

# Procjena fitotoksičnosti radioaktivnog otpada iz Kaštelanskog zaljeva

---

Neduhal, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:217:366834>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Valerija Neduhal

**Procjena fitotoksičnosti radioaktivnog otpada u  
Kaštelanskom zaljevu**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izvanredne profesorice dr. sc. Sandre Radić Brkanac, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

*Zahvaljujem voditeljici izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na iznimnoj susretljivosti, stručnosti i strpljenju tijekom izrade diplomskog rada i prekrasnoj radnoj atmosferi koja je obilježila moje studiranje.*

*Zahvaljujem dr.sc. Boženi Skoko na kvalitetnim uputama, savjetima i informacijama bez kojih ovaj rad ne bi bio isti.*

*Hvala svim profesorima Prirodoslovno-matematičkog fakulteta koji se trude od nas studenata stvoriti akademske građane i kolegicama uz koje je studiranje bilo lakše i ljepše.*

*Veliko hvala mojim roditeljima na beskompromisnoj podršci, ljubavi i svakoj zelenoj pošiljci u studentski dom. Hvala mojoj braći koji su utabali puteve kojima ja danas idem, baki na toplini doma i uji na svojoj pomoći. Hvala mom Denisu što vjeruje u mene. Bez vas ne bih bila tu gdje jesam.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Procjena fitotoksičnosti radioaktivnog otpada u Kaštelanskom zaljevu**

Valerija Neduhal

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

**Sažetak:** Područje Kaštelanskog zaljeva desetljećima je bilo središte industrijskih aktivnosti u Dalmaciji. U blizini bivše tvornice Jugovinil nalazi se napušteni deponij pepela i šljake s povećanom koncentracijom prirodnih radionuklida  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$  i  $^{210}\text{Pb}$ . Njihova prisutnost iznad dozvoljenih koncentracija može uzrokovati negativne posljedice na hranidbene mreže i predstavlja ugrozu za prirodne resurse poput podzemnih voda, morske obale i autohtonog biljnog pokrova. Cilj ovog rada bila je toksikološka procjena tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) sakupljenih s područja taložnice bivše tvornice. Kao indikatori toksičnosti mjereni su biokemijski pokazatelji toksičnosti - sadržaj malondialdehida, fotosintetskih pigmenata te aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX) i glutation-S-transferaze (GST). Rezultati istraživanja pokazali su statistički značajne razlike u sadržaju proteina, fotosintetskih pigmenata i aktivnosti pojedinih enzima u listovima tršlje, a posebice alepskog bora s lokacije Jugovinil u odnosu na biljke s kontrolne lokacije. Rezultati fitotoksikološke analize tršlje i alepskog bora ukazuju na negativan utjecaj odloženog pepela i šljake s povišenim koncentracijama prirodnih radionuklida na novonastale biljne zajednice.

**Ključne riječi:** radionuklidi, NORM, Jugovinil, pepeo, šljaka, toksičnost, alepski bor, tršlja

**Rad sadrži:** VII+50 stranica, 19 slika, 9 tablica, 90 referenci

**Jezik izvornog rada:** hrvatski

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici.

**Voditeljica rada:** dr.sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

**Ocjenitelji:**

izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

doc. dr. sc. Ivana Buj

prof. dr. sc. Blanka Cvetko Tešović

prof. dr. sc. Nenad Buzjak

**Rad je prihvaćen:** 28. Svibnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Master thesis

### **Phytotoxicity assessment of nuclear waste from Kaštela bay**

Valerija Neduhal

Roosevelt square 6, 10 000 Zagreb, Croatia

**Abstract:** For decades, the area around Kaštela bay was known as the center of industrial activities in Dalmatia County. Radioactive coal ash and slag with high  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$  values were illegally disposed around ex-chemical factory Jugovinil. High presence of these elements can cause negative consequences on food chains and natural resources like groundwater, sea coast and native plant species. The aim of this study was toxicological evaluation of pine (*Pinus helepensis* Mill.) and mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) collected from coal ash and slag landfill. The chlorophylls and carotenoids, malondialdehyde and enzyme activities (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase and glutathion-S-transferase) were used as biochemical toxicity indicators. The results showed statistically significant differences in relative protein and pigment abundance and individual enzyme activities in both pine and mastic tree leaves from contaminated location compared to those from control location. The results of phytotoxicity analysis of pine and mastic tree indicate negative influence of deposited coal ash and slag with elevated concentrations of naturally occurring radionuclides on newly formed plant communities.

**Key words:** radionuclides, NORM, Jugovinil, coal ash, slag, toxicity, mastic tree, pine tree

**Thesis contains:** VII+50 pages, 19 figures, 9 tables, 90 references

**Original language:** croatian

Thesis is deposited in the central biological library.

**Supervisor:** Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor

**Reviewers:**

Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. prof.

Dr. Ivana Buj, Asst. prof.

Dr. Blanka Cvetko Tešović, prof.

Dr. Nenad Buzjak, prof.

**Thesis accepted:** 28th of May, 2021.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Radioaktivnost .....	1
1.1.1. Prirodni radionuklidi .....	3
1.1.2. Prirodni radioaktivni materijali (NORM) .....	4
1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja .....	5
1.3. Učinak stresnih čimbenika na biljke .....	8
1.4. Indikatori toksičnosti .....	9
1.4.1. Fotosintetski pigmenti .....	10
1.4.2. Lipidna peroksidacija i MDA .....	11
1.4.3. Sadržaj proteina .....	12
1.4.4. Aktivnost antioksidacijskih enzima .....	12
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	14
<b>3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA</b> .....	15
3.1. Geografski položaj i klima .....	15
3.2. Geološka podloga i tlo .....	15
3.3. Hidrologija .....	17
3.4. Flora i fauna .....	18
3.5. Lokacije uzorkovanja .....	20
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
4.1. Biljni materijal .....	22
4.1.1. Tršlja ( <i>Pistacia lentiscus</i> L.) .....	22
4.1.2. Alepski bor ( <i>Pinus halepensis</i> Mill.) .....	23
4.2. Metode .....	24
4.2.1. Priprema uzoraka .....	24
4.2.2. Određivanje sadržaja pigmenata .....	24
4.2.3. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima .....	25
4.2.4. Određivanje malondialdehida i drugih aldehida .....	28
4.2.5. Statistička obrada podataka .....	28
<b>5. REZULTATI</b> .....	29
5.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata .....	29
5.2. Relativni sadržaj proteina .....	30

5.3. Sadržaj malondialdehida i ostalih aldehida .....	31
5.4. Aktivnost enzima .....	32
5.5. Pearsonov koeficijent korelacije .....	35
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>36</b>
<b>7. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>41</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
<b>ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>49</b>
<b>PRILOZI.....</b>	<b>50</b>



## POPIS KRATICA

**A** – koncentracija aktivnosti

**A** – nukleonski broj

**APX** – askorbat peroksidaza

**AsA** – askorbinska kiselina

**ATSDR** – Agencija za toksične tvari i registar bolesti (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

**CAT** – katalaza

**CDNB** – 1-kloro-2,4-dinitrobenzen

**EDTA** – etilendiaminotetraoctena kiselina

**EtOH** – etanol

**E<sub>v</sub>** – ukupna energija vezanja

**GPX** – glutation peroksidaza

**GSH** – glutation

**GST** – glutation S-transferaza

**IAEA** – Međunarodna agencija za atomsku energiju (International Atomic Energy Agency)

**MDA** – malondialdehid

**MDHA** – monodehidroaskorbinska kiselina

**NBT** – nitrotetrazolijevo plavilo

**NORM** – prirodno radioaktivni materijali (naturally occurring radioactive material)

**PVC** – polivinil klorid

**PVPP** – polivinilpolipirolidon

**ROS** – reaktivni oblici kisika (reactive oxygen species)

**SI** – međunarodni sustav jedinica ( franc. Systéme International d'Unités)

**SOD** – superoksid dismutaza

**SRAO** – srednje radioaktivni otpad

**T<sub>1/2</sub>** – vrijeme poluraspada

**TBA** – tiobarbituratne kiselina

**VCM** – vinilklorid monomer

**VRAO** – visoko radioaktivni otpad

# 1. UVOD

## 1.1. Radioaktivnost

Otkrićem radioaktivnog zračenja 1896. francuski fizičar Antoine Henri Becquerel postavio je temelje nuklearne fizike. Istražujući fosforescenciju u uranijevim solima slučajno je došao do spoznaje da uranijeve soli samostalno proizvode zračenje koje je prozvao radioaktivnošću, među prvima time zasluživši Nobelovu nagradu za fiziku 1903. Godine, zajedno s Marie i Pierrom Curie. Radioaktivnost je svojstvo spontane transformacije nestabilnih atomskih jezgri, pri čemu se višak energije oslobađa emitiranjem radioaktivnog zračenja. Spontane promjene nestabilnih jezgri nazivaju se radioaktivni raspadi, a svi atomi čije se jezgre raspadaju nazivamo radionuklidima. Svaki radionuklid ima karakteristično vrijeme poluraspada ( $T_{1/2}$ ), odnosno vrijeme za koje se broj atoma smanji za polovinu početne vrijednosti. Jedan raspad jezgre u sekundi definicija je SI jedinice za aktivnost te je prigodno imenovana bequerel (Bq).

