice plant. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 24: 446-449.

Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada H, Goto F (2006) Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25: 365-373.

Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* 123(1): 223-234.

Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). *Chemosphere* 67:44-50.

Zhang Q, Brown P (1999) The mechanism of foliar zinc absorption in pistachio and walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124: 312-317.

Zhou LY, Li XD, Tang X, Lin YJ, Li ZF (2007) Effects of different application amount of N, P, K fertilizers on physiological characteristics, yield and kernel quality of peanut. *Journal of Applied Ecology* 18(11): 2468-2474.

[http://www.asa-inc.org.au/Doc/ASA\\_Connections\\_Dec\\_2007.pdf](http://www.asa-inc.org.au/Doc/ASA_Connections_Dec_2007.pdf);

<http://www.nationalslag.org/slag-history>

Rođena je 08. lipnja 1974. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu (XV. Gimnaziju). Prirodoslovno-matematički fakultet, smjer Prof. biologije i kemije upisuje 1993. godine koji završava 1999. godine diplomom na Zavodu za fiziologiju bilja s diplomskim radom pod naslovom: Diferencijacija u kalusnome tkivu vrste *Allium commutatum* Guss. te uz stručno mentorstvo prof. dr. sc. Branke Pevalek Kozlina.

Godinu dana radi na zamjenama u osnovnim i srednjim školama, a stalno zaposlenje dobiva 2001. godine u Botaničkom vrtu PMF-a na radnom mjestu viši tehničar na kojem radi i danas.

Redovito se stručno usavršava kroz pohađanje radionica u Hrvatskoj i Europi (Madrid, Vacratot, Poznan). Do sada je objavila dva znanstvena članka u časopisima koje citira baza Current Contents, tri znanstvena rada s međunarodnom recenzijom, dva stručna rada s međunarodnom recenzijom, sudjelovala na osam međunarodnih i šest domaćih skupova gdje je svoja priopćenja objavila u knjigama sažetaka. Suradnica je na projektu: Natura 2000 Management and Monitoring (Croatia, EuropeAid/129749/D/SER/HR): Monitoring livadnog procjepka (*Chouardia litardierei*) u Hrvatskoj.

Također je objavila dva znanstveno popularna članka, sudjelovala u organizaciji i postavljanju osam izložbi u Botaničkom vrtu PMF-a, vodila nekoliko desetaka stručnih radionica za djecu i odrasle o sjetvi i pikiranju te vodila brojne stručne obilaske u Vrtu. Koautorica je knjige 'Pedeset znamenitosti Botaničkoga vrta. Obilazak za prolaznika, šetača i ljubitelja'.

Od 2000. godine radi kao simultani prevoditelj na znakovni jezik na Hrvatskoj radioteleviziji. Majka je dvoje djece.