Radioaktivnost je pojava koju vežemo uz stabilnost atomske jezgre. Jaka nuklearna sila koja drži protone (Z) i neutrone (N) na okupu u jezgri izrazito je snažna zbog odbojnih sila koje vladaju između pozitivno nabijenih protona. Te odbojne sile moraju biti prevladane kako bi jezgra bila stabilna. Jaka nuklearna energija ili ukupna energija vezanja izražena je kao razlika između ukupnog zbroja masa svih protona i neutrona kada bi bili slobodni i mase koju imaju kada su vezani unutar jezgre jer je masa atomske jezgre manja od zbroja masa njenih dijelova. Taj fenomen zovemo defekt mase ( $\delta m$ ).

$$m(Z + N) = (Zm_p + Nm_n) - \delta m$$

$m(Z + N)$  – masa jezgre

$(Zm_p + Nm_n)$  – zbroj masa slobodnih protona i neutrona

$\delta m$  – defekt mase

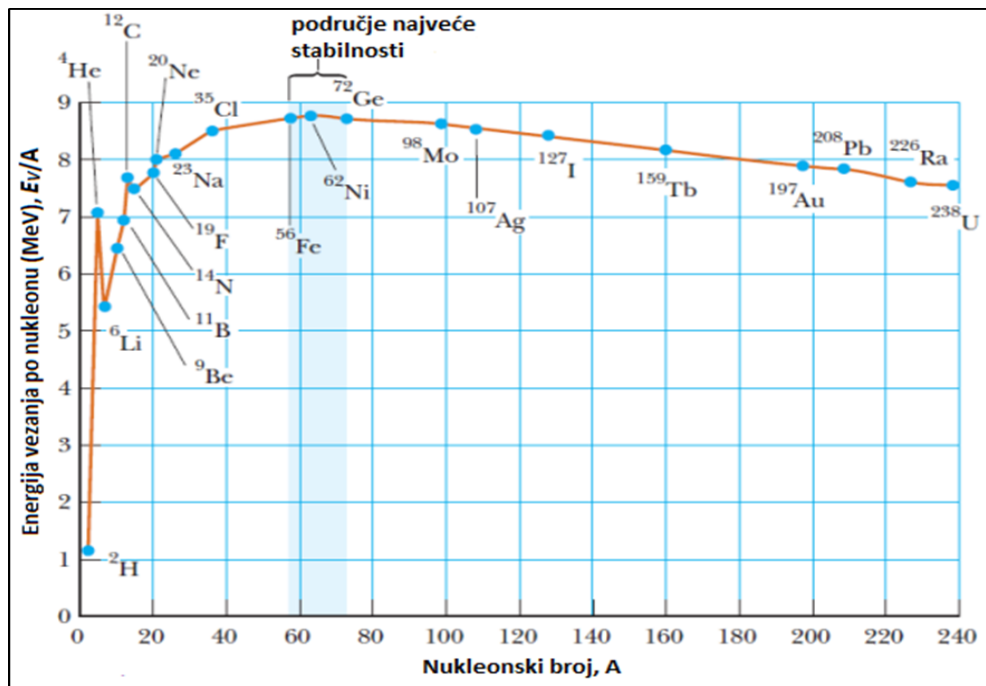
Prema Einsteinovoj teoriji o ekvivalentnosti mase i energije može se zaključiti da stabilnost jezgre raste sa ukupnom energijom vezanja ( $E_v$ ), odnosno energijom koju je potrebno uložiti za razlaganje jezgre. Što je energija vezanja veća, i stabilnost jezgre je veća.

$$E_v = \delta m \times c^2$$

$E_v$  – ukupna energija vezanja

$c = 3 \times 10^8 \text{ms}^{-1}$  – brzina svjetlosti

Dijeljenjem ukupne energije vezanja s nukleonskim brojem ( $A$ ) dobije se energija vezanja po nukleonu ( $E_v/A$ ), odnosno srednja energija potrebna za odvajanje jednog nukleona iz jezgre (Slika 1).



**Slika 1.** Dijagram ovisnosti energije vezanja po nukleonu o nukleonskom broju (Izvor: [www.fizika.unios.hr](http://www.fizika.unios.hr) 05-Nuklearna fizika predavanje)

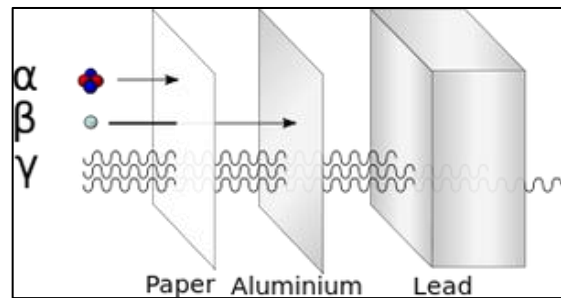
Energija vezanja po nukleonu najveća je za nuklide nukleonskog broja  $\approx 60$  i tada je jezgra najstabilnija. Kod masivnijih jezgri energija vezanja po nukleonu postaje premala da bi zadržala teške i jednako nabijene protone na okupu te jezgra postaje nestabilna. Radioaktivnost je nuklearni proces, stoga tvari i energija otpušteni tijekom tog procesa potječu iz jezgre.

Prilikom radioaktivnog raspada može nastati nekoliko vrsta ionizirajućeg zračenja, odnosno alfa, beta i gama zračenje (Tablica 1). Teške jezgre oslobađaju alfa ( $\alpha$ ) čestice jednake jezgri atoma helija ( $\text{He}^{2+}$ ) koje karakterizira relativno velika masa u usporedbi s drugim česticama. Radiološki efekt  $\alpha$  čestica na žive organizme izrazito je štetan zbog velike snage ionizacije, ali samo ukoliko se nađe unutar organizma jer je inače kratkog dosega. Beta ( $\beta$ ) čestice ekvivalentne su elektronima, međutim razlika je u tome što one potječu iz jezgre, a elektroni se nalaze u elektronskom omotaču. Emitiraju se kada postoji prevelik nesrazmjer u omjeru protona i neutrona u jezgri. Lakše su i prodornije od  $\alpha$  čestica, ali nemaju visoko izraženu biološku štetnost. Ovisno o tome emitira li se prilikom raspada elektron ili pozitron, razlikuje se  $\beta^+$  i  $\beta^-$  raspad. Gama ( $\gamma$ ) zračenje nastaje kada jezgra koja je već doživjela  $\alpha$  ili  $\beta$  raspad ostane u pobuđenom stanju, te pri povratku u niže energetske stanje emitira visokoenergetske  $\gamma$  fotone bez mase i energije.  $\gamma$  zračenje ima najveću dubinu prodiranja te pokazuje vanjsku i unutrašnju biološku destruktivnost zbog čega je potreban olovni štiti

debljine nekoliko centimetara da bi se zračenje smanjilo na prihvatljivu razinu (Slika 2). Iako su najopasnije,  $\gamma$  zrake imaju široku primjenu u medicini i industriji.

**Tablica 1.** Primjeri  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  raspada

<b><math>\alpha</math> raspad</b>	${}^{238}_{92}\text{U} \rightarrow {}^{234}_{90}\text{Th} + {}^4_2\text{He}$
<b><math>\beta^-</math> raspad</b>	${}^{14}_6\text{C} \rightarrow {}^{14}_7\text{N} + e^- + \bar{\nu}$ antineutrino
<b><math>\beta^+</math> raspad</b>	${}^{11}_6\text{C} \rightarrow {}^{11}_5\text{B} + e^+ + \nu$ neutrino
<b><math>\gamma</math> raspad</b>	${}^{226}_{88}\text{Ra} \rightarrow {}^{226}_{88}\text{Ra} + \gamma$



**Slika 2.** Prodor  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  čestica (izvor:

<https://apsorpcijagamazraka.wordpress.com/radioaktivnost/>)

Energija ionizirajućeg zračenja predana materiji po jedinici mase naziva se apsorbiranom dozom (SI jedinica gray, Gy). Kronična izloženost višim dozama radionuklida dovodi do produkcije slobodnih radikala i oksidativnog stresa.

### 1.1.1. Prirodni radionuklidi

Prirodna radioaktivnost prisutna je svuda oko nas, od zraka kojeg udišemo, hrane i vode koju unosimo u organizam do tla na kojem stojimo. Za razliku od antropogenih izvora zračenja poput radioaktivnih izotopa korištenih u industriji, medicini i energetici, postoje radionuklidi koji se prirodno nalaze na Zemlji od njenog postanka, a nazivamo ih prirodnim radionuklidima. Prema nastanku dijele se na radionuklide koji su oduvijek prisutni na Zemlji te imaju dugo vrijeme poluraspada (npr.  ${}^{238}\text{U}$ ,  ${}^{235}\text{U}$ ,  ${}^{232}\text{Th}$ ,  ${}^{40}\text{K}$ ), na njihove produkte raspada (npr.  ${}^{222}\text{Rn}$ ,  ${}^{226}\text{Ra}$ ) i na kozmičke radionuklide nastale kao rezultat visokoenergetskog zračenja iz svemira (npr.  ${}^{14}\text{C}$ ,  ${}^3\text{H}$ ,  ${}^7\text{Be}$ ). Radioaktivni elementi detektiraju se uz pomoć gaspektrometra koji mjeri raspodjelu intenziteta  $\gamma$  zračenja.

${}^{92}\text{U}$  Uranij u prirodi pronalazimo kao mješavinu četiri izotopa, s najvišim udjelom  ${}^{238}\text{U}$ . Većina uranovih izotopa raspada se  $\alpha$  raspadom (Skoko 2014a). Uranij je široko rasprostranjen radioaktivan metal iz skupine aktinoida. U elementarnom stanju je mekan, težak metal bijele boje i srebrnastog sjaja, a usitnjen reagira s vodom. Prilikom zagrijavanja dolazi do tvorbe uranijevog oksida  $\text{U}_3\text{O}_8$ . Također reagira s dušikom, halogenim elementima, klorovodikom i sumporom. U Zemljinoj kori pronalazimo ga u rudama poput uranovog smolinca, uranita,  $\text{UO}_2$  i kleveita (Opća enciklopedija 1977). Iz tla, u kojeg može dospjeti iz zraka i vode, uranij mogu apsorbirati biljke, a sadržaj u njima ovisi o biljnoj vrsti i dubini korijenja (Rozgaj 1982).

${}^{88}\text{Ra}$  Radij je vrlo rijedak element i najteži zemnoalkalijski metal. Najrasprostranjeniji izotop je  ${}^{226}\text{Ra}$ . Nastaje kao proizvod raspada uranija te je prisutan u njegovim rudama. U čistom obliku je bijele boje i metalnog sjaja, a na zraku brzo potamni zbog stvaranja nitrida.

Elektropozitivan je te reagira s vodom. Radioaktivnim raspadom emitira  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  zračenje stoga je izrazito toksičan (Opća enciklopedija 1977). Pokazuje sposobnost biokoncentracije i bioakumulacije u biljnim i životinjskim organizmima nakupljajući se kroz hranidbeni lanac (ATSDR 1990). Ovisno o vrsti biljke i tipu tla, može se lako apsorbirati u biljni organizam (Rayno 1983).

**${}_{90}^{A}\text{Th}$**  Torij je aktinoid izražene mekoće i srebrnobijele boje. Od četiri glavna izotopa, najzastupljeniji je  ${}^{232}\text{Th}$ , a najčešće se pojavljuje u obliku ruda monazita i torita. Elektropozitivan je i relativno postojan na zraku (Opća enciklopedija 1977). U vodi su topljivi torijevi spojevi u obliku klorida, fluorida, nitrata i sulfata što ga čini biodostupnim u vodenim okolišima. Do biljaka može doći ukoliko je tlo kontaminirano česticama torija, najčešće u blizini rudnika, tvornica ili nuklearnih elektrana (ATSDR 2015). Radioaktivnim raspadom emitira  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  zračenje što ga čini vrlo opasnim.

**${}_{19}^{A}\text{K}$**  Kalij je alkalijski metal srebrnobijele boje i izražene mekoće. Sedmi je najzastupljeniji element u Zemljinoj kori kojeg pronalazimo u sastavu minerala poput feldspata koji čine 60% Zemljine kore. Kalij je prijeko potreban element svih biljnih i životinjskih organizama zbog svojih uloga u aktivaciji enzima i regulaciji permeabilnosti membrana (Opća enciklopedija 1977). Kalij ima važnu ulogu u fotosintezi, floemskom transportu asimilata, metabolizmu dušika te otpornosti biljaka na stres (Vukadinović i Vukadinović 2011). Od tri prirodna izotopa, samo je  ${}^{40}\text{K}$  radioaktivan te može biti apsorbiran u biljna i životinjska tkiva. No, kako su živi organizmi evoluirali uz njegovu prisutnost, uobičajene koncentracije  ${}^{40}\text{K}$  ne predstavljaju radiološki rizik (Skoko 2014a). Intenzitet fiksacije K u nekom tlu ovisi o sadržaju i sastavu glina jer kalijevi ioni koji se nalaze na rubovima minerala glina lako mogu biti zamjenjeni radioaktivnim kalijem koji tada postaje pristupačan za biljku (Johnston 2003).

### 1.1.2. Prirodni radioaktivni materijali (NORM)

Koncentracije radionuklida u prirodi generalno su niske. Međutim, svi spojevi i rude koji sadrže prirodne radionuklide i koriste se u industriji podložni su koncentriranju u nusproduktima proizvodnih procesa poput letećeg pepela i šljake tijekom sagorijevanja ugljena bogatog radionuklidima. Ovisno o koncentraciji aktivnosti (A), neki od nusprodukata mogu se smatrati radioaktivnim materijalima koji se prirodno pojavljuju (NORM – naturally occurring radioactive material) (Norm4building 2017). NORM je prirodna tvar u kojoj je koncentracija pojedinih radionuklida promijenjena ljudskim djelovanjem izvan nuklearnog gorivnog ciklusa tako da su koncentracije aktivnosti radionuklida koje sadrži takva radioaktivna tvar iznad granice koju pravilnikom propisuje ravnatelj Državnog zavoda za radiološku i nuklearnu sigurnost Republike Hrvatske. To su prirodni materijali koji sadrže povišenu koncentraciju radionuklida nastalu zbog korištenja tehnoloških postupaka (NN 125/2014). Procesu najčešće povezani sa stvaranjem NORM-a su rudarenje i prerada ruda, geotermalne elektrane, proizvodnja i spaljivanje ugljena, nafte i plina, ekstrakcija i purifikacija vode te proizvodnja umjetnih gnojiva poput fosfata (IAEA 2020). Primjerice, udio nesagorivog ostatka prilikom sagorijevanja ugljena diktira koncentraciju radionuklida unutar

njega te doseže do deset puta veću vrijednost u odnosu na čisti ugljen (Barišić i sur. 2002). Na taj način ljudskom aktivnošću dolazi do promjene fizikalnih i kemijskih svojstava materijala, a time i do akumuliranja NORM-a.

NORM je opisan u Strategiji zbrinjavanja radioaktivnog otpada, iskorištenih izvora i istrošenog nuklearnog goriva iz 2014. godine koja prepoznaje tri lokacije u Republici Hrvatskoj gdje se nalaze radioaktivni materijali koji moraju biti pod regulatornim nadzorom. To su lokacije Plomin, Kutina i Kaštel Sućurac na području bivše tvornice Jugovinil. Direktivom Vijeća Europske unije o osnovnim sigurnosnim standardima za zaštitu od opasnosti koje potječu od izloženosti ionizirajućem zračenju iz 2013. godine propisuje se način postupanja s već postojećim NORM-om i onim koji će tek nastati. S obzirom da NORM ne spada u kategorije visoko i srednje radioaktivnog otpada (VRAO i SRAO), zbrinjavanje prirodnih radioaktivnih materijala provodi se na lokaciji na kojoj se ti materijali nalaze, a programi sanacije moraju biti usklađeni sa rezultatima odgovarajućih analiza rizika za zdravlje i okoliš. Prilikom izrade programa sanacije potrebno je razmotriti mogućnost ponovne upotrebe onih prirodnih radioaktivnih materijala koji se mogu osloboditi regulatornog nadzora (Prlić 2015). Dobar primjer ponovne upotrebe materijala je korištenje pepela i šljake nastalih izgaranjem ugljena u termoelektranama za proizvodnju građevinskog materijala (NN 125/2014).

## 1.2. Pregled dosadašnjih istraživanja

Oreščanin i sur. (2006) istraživali su kemijska, radiološka i svojstva ispiranja šljake i pepela proizvedenih u tvorničkoj termoelektrani Jugovinil. Zaključili su da tamošnji pepeo i šljaka pokazuju značajnu varijabilnost kemijskog sastava i aktivnosti odabranih radionuklida ( $^{40}\text{K}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{238}\text{U}$ ) u 33 promatrana uzorka zbog različitog podrijetla ugljena koji se koristio kao gorivo. Srednje koncentracije elemenata na lokaciji Jugovinil bile su 1,5 do 36 puta više od referentnog tla, s najvećim odstupanjima za U, Ni, V i Sr. Aktivnosti  $^{226}\text{Ra}$  i  $^{238}\text{U}$  u šljaci i pepelu bile su oko 50 puta veće u odnosu na referentno tlo, a ukupni U je pokazao velik potencijal ispiranja s morskom vodom i slabim organskim kiselinama.

Istražujući radioaktivnost Kaštelanskog zaljeva, Skoko (2014a, 2014b) navodi da su prosječne koncentracije aktivnosti  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  i  $^{226}\text{Ra}$  u pepelu i šljaci na istraživanom deponiju (taložnici) Jugovinila mnogostruko veće od prosječnih vrijednosti za kontrolno tlo na Čiovu (Tablice 2 i 3) dok koncentracije aktivnosti  $^{232}\text{Th}$  i  $^{40}\text{K}$  nisu značajno povišene.

**Tablica 2.** Koncentracije aktivnosti prirodnih radionuklida ( $Bqkg^{-1}$ ) u uzorcima pepela i šljake (izvor: Skoko 2014a)

Broj uzorka	Koncentracija aktivnosti ( $Bqkg^{-1}$ )				
	$^{238}U$	$^{235}U$	$^{226}Ra$	$^{232}Th$	$^{40}K$
1	1153	131	1295	65	236
2	1398	94,3	1544	68,3	273
3	912	64,1	1067	40,6	233
4	587	44,5	692	40,8	217
5*	20	1,4	25	19	282
6	405	28,9	523	24	172
7	1046	47	1203	74	452
8	722	43,4	770	63,5	423
9	1187	67	1238	62	309
10	1108	84	1244	55	237
11	963	47	946	56,5	182
Statistički pokazatelji					
AM $\pm$ SD	948 $\pm$ 301	65 $\pm$ 31	1052 $\pm$ 316	55 $\pm$ 15	274 $\pm$ 95
GM $\pm$ GSD	896 $\pm$ 1	60 $\pm$ 2	1004 $\pm$ 1	52 $\pm$ 1	260 $\pm$ 1
Raspon	587-1398	29-131	523-1544	24-74	172 - 452
Osjenčane su maksimalne izmjerene vrijednosti.					

**Tablica 3.** Koncentracije aktivnosti prirodnih radionuklida ( $Bqkg^{-1}$ ) u kontrolnim uzorcima tla (Čiovo) (izvor: Skoko 2014a)

	Koncentracija aktivnosti ( $Bqkg^{-1}$ )				
	$^{238}U$	$^{235}U$	$^{226}Ra$	$^{232}Th$	$^{40}K$
1	23,6	1,8	33,2	26,2	332
2	40	2,9	37,5	30,3	269
3	92	6,1	120	73,3	526
4	46	2,9	56,6	45,1	469
5	51	2,5	36,1	39,3	561
6	69	4,6	64,2	68,6	503
Statistički pokazatelji					
AM $\pm$ SD	54 $\pm$ 24	3 $\pm$ 1	58 $\pm$ 33	47 $\pm$ 20	444 $\pm$ 116
GM $\pm$ GSD	49,1 $\pm$ 1,5	3,45 $\pm$ 0,04	52 $\pm$ 2	44 $\pm$ 1	429 $\pm$ 1
Raspon	23,6 - 92	1,8 - 6,1	33,2 - 120	26,2 - 73,3	269 - 561
Osjenčane su maksimalne izmjerene vrijednosti.					

Također, Skoko u svom radu iz 2017. istražuje prijenos  $^{238}U$ ,  $^{235}U$  i  $^{226}Ra$ ,  $^{232}Th$  i  $^{40}K$  iz pepela i šljake u biljke na lokaciji Jugovinil. Utvrdila je da, unatoč tome što u pepelu i šljaci postoji povećana koncentracija aktivnosti  $^{238}U$ ,  $^{235}U$  i  $^{226}Ra$ , biljke s taložnice sadržavaju samo povećanu koncentraciju  $^{226}Ra$ . Također, zaključuje da koncentracijski omjeri između biljaka i

medija na kojem rastu nisu intuitivni. Naime, usprkos tome što je u pepelu i šljaci (mediju na kojem također rastu biljke) prisutna veća koncentracija aktivnosti radionuklida nego na kontrolnom (uobičajenom) tlu, biljke ih akumuliraju manje u odnosu na količinu koja im je dostupna, osim za  $^{40}\text{K}$  koji pokazuje obrnut trend. Dakle, iako je biodostupnost radionuklida značajno veća u pepelu i šljaci, bioakumulacija se ne povećava proporcionalno s tim vrijednostima. Iz tog razloga rezultati koji pokazuju povećane koncentracije aktivnosti radionuklida u mediju ne moraju nužno značiti da biljke akumuliraju ekvivalentnu količinu. Koncentracije aktivnosti pojedinih radionuklida u biljkama na lokaciji Jugovinil pojavljuju se prema sljedećem nizu:  $^{40}\text{K} > ^{226}\text{Ra} > ^{238}\text{U} > ^{235}\text{U} > ^{232}\text{Th}$  (Tablica 4) i značajno su manje od koncentracija aktivnosti koje se nalaze u mediju. Maksimalna koncentracija aktivnosti  $^{226}\text{Ra}$  u biljkama s kontrolnog područja (Tablica 5) znatno je niža u odnosu na biljke s taložnice dok su koncentracije aktivnosti  $^{40}\text{K}$ ,  $^{238}\text{U}$  i  $^{232}\text{Th}$  bliske s rezultatima na lokaciji Jugovinil. Aktivnost  $^{235}\text{U}$  u nekim biljkama bila je ispod granice detekcije.

**Tablica 4.** Koncentracije aktivnosti prirodnih radionuklida u samoniklim biljkama taložnice. Crvenim kvadratom označene su biljke korištene u fitotoksikološkoj analizi (izvor: Skoko 2014a)

Vrsta biljke	Koncentracija aktivnosti ( $\text{Bqkg}^{-1}$ )				
	$^{238}\text{U}$	$^{235}\text{U}$	$^{226}\text{Ra}$	$^{232}\text{Th}$	$^{40}\text{K}$
Bor	1,55	0,070	0,43	0,090	67,4
Brnistra	0,45	0,0133	0,37	< 0,06	102
Čempres	0,67	0,0367	0,84	0,20	125,0
Ljepljivi oman	0,56	0,0614	3,0	0,48	92
Oštri šit	0,66	0,158	5,4	0,43	120,9
Kupina	1,21	0,0132	5,3	< 0,06	87
Oleandar	0,46	0,13	5,7	0,47	199
Smokva	0,39	0,078	2,2	0,60	167
Tamaris	1,67	0,0212	0,2	0,25	118
Pitospor	1,78	1,27	48	1,2	262
Trava	1,1	0,10	2,6	0,22	93,8
Trska	0,71	0,1291	3,2	0,46	31,6
Tršlja	0,77	0,067	2,2	0,26	124
Statistički pokazatelji					
GM $\pm$ GSD	0,8 $\pm$ 1,7	0,1 $\pm$ 3,2	2,2 $\pm$ 4,0	0,3 $\pm$ 2,4	109 $\pm$ 2
AM $\pm$ SD	0,9 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 12,8	0,4 $\pm$ 0,3	122 $\pm$ 59
RASPON	0,45 – 1,78	0,0133 – 1,27	0,2 – 48	< 0,06 – 1,2	31,6 – 262,0
Osjenčane su maksimalne izmjerene vrijednosti.					

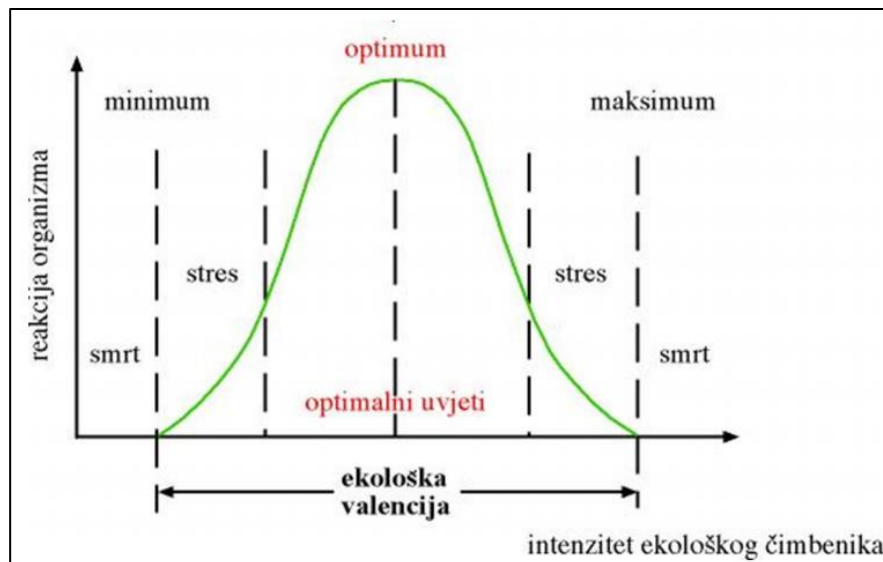


**Tablica 5.** Koncentracije aktivnosti prirodnih radionuklida u biljkama s kontrolnog područja. Crvenim kvadratom označene su biljke korištene u fitotoksikološkoj analizi (izvor: Skoko 2014a)

Vrsta biljke	Koncentracija aktivnosti (Bqkg <sup>-1</sup> )				
	<sup>238</sup> U	<sup>235</sup> U	<sup>226</sup> Ra	<sup>232</sup> Th	<sup>40</sup> K
Bor	0,126	0,035	0,24	0,196	62,1
Brnistra	0,264	< 0,0948	0,13	0,103	70,4
Čempres	0,132	0,0288	0,20	0,140	87,2
Ljepljivi oman	0,489	< 0,1374	0,41	0,164	47,5
Oštri šit	0,710	0,0544	0,80	1,390	138
Kupina	0,412	< 0,0304	0,33	0,147	83,9
Oleandar	0,920	< 0,1514	1,51	0,850	84,2
Smokva	0,640	< 0,0905	0,19	0,459	200
Tamaris	0,448	< 0,1138	0,16	0,147	81,4
Pitospor	0,830	0,0516	3,8	2,6	257
Trava	2,150	0,2687	0,12	0,470	105
Trska	2,250	< 0,0946	0,49	2,060	62
Tršlja	0,279	< 0,0244	0,23	0,281	103
Statistički pokazatelji					
GM ± GSD	0,5 ± 2,4		0,4 ± 2,6	0,4 ± 2,9	94,7 ± 1,6
AM ± SD	0,74 ± 0,69	0,2687*	0,7 ± 1,0	0,7 ± 0,8	106 ± 60
RASPON	0,126 - 2,25		0,12 - 3,8	0,103 - 2,6	47,5 - 257
Osjenčane su maksimalne izmjerene vrijednosti.					

### 1.3. Učinak stresnih čimbenika na biljke

Biljkama su za razmnožavanje, rast i razvoj potrebni optimalni okolišni uvjeti. Stres nastupa kada je vrijednost nekog potencijalno stresnog čimbenika izvan granica optimuma i adaptacije (Slika 3). Granica između optimalnog raspona i stresa ovisi o vrsti biljke i stresnom čimbeniku, a može se pomicati ukoliko se biljka adaptira. Stres kod biljaka uzrokuju različiti biotički (patogeni, kompeticijski organizmi, biljojedi, ljudi...) i abiotički (suvišak i manjak svjetlosti, ekstremna temperatura, količina vode, mineralne tvari...) čimbenici, a učinak stresa može biti prisutan na razini čitavog organizma, stanica ili molekula. Može se manifestirati kao smanjenje produktivnosti, sporiji rast, neposredno oštećenje vitalnih molekula u stanici ili posredno oštećenje uzrokovano nakupljanjem toksičnih molekula koje sekundarno razaraju stanične tvorbe. Biljka se, kao odgovor na stres, može adaptirati ili aklimatizirati. Adaptacija je genetski uvjetovana otpornost kao rezultat selekcije kroz generacije, dok je aklimatizacija inducirana otpornost i nastaje odmah kao odgovor na uvjete u okolišu. Neke biljke razvile su otpornost na određene čimbenike stresa (toksični metali, radionuklidi) i zbog toga imaju potencijal za uklanjanje takvih tvari iz kontaminiranog medija procesom bioremedijacije (Pevalek-Kozlina 2003).



**Slika 3.** Ovisnost organizama o intenzitetu ekoloških čimbenika

(izvor:[http://ishranabilja.com.hr/literatura/ekosustavi/Ekosustavi%20u%20ekoloskom%20bilinogojstvu\\_1.pdf](http://ishranabilja.com.hr/literatura/ekosustavi/Ekosustavi%20u%20ekoloskom%20bilinogojstvu_1.pdf))

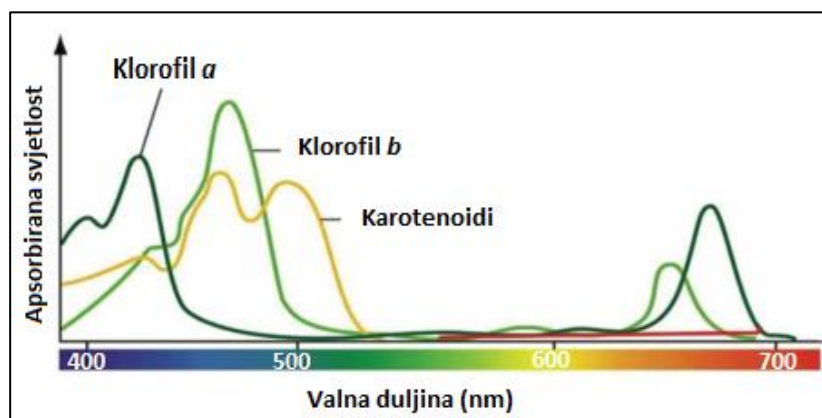
Ljudske aktivnosti često su izvor toksičnih elemenata i spojeva koji u organizmima izazivaju stres. Iz tog razloga vrlo je važna interdisciplinarna znanost ekotoksikologija koja proučava izvore, učinak, zadržavanje te dinamiku kretanja i razgradnje štetnih tvari, polutanata, agrokemikalija, ksenobiotika i dr. (Đikić i sur. 2001). Ekotoksikološki alati koji se koriste u istraživanjima mogu biti biomonitoring, praćenje biološke razgradnje, izučavanje relevantnih biokemijskih i fizioloških procesa te razvijanje biotestova. Trenutno je u svijetu više od 120 milijuna registriranih kemijskih tvari, a taj se broj svakodnevno povećava za 15 000. U Europskoj uniji u komercijalnoj upotrebi je otprilike 100 000 kemijskih tvari, pri čemu su ekotoksikološki podaci dostupni za samo 3% (Mihaljević i sur. 2016). Ovi podaci ukazuju na kronični manjak istraživanja na tom području koja su neophodna za shvaćanje sinergijskog učinka štetnih tvari na okoliš. Važnu ulogu u interpretiranju okolišnih podataka imaju znanosti o okolišu koje istražuju sve njegove aspekte (tlo, zrak, voda, biocenoze, biotop) u kontekstu tehnološkog razvoja.

#### 1.4. Indikatori toksičnosti

Toksičnost je svojstvo neke tvari da ima štetan utjecaj na živa bića i/ili okoliš. Koliko je neka tvar toksična teško je precizno definirati jer toksičnost ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima (načinu, količini i učestalosti izlaganja) te o samom organizmu i njegovim individualnim fiziološkim karakteristikama. Izvođenje testova toksičnosti (biotestova) uključuje izlaganje testnog organizma ispitivanoj toksičnoj tvari i promatranje nastalog učinka, a krajnji cilj je kvalitativno i kvantitativno prikazivanje nastale promjene. Izuzev bakterija i životinja, danas se kao testni organizmi sve više koriste biljke jer su one primarni proizvođači i temelj gotovo svakog prehrambenog lanca (Urošević 2015).

### 1.4.1. Fotosintetski pigmenti

Fotoautotrofni organizmi u procesu fotosinteze pretvaraju energiju Sunčeva zračenja u kemijsku energiju koja se pohranjuje u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula nastalih iz ugljikovog dioksida i vode, uz istodobno oslobađanje kisika. Proces fotosinteze odvija se u kloroplastima biljaka na tilakoidnim membranama koje sadrže fotosintetske pigmente i ostale komponente nužne za pretvorbu energije. Fotosintetski pigmenti su tvari koje mogu apsorbirati svjetlost zahvaljujući strukturi koja uključuje konjugirane dvostruke veze što rezultira premještanjem elektrona. Dijele se na klorofile, od kojih su najzastupljeniji *a* i *b*, i karotenoide. Samo klorofil *a* može neposredno pretvarati Sunčevu energiju u kemijsku, a ostali pigmenti su prijenosnici energije do klorofila *a* u reakcijskom središtu fotosistema. Karotenoidi obuhvaćaju karotene ( $\alpha$ - i  $\beta$ -karoten) i ksantofile (lutein, zeaksantin, neoksantin...). Njihov zadatak uključuje prijenos energije na klorofil *a* čime se proširuje spektar apsorpcije svjetlosti i zaštitu fotoosjetljivog aparata od oštećenja koja mogu prouzročiti oksidativni stres (Pevalek-Kozlina 2003). Karotenoidi mogu neposredno reagirati s produktima lipidne peroksidacije i prekinuti lančanu reakciju, a mogu pojačati i djelovanje vitamina E koji pomaže pri razgradnji peroksidnih radikala (Urošević, 2015). Klorofil *a* i *b* imaju apsorpcijske maksimume u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Karotenoidi apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm (Slika 4).

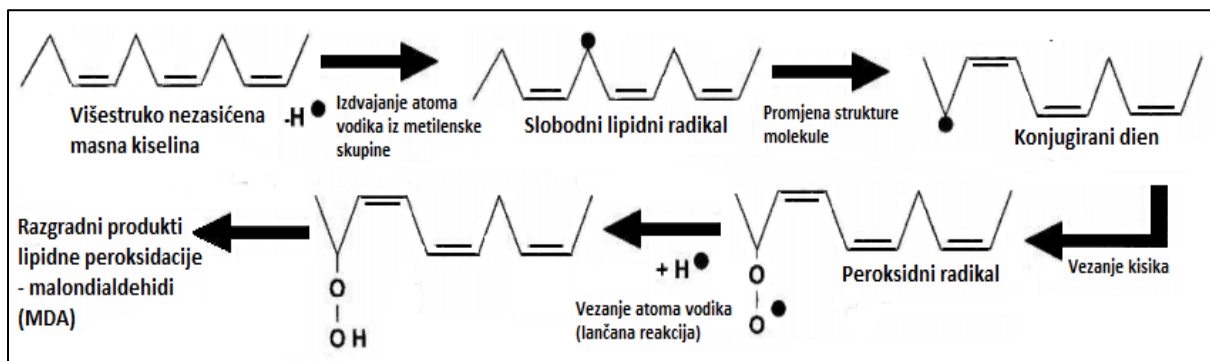


**Slika 4.** Apsorpcijski maksimumi fotosintetskih pigmenta (izvor: <https://mozks-zzh.com/mozks/wp-content/uploads/2020/04/Intenzitet-fotosinteze-i-kemosinteza.pdf>)

Duljina dana, temperatura (Herbinger i sur. 1999), salinitet (Khavari-Nejad i Mostofi 1998) i onečišćenje česticama prašine (Mandre i Tuulmets 1995) dokazano utječu na sadržaj fotosintetskih pigmenta u listovima biljaka. Osim toga, na sadržaj i omjer fotosintetskih pigmenta mogu utjecati alohtone tvari u okolišu poput ksenobiotika (npr. herbicidi, radionuklidi) (Brain i Cedergreen 2009) i teških metala (Myśliwa-Kurdziel i sur. 2004) koji djeluju na određene enzime u njihovom biosintetskom putu. Dakle, pigmenti mogu ukazati na stanja i promjene u okolišu te prisutnosti takvih tvari (Cvrtila 2015).

### 1.4.2. Lipidna peroksidacija i MDA

Oksidativni stres u stanici posljedica je nastajanja prevelike količine reaktivnih oblika kisika (ROS – engl. *reactive oxygen species*). Prisutnost toksičnih tvari u stanici inducira nastanak ROS koji mogu uzrokovati neselektivnu oksidaciju makromolekula, narušavajući pritom njihovu strukturu i funkciju (npr. enzimi) (Jezidžić 2017). Lipidna peroksidacija je sekundarna reakcija na prisutnost oksidativnog stresa u biljci, a izazivaju ga primarni produkti stresa – radikali kisika i otrovni spojevi kisika (Jinmin i Huang 2002). Slobodni radikali su molekule koje imaju nesporeni elektron što ih čini izuzetno reaktivnima. Prisutni su u normalnim fiziološkim procesima gdje imaju ulogu u međustaničnoj komunikaciji te uvelike pomažu u obrani organizma. Ukoliko se nađu u suvišku, imaju tendenciju postizanja vlastite ravnoteže nauštrb drugih susjednih molekula, zbog čega mogu nastati oksidativna oštećenja u organizmu. Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika povećava se stvaranje ROS i molekula koje su oštećene radikalima, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što podiže razinu antioksidansa koji uklanjaju radikale. Radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (Arora i sur. 2002). Zbog velike koncentracije kisika koji se oslobađa procesom fotosinteze, kloroplasti su glavni izvor ROS u biljnim stanicama (Pevalek-Kozlina 2003). Višestruko nezasićene masne kiseline često su meta stvorenih slobodnih radikala koji dovode do lipidne peroksidacije. Reakcije započinju napadom ROS što rezultira izdvajanjem atoma vodika iz metilenske skupine. Na taj način iz višestruko nezasićenih masnih kiselina nastaje slobodni lipidni radikal (Slika 5), iz kojeg reorganizacijom molekule nastaju konjugirani dieni. Lipidni radikali u aerobnim uvjetima brzo reagiraju s kisikom i stvaraju lipidne peroksidne radikale koji oduzimaju vodik drugim molekulama i na taj način generiraju nove lipidne radikale. Pod utjecajem iona željeza ili bakra lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte među kojima je malondialdehid (MDA) koji se u procjenama stupnja lipidne peroksidacije koristi kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipidne komponente stanične membrane (Radetski i sur. 2004, Bhattacharjee 2014). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule tiobarbituratne kiseline (TBA), čime se dobiva crvenkasti kromogen kojeg mjerimo spektrofotometrijski (Jezidžić 2017).



Slika 5. Lipidna peroksidacija (izvor: <https://core.ac.uk/download/pdf/154365689.pdf>)

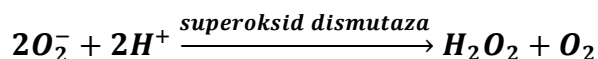
### 1.4.3. Sadržaj proteina

Proteini u organizmima predstavljaju poveznicu između genoma i eksprimiranih svojstava. Geni su zapisi bioloških informacija, a proteini su njihovi funkcionalni predstavnici. Ekstrakcija proteina u istraživanjima provodi se u svrhu ispitivanja razine proteina ili aktivnosti enzima u sirovom ekstraktu te pročišćavanja relativno velikih količina enzima ili proteina. Strukture i funkcije proteina istražuju se na razini proteoma, sekretoma i interaktoma (Horvatić 2018). Proteom je ukupan broj proteina koje ekspirira stanica. On ukazuje na funkciju, modifikaciju proteina i način na koji proteini interferiraju s drugim molekulama. Za razliku od genoma, proteom nije statičan i varira s obzirom na vrstu stanice, stupanj razvoja i utjecaj okoliša. Jedan od učinaka stresa u biljkama može biti promjena metabolizma proteina stoga se ukupni sadržaj proteina koristi kao važan pokazatelj fiziološkog stanja biljaka (Horvatić 2018).

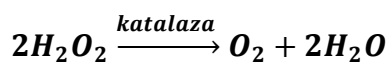
### 1.4.4. Aktivnost antioksidacijskih enzima

Česta metabolička promjena u stresnim uvjetima do koje dolazi prije vidljivih simptoma je povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Povećan sadržaj takvih enzima dokazano se javlja prilikom odgovora biljaka na određene stresne čimbenike poput teških metala, ranjavanja i ekstremnih temperaturnih uvjeta (Gosset i sur. 1994, Edreva i sur. 1998). Antioksidansi su kemijske tvari koje reguliraju nastajanje slobodnih radikala jer ih stabiliziraju doniranjem elektrona pri čemu sami ne postaju slobodni radikali. Obzirom da ROS nastaju u različitim staničnim organelima koji imaju različite stope difuzije i reaktivnosti, biljna stanica treba kompleksni sustav obrane u svim staničnim dijelovima (Blokina 2003). Biljke, u okviru svog antioksidacijskog sustava, posjeduju različite enzimске i neenzimске mehanizme za ukljanjanje ROS koji djeluju kada koncentracija slobodnih radikala ugrožava odvijanje normalnih fizioloških procesa. U antioksidacijske enzime ubrajaju se superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), glutation S-transferaza (GST), glutation peroksidaza (GPX) i dr. (Arora i sur. 2002). Neenzimski antioksidansi uključuju askorbinsku kiselinu (vitamin C), tokoferol (vitamin E), glutation, karotenoide, flavonoide i dr. (Gupta i sur. 2014). Enzimi su vrlo osjetljivi biološki katalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije na način da smanjuju energiju aktivacije, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni. Njihova aktivnost može se inhibirati vezanjem molekula ili iona na aktivno mjesto ili promjenom fizikalno-kemijskih uvjeta (promjena temperature ili pH) koje potom rezultiraju denaturacijom enzima.

Superoksid dismutaza (SOD) je prva linija obrane od slobodnih radikala. Taj enzim katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika i vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) koji se uz pomoć katalaza ili peroksidaza dalje razgrađuje. Prisutan je u tri izoforme koje se međusobno razlikuju po smještaju u stanici i vrsti metalnog iona kojeg sadrže u svom aktivnom centru (Paško 2015). Poznato je da ima važnu ulogu u obrani biljke od stresnih čimbenika.

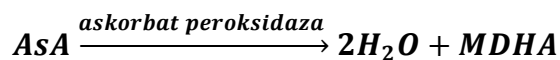


Katalaza (CAT) ili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oksidoreduktaza je enzim koji se sastoji od četiri podjedinice (tetramer) sa atomom željeza u svakom aktivnom centru. Zastupljen je u gotovo svim organizmima, a glavna funkcija mu je prevođenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u vodu i kisik:

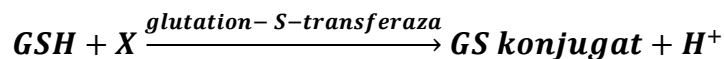


Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima kao posljedica fotorespiracije, oksidacije masnih kiselina ili kao posljedica djelovanja drugih enzima. Katalaza je enzim velike katalitičke aktivnosti i može reducirati otprilike šest milijuna molekula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u jednoj minuti (Gill i Tuteja 2010). Ekspresija gena za katalazu osjetljiva je na različite okolišne čimbenike poput ekstremnih temperatura, povišenog saliniteta i teških metala; stoga ti enzimi imaju važnu zaštitnu ulogu u odgovoru na oksidacijski stres (Balen i sur. 2013, Cvjetko i sur. 2017).

Askorbat peroksidaza (APX) je enzim koji je prisutan u kloroplastima, mitohondrijima, peroksisomima i citoplazmi, a glavna uloga mu je razgradnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> korištenjem askorbata kao supstrata. Askorbinska kiselina (AsA) reakcijom prelazi u monodehidroaskorbinsku kiselinu (MDHA) koja se nazad reducira u prvotni oblik. Aktivnost APX inducirana je stresnim čimbenicima i rezultira povećanjem tolerancije na te čimbenike zadržavanjem zaliha askorbinske kiseline (Matić 2014). Ta reakcija važna je u zaštiti od oksidativnog oštećenja. Ona u odnosu na katalazu ima veći afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Glutation S-transferaze (GST) su skupine enzima koje kataliziraju reakciju sulfhidrilne grupe (-SH) tripeptida glutationa (GSH) različitih ksenobiotika (X). Glutation je jedan od najvažnijih antioksidansa u stanicama, a upravo je njegova -SH skupina redoks-aktivna i odgovorna za antioksidacijska svojstva glutationa koji se može reverzibilno oksidirati i reducirati (Urošević 2015). Sulfhidrilna skupina reagira s elektrofilnim mjestima u ksenobiotiku čime stvara konjugate koji su manje toksični od inicijalne molekule. Osim direktne detoksikacije, GST kataliziraju sekundarni metabolizam spojeva oksidiranih uz pomoć drugih enzima (Edwards i sur. 2000).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bila je procjena fitotoksičnosti u listovima tršlje (*Pistacia lentiscus* L.) i alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) koji rastu na deponiju (taložnici) pepela i šljake s povišenim koncentracijama prirodnih radionuklida na području bivše tvornice Jugovinil.

Kao indikatori toksičnosti mjereni su biokemijski pokazatelji toksičnosti - sadržaj malondialdehida, ukupnih proteina, fotosintetskih pigmenata te aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX) i glutation-S-transferaze (GST).

Hipoteza istraživanja je da će radionuklidi prisutni u pepelu i šljaci uzrokovati mjerljive negativne biokemijske i fiziološke promjene u uzorcima sakupljenim s područja taložnice pepela i šljake u odnosu na uzorke s kontrolne lokacije (otok Čiovo).

### 3. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Geografski položaj i klima

Kaštelanski zaljev nalazi se u srednjedalmatinskom priobalju, a po svojoj prostornoj homogenosti može se gledati kao izdvojena mikroregija unutar šireg područja srednje Dalmacije. Sa sjevera ga omeđuje glavno kopno, s južne i jugoistočne strane nalazi se Splitski poluotok, a na zapadu se prostire otok Čiovo. Obale Kaštelanskog zaljeva gusto su naseljene i na njima se nalazi svih sedam Kaštela, gradovi Solin, Split, Trogir te veća mjesta Slatine i Vranjic. Izrazito je zatvoren što ga čini osjetljivijim na zagađenja s obale, a na dijelu gdje se spaja sa otvorenim morem širok je otprilike 1 kilometar. Površina mu iznosi oko 55 km<sup>2</sup> dok prosječna dubina doseže 23 metra. Zaljev se dijeli na plitki lagunasti dio na zapadu kod Trogira i na zatvoreniji dublji istočni dio kod Splita gdje se ulijevaju velike količine otpadnih i industrijskih voda. Uz to, slaba cirkulacija i izmjena vode na tom području znatno utječu na zagađenost cijelog zaljeva. Prema Köppenovoj klasifikaciji područje Kaštela spada u sredozemni tip klime sa suhim i vrućim ljetom (Csa).

#### 3.2. Geološka podloga i tlo

Kaštelanski zaljev je potopljeno krško polje formirano u flišnim naslagama i pješčenjacima između planina Mosor i Kozjak na sjeveru te poluotoka Marjana i otoka Čiova na jugu. Geološki, ovaj prostor predstavlja dio velikog kredno-tercijarnog sedimentnog kompleksa Vanjskih dinarida i tipičnu jadransku strukturnu jedinicu izgrađenu od sedimenata mezozojske, tercijarne i kvartarne starosti (Miloš i Maleš 1998).



**Slika 6.** Geološka karta okolice Splita (izvor: <http://webgis.hgi-cgs.hr/gk300/>)

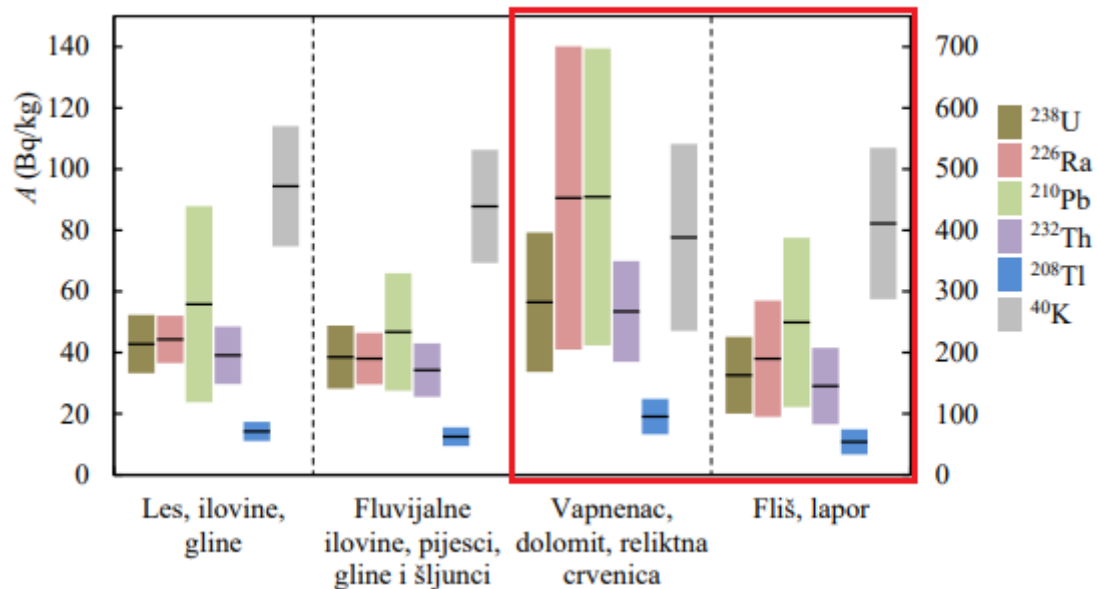
Na Slici 6. može se uočiti podjela na karbonatne grebene rudistnih vapnenaca kredne starosti okolnih uzvisina (zeleno) i flišne padine eocenske starosti (smeđe). Pod pojmom fliš misli se na dubokomorske naslage koje su nastale kretanjem pijeska i mulja s plitkog dijela obale turbiditnim tokovima prema dubljem dijelu mora prilikom čega dolazi do sekvenciranja taložnog materijala prema veličini, odnosno dubini. Na flišnom kopnenom dijelu koji se blago



izdiže iz mora formirano je Kaštelansko polje koje stanovnicima služi za poljoprivedne djelatnosti dok se na mjestima većih nagiba (na prijelazu iz flišnih naslaga u rudistne vapnenca) primjećuje reverzni tip rasjeda s inkliniranim i naboranim padinama Kozjaka (Miljak 2017). Reljef utječe na trošenje matičnih stijena, eroziju, klimu, preraspodjelu i zadržavanje vode što za posljedicu ima razlike u količini i sastavu nastalog tla (Šoštarić 2017). Fliš predstavlja barijeru u kretanju podzemne vode kroz karbonatne stijene i svojom nepropusnošću omogućava pojavu izvora i površinskih tokova na kontaktu s karbonatnim naslagama (Šparica i sur. 2010). Litologija fliša vrlo je raznolika. Najčešći članovi flišnog slijeda čine šejlovi, lapori, prahovnjaci i pješčenjaci dok su vapnenici i konglomerati rjeđi (Magdalenić i sur. 1980). Šestanović (1998) za naslage fliša u splitskom poručju kaže da se sastoje od brečokonglomerata, breča, pješčenjaka, detritičnog vapnenca i lapora s relativno visokim udjelom kalcitne komponente. Stijensku masu fliša, osim litološke heterogenosti, karakterizira veći stupanj trošnosti od rezistentnijih pješčenjaka i karbonata. Stijene se mogu trošiti mehanički, bez promjene kemijskog sastava (npr. tektonika), pod utjecajem prirodnih agensa iz atmosfere, hidrosfere i biosfere ili kemijski, prilikom čega se mineralni sastav stijena mijenja. Fliš u Hrvatskoj tektonski se nalazi u vrlo aktivnom području. Radi se o terenu koji je pod utjecajem kolizijskih kretanja između Jadranske mikroploče i masiva Dinarida što je rezultiralo podvlačenjem fliša pod karbonatni mezozojski kompleks što je vidljivo na splitskom području (Toševski i sur. 2012), a o procesu podvlačenja svjedoče brojni potresi duž naše obale do 30 metara dubine ispod mora (Kuk i sur. 2000). Prilikom kemijskog trošenja tvari u stijeni mogu biti transportirane na velike udaljenosti ili mogu reagirati međusobno, a kao rezultat mogu nastati novi minerali kojih nema u stijeni koja je izložena kemijskom trošenju. Stupanj kemijskog trošenja ovisi o pH vode, količini organskih kiselina, kisika, nitrata, klorida i prisutnosti bilo kojih drugih tvari koje mogu agresivno djelovati na stijenu (Toševski i sur. 2012). Matični supstrat je čimbenik o kojem najviše ovisi količina prirodnih radionuklida u tlu koje nastaje fizikalnim i kemijskim trošenjem litosfernih stijena (Šoštarić 2017).

Zbog heterogenosti matičnog supstrata na području zaljeva (fliš i vapnenac) identificirano je 17 kartiranih jedinica tla koje se međusobno preklapaju u prostoru od kojih su najzastupljeniji rigosoli i hortisoli. Obje vrste tla antropogenog su porijekla i nastala su miješanjem slojeva fliša i vapnenaca s promijenjenim fizikalnim i kemijskim svojstvima, a namijenjene su za biljnu proizvodnju (Miloš i Maleš 1998). Šoštarić (2017) istražuje radiološka svojstva tla u Republici Hrvatskoj i utvrđuje povezanost između matičnog supstrata tla i koncentracija aktivnosti (A) prirodnih radionuklida. Na područjima gdje je vapnenac matični supstrat utvrdio je povišene vrijednosti A radionuklida iz radioaktivnih nizova  $^{238}\text{U}$  i  $^{232}\text{Th}$  i niže vrijednosti  $^{40}\text{K}$ , dok najbolju povezanost s tim matičnim supstratom pokazuje  $^{226}\text{Ra}$  (Slika 7). Kao razlog tome, navodi kemijsku sličnost s Ca i Mg koji se nalaze u navedenom matičnom supstratu.  $^{226}\text{Ra}$  se nalazi u drugoj skupini periodnog sustava kao i Ca, zbog čega se kemijski vrlo dobro veže u spojeve. Zbog toga u zamjenu za Ca ulazi u određene okolišne i biološke procese u površinskim slojevima i na samoj površini tla.  $T_{1/2}^{226}\text{Ra}$  od 1600 godina dovoljno je dug za prolazak kroz nekoliko ciklusa procesa koji dovode  $^{226}\text{Ra}$  u

površinske slojeve tla. Ulazak u biološke procese, prvenstveno biljke, ukazuje na potencijalnu opasnost od  $^{226}\text{Ra}$  (Šošćarić 2017). Vrijednosti  $A$   $^{40}\text{K}$  blago su povećane u matičnim supstratima lapora i fliša koji se također nalazi na području zaljeva.



**Slika 7.** Koncentracije aktivnosti ( $A$ ) u ovisnosti o matičnom supstratu tla. Vrijednosti  $A$   $^{40}\text{K}$  nekoliko puta su veće od ostalih vrijednosti pa se zbog bolje preglednosti lijeva vertikalna skala odnosi na  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$  i  $^{208}\text{Tl}$ , a desna na  $^{40}\text{K}$  (izvor: Šošćarić 2017)

Općenito, vertikalna migracija radionuklida u tlu brža je u pješčano-šljunčanim tlima nego u ilovačama, a migracijska stopa se smanjuje s vremenom i dubinom (Bunzl i sur. 1995). Velika raznolikost pedosfere i njena izloženost dugotrajnom utjecaju čovjeka rezultirale su brojnim negativnim posljedicama, kako u tlu tako i na cjelokupnom staništu zaljeva. Najvažnije među njima su pretvaranje poljoprivrednog tla u trajno neproizvodne svrhe, opterećenje tla štetnim tvarima, zapuštanje tla i česti požari (Miloš i Maleš 1998). Zbog dugotrajne degradacije Kaštelanskog zaljeva pokrenut je projekt "Eko-Kaštelanski zaljev" čiji je cilj regeneracija i zaštita prirode tog kraja.

### 3.3. Hidrologija

Na razgraničenju nepropusnih flišnih zavala i propusnih karbonatnih uzvisina izvire mnogo tekućica od kojih su najbitnije rijeke Jadro i Žrnovnica. Jadro je važan izvor pitke vode splitskog područja i iz tog razloga zahtijeva strog i kvalitetan monitoring. S obzirom da se nalazi u krškom području koje je svojevrsni hidrološki fenomen i podložna je onečišćenju sa svih strana, od krucijalne je važnosti rješavanje osnovnih ekoloških problema poput prekomjernog zagađenja tla i neadekvatne kanalizacijske mreže. Promjene u propusnosti geološke podloge dovele su do stvaranja brojnih podzemnih tokova na tom području. Sve one čine sliv Kaštelanskog zaljeva čija je površina dvostruko veća od cijelog zaljeva (Miličić 2016). Nekontroliranim poljoprivrednim i industrijskim aktivnostima, poput korištenja

umjetnih gnojiva i nepropisnog odlaganja prirodnog radioaktivnog otpada u ovom slučaju, rezultiralo je time da je podzemnim vodama bilo zagađivano cijelo područje zaljeva.

Odlagališta pepela i šljake nastala "mokrim" postupkom odnosno miješanjem s vodom kao u slučaju Jugovinila predstavlja opasnost za podzemne vode zbog procjeđivanja radionuklida poput šesterovalentnog urana koji je izrazito mobilan u podzemnim vodama (Skoko 2014a). Još jedan faktor zagađenosti zaljeva jest smanjenje prozirnosti mora koje se javlja kao posljedica pritoka organskih i anorganskih tvari s kopna (Miličić 2016).

### 3.4. Flora i fauna

Primarna vegetacija ovog područja pripada dvjema biljnim geografskim zonama: eumediteranskoj zoni zimzelene vegetacije (sveza Quercion ilicis) s karakterističnim vrstama *Quercus ilex* (hrast crnika) i *Arbutus unedo* L. (obična planika) te submediteranskoj zoni i mediteransko-montanom pojasu listopadne vegetacije (sveza Ostryo-Carpinion orientalis) s vrstama poput *Carpinus orientalis* Mill. (bijeli grab), *Quercus pubescens* L. (hrast medunac) i *Fraxinus ornus* L. (crni jasen). Prema nacionalnoj klasifikaciji staništa na području Kaštelanskog zaljeva nalazi se šuma alepskog bora s tršljom (E.8.2.8.) (as. *Pistacio-Pinetum helpensis* De Marco, Veri et Caneca 1984) koja je istražena upravo na južnim padinama Kozjaka povrh Kaštel-Sućurca i može upućivati na početnu fazu razvoja crnikovih šuma. Zbog dugogodišnjeg antropogenog utjecaja prirodna staništa na nekim područjima znatno su izmijenjena. Pojavljuje se ruderalna i korovna vegetacija (I.1) koje se razvijaju u blizini naselja na razmjerno toplim i suhim staništima bogatim dušikom. Osim njih, pojavljuju se mediteranske šikare (D.3), odnosno dračici (D.3.1.) koji se sastoje od bodljikavih, trnovitih i aromatičnih biljaka kakve se mogu pronaći i na području taložnice Jugovinila (Tablica 6). Dračici su vrlo rasprostranjen skup staništa razvijenih u sklopu submediteranske vegetacijske zone kao jedan od degradacijskih stadija šuma medunca i bijelog graba. Specifičnost taložnice je pojavnost trske (*Phragmites australis*) koja obično raste u plitkim vodama stajaćicama i močvarama što može upućivati na nekadašnju prisutnost stajaće vode na području taložnice.

Raspodjela radionuklida unutar biljke može se odvijati putem dva transportna sustava: transpiracijom (ksilem) i asimilacijom (floem) (Popijač 2018). Transpiracijom svi elementi imaju protok od korijena do vrha biljke što znači da se radionuklidi mogu transportirati u okomitom smjeru (Strebl i sur. 1999, McGee i sur. 2000), za razliku od floema gdje je transport elemenata moguć u svim smjerovima. Kada su evaporacija tla i transpiracija biljaka veći od količine oborina, voda iz taložnice kreće prema gore i lateralno, zajedno s otopljenim kemijskim elementima koji se tamo nalaze. Radionuklidi koje biljke akumuliraju pohranjuju se u njihovom tkivu i na taj način postaju dostupni životinjama koje ih konzumiraju (Skoko 2014a).

**Tablica 6.** Popis biljnih vrsta pronađenih na odlagalištu pepela i šljake (taložnici) i kontrolnom području Čiova (izvor: Skoko 2014a)

Latinski naziv	Hrvatski naziv	Tip biljke
<i>Piptatherum miliaceum</i> (L.)Coss	Prosuljasti šćevar	Trava i bilje
<i>Phragmites australis</i> (Cav.)Trin. ex Steud.	Trska	Trava i bilje
<i>Juncus acutus</i> L.	Oštri sit	Trava i bilje
<i>Dittrichia viscosa</i> (L.)Greuter	Ljepljivi oman	Trava i bilje
<i>Nerium oleander</i> L.	Oleandar	Grm
<i>Rubus heteromorphus</i> Ripart ex Genev.	Dalmatinska kupina	Grm
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Tršlja	Grm
<i>Pittosporum tobira</i> (Thunb.) Aiton	Pitospor	Grm
<i>Spartium junceum</i> L.	Brnistra	Grm
<i>Pinus halepensis</i> Mill. x <i>P. brutia</i> Ten.	Alepški bor	Stablo
<i>Ficus carica</i> L.	Smokva	Stablo
<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Čempres	Stablo
<i>Tamarix dalmatica</i> Baum	Tamaris	Stablo

Na kopnenom prostoru Kaštelanskog zaljeva najčešće obitavaju životinje povezane s ljudskom prisutnošću poput štakora selca (*Rattus norvegicus*) i kućnog miša (*Mus Musculus*) te galeba klaukavca (*Larus cacchians*) i drugih uobičajenih vrsta ptica. Ptice su ekološki i fiziološki vrlo osjetljivi organizmi i zbog toga su vrlo dobri bioindikatori promjena na biljkama. One mogu biti vrlo jasni indikatori krajobrazne degradacije jer su vrlo osjetljive na promjene u staništu, a njihov demografski pad se odražava na procese oprašivanja, disperzije sjemena biljnih vrsta te porast populacije određenih insekata (Mason 1996). Prirodna staništa, osobito gustiši i grmovita staništa pogodna su za faunu manjih sisavaca kao što su bjelozube rovke (*Suncus etruscus*, *Crocidura leucodon*), šumski miš (*Apodemus sylvaticus*), puh (*Glis glis*) i zec (*Lepus europaeus*). Sisavci su naintenzivnije korištena bioindikatorska skupina životinja jer se nalaze na vrhu hranidbenih lanaca, zbog čega ih se najbolje može usporediti s ljudima (Sofilić 2014). Na širem području žive i neke vrste šišmiša (Chiroptera). Od gmazova česti su primorska gušterica (*Podacris sicula*), krška gušterica (*Podacris melisellensis*) i veliki zelembač (*Lacerta trilineata*). Fauna beskralješnjaka sastoji se od brojnih vrsta kukaca, paukova, maločetinaša, puževa i oblića (Bakula i sur. 2016). Živi organizmi u stalnoj su interakciji s tlom i na taj način u manjoj mjeri mogu utjecati na radioaktivnost u tlu (Šoštarčić

2017), a posljedično i u biljkama. Na prostoru taložnice, osim kukaca, gujavica, ptica i manjih guštera, veće životinjske vrste nisu uočene (Skoko 2014a).

### 3.5. Lokacije uzorkovanja

Jugovinil, kasnije Adriavinil, bila je tvornica poli(vinil-klorid)(PVC) proizvoda, vinilklorid monomera (VCM) i umjetne kože smještena uz samu obalu na granici Kaštel Sućurca i Kaštel Gomilice, tada poljoprivrednih naselja. S radom je počela 1949. godine i zapošljavala je oko 3500 radnika. U početku, Jugovinil je proizvodio samo PVC prah, a nakon globalnog prihvaćanja plastike kreću proizvoditi PVC prerađevine poput granulata, ploča, cijevi, folija i slično. Robu široke potrošnje počeli su proizvoditi naknadno kada je osnovana sestrinska tvrtka Jugoplastika koja je proizvodila raznu konfekciju, uključujući dječje igračke (Bedalov 2017). Taj socijalistički div, unatoč tome što je starijim generacijama pružao zaposlenje i pristojan život, mlađim generacijama u nasljeđe je ostavio onečišćeno tlo i devastiranu obalu. Na području bivše tvornice nalaze se dva deponija pepela i šljake koji su nastali kao produkt sagorijevanja ugljena u tvorničkoj termoelektrani, a dijelom su dopremljeni iz drugih jugoslavenskih termoelektrana. Korišteni ugljen dopreman je iz rudnika Raša u Istri, Drinovci i Širtovci kod Šibenika i Livanjskog polja u Bosni i Hercegovini (Oreščanin i sur. 2006). Deponij koji je saniran 1973. godine sadrži oko 38000 m<sup>3</sup> pepela i šljake dok se na lokaciji velike taložnice nalazi oko 180000 m<sup>3</sup>. Osim navedenih deponija, na tom području registrirano je nekoliko onečišćenih zona na kojima se nalazi oko 100000 m<sup>3</sup> nanosa pepela i šljake (NN 125/2014). U taložnicu se putem cjevovoda iz tvornice dopremala mješavina vode, pepela i šljake koja se tamo odlagala, a potom se voda postepeno procjeđivala iz odložene mješavine u more. Površina taložnice iznosi otprilike 23000 m<sup>2</sup> dubine 10 metara, a od mora je odvojena umjetnim obalnim zidom (Slika 8).



**Slika 8.** Narančastim kvadratom označeno je područje tvornice, a crvenim kvadratom taložnica pepela i šljake s povišenim koncentracijama aktivnosti prirodnih radionuklida (izvor: <https://www.google.com/maps/>)

Prostor taložnice nije adekvatno sagrađen da bi spriječio prijenos nakupljenog radioaktivnog materijala u okoliš (Skoko 2014a). Svjedočanstva bivših radnika govore o tome kako je tvornica poslovala uspješno, međutim nije koristila filtere i pročišćivače pa se u blizini mogao osjetiti smrad, a nestale su i mnoge životinje koje su normalno obitavale na tom području poput vjeverica, lastavica, ježinaca i periski. Tadašnja djeca kupala su se na mjestima ispuštanja otpadnih voda bogatih živom koju je tvornica koristila kao katodu u elektrolizi za proizvodnju natrijevog hidroksida i klora i mazali se radioaktivnom šljakom kao s ljekovitim blatom (Bedalov 2017). Kao posljedica, velik dio generacije mladih ljudi koji je odrastao uz tvornicu obolio je od tumora jetre. Time je Jugovinil ostao dokumentiran kao jedna od tvornica s najvećim brojem umrlih od malignih tumora u svijetu (Bedalov 2017). U predratno vrijeme Jugovinil je poslovao s povećanim gubitcima i zaduživanjima što je rezultiralo stečajem 1990. godine. Razvojem ekološke svijesti i slobode govora dolazi do prvih prozivanja tvornice kao "zagađivača, trovača i simbolom socijalizma" (Gasperčić 2010). Danas, cijelo područje tvornice obraslo je samoniklom šikarom s autohtonim mediteranskim biljkama što značajno pridonosi smanjenju eolske erozije.

Kako bi dobiveni rezultati fitotoksikološkog istraživanja bili uspoređeni s prirodnim koncentracijama radionuklida u Kaštelanskom zaljevu, za kontrolu je izabran otok Čiovo koji je svojom udaljenošću dovoljno daleko od izvora onečišćenja, ali je geološki i vegetacijski sličan istraživanom području. Za lokaciju uzorkovanja odabran je sjeveroistočni dio otoka koji zatvara Kaštelanski zaljev i karakterizira ga vrlo rijetka naseljenost (Slika 9). Osim toga, na tom području pronađena je vegetacija najbližnja onoj na istraživanom području.



**Slika 9.** Područja uzorkovanja na otoku Čiovu i pokraj bivše tvornice Jugovinil označena crvenim kvadratom (izvor karte: <https://geoportal.dgu.hr/>, digitalni ortofoto 2019.)

Uzorkovanje listova/iglica tršlje i alepskog bora provedeno je 21. veljače 2020. godine. Uzorci su sakupljeni na 3 lokacije na nekadašnjoj taložnici pepela i šljake Jugovinila (4 uzorka tršlje i 3 uzorka alepskog bora). Kontrolni uzorci sakupljeni su na tri lokacije na sjeveroistočnoj strani otoka Čiova (3 uzorka tršlje i 3 uzorka alepskog bora). Uzorci nisu uzimani s vrlo niskih grana kako bi se smanjila mogućnost kontaminacije s tla. Sakupljeni biljni materijal umotan je u aluminijsku foliju i odmah stavljen u tekući dušik kako bi se zaustavili svi biokemijski procesi. Lokacije uzorkovanja određene su GPS koordinatama u Tablici 7.

**Tablica 7.** GPS koordinate uzorkovanih lokacija

Lokacija	Decimalni stupnjevi (DD)	
Jugovinil	43.544581	16.414891
	43.544608	16.415406
	43.544632	16.416082
Čiovo	43.485767	16.370814
	43.486283	16.369435
	43.486040	16.370270

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Biljni materijal

Od navedenih biljaka za fitotoksikološku analizu odabrani su tršlja i alepski bor (Slika 10 i 11) zbog svoje raširenosti na istraživanom i kontrolnom području i iz razloga što su to vazdazeleni biljke što je olakšalo uzorkovanje koje se odvijalo u veljači.

#### 4.1.1. Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.)

Tršlja (*Pistacia lentiscus* L.) je vazdazeleni grm (Slika 10) iz porodice vonjača (*Anacardiaceae*). Može dosegnuti visinu do 5 metara stvarajući pritom dobro razgranat korijenski sustav. Kora je kod mladih biljaka glatka i zelenkastosive boje, a kasnije potamni i postaje ljuskava. Zarezivanjem kore dobiva se smola (mastika) koja se koristi u medicini. Listovi su ovalnog oblika, sjajni i kožasti, dugi 5-10 cm, parno perasti i sastavljeni od 3 do 5 jajolikih liski tupog vrha. Na licu su tamnozeleni, a naličje im je svijetlozeleno (Slika 10). Glavna lisna peteljka je spljoštena i žlijebasta i ima karakterističan miris. Destilacijom vodenom parom iz listova može se proizvesti eterično ulje. Također, listovi su bogati taninima. Tršlja je dvodomna biljka što znači da razlikujemo mušku i žensku biljku. Cvjetovi

su maleni i sakupljeni u klasaste cvatove koji rastu u pazušcima listova. Crvene su boje i cvatu od ožujka do svibnja te su vrlo privlačni za pčele. Plodovi su male okruglaste koštunice, također crvene boje koje dozrijevaju u kasnu jesen kada postaju crne. Tršlja je rasprostranjena na području Mediterana i često se može pronaći na obalama Jadranskog mora. Voli sunčana i suha mjesta stjenovitih područja, raste na plitkim tlima u sastavu makija i mediteranskih šikara. Otporna je na sušu i posolicu stoga može rasti u blizini mora.



**Slika 10.** *Habitus tršlje (Pistacia lentiscus L.) (lijevo) te list i plod tršlje (desno)*  
(izvor:<https://www.plantea.com.hr/>; <http://www.plantsoftheworldonline.org/>)

#### **4.1.2. Alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.)**

Alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) je vazdazeleno stablo (Slika 11) iz porodice borovki (*Pinaceae*). Korijenov sustav izrazito je jak i velik i stablo može narasti do 20 metara visine. Deblo i grane su zakrivljene, krošnja je nepravilna, okruglastog ili piramidalnog oblika, a sa starošću postaje sve nepravilnija. Kora je u mladosti glatka i srebernastosiva, a kasnije postaje crvenkastosmeđa i ispucana. Drvo je također crvenkastosmeđe, tvrdo i izdržljivo zbog čega se koristilo u proizvodnji brodova. Listovi su igličasti, mekani i plavkastozelene boje. Dugi su otprilike 6-15 cm i sakupljeni u parove (Slika 11). Cvjetovi su jednospolni i cvatu u travnju i svibnju. Češeri su viseći, jajasti i dozrijevaju u jesen. Sjemenke su tamnosmeđe i okriljene radi oprašivanja vjetrom. Rasprostranjen je na području Mediterana. U Hrvatskoj se autohtoni alepski bor može pronaći na jugu Jadrana, no radi svog dekorativnog izgleda umjetno je sađen i na sjevernom dijelu, često u sklopu pošumljavanja nakon požara. Raste na siromašnim i oskudnim tlima i često formira čiste ili mješovite sastojine na priobalnom području. Otporan je na sušu i jake vjetrove te mu pogoduje toplina i svjetlost. Životni vijek mu je otprilike 200 godina.





**Slika 11.** Habitus alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) (lijevo) te igličasti listovi i plod (izvor: <https://www.plantea.com.hr/>).

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Priprema uzoraka

Po dolasku u laboratorij sakupljene uzorke listova tršlje i iglice bora sam liofilizirala, uprašila u tarioniku uz pomoć tekućeg dušika i precizno izvagala. Potom je uslijedila homogenizacija uzoraka na način da sam uprašene listove (određene mase za ekstrakciju pigmenata i topivih proteina) stavila u Eppendorf epruvete, dodala metalne kuglice te ih nakratko uronila u tekući dušik. Nakon toga epruvete sam stavila u uređaj za homogenizaciju na frekvenciju od 30 Hz u trajanju od 2 minute. Usitnjeni materijal u označenim epruvetama spremila sam u zamrzivač pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do izrade ekstrakata.

### 4.2.2. Određivanje sadržaja pigmenata

Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je spektrofotometrijski (UV/VIS spektrofotometar Specord, Analytik Jena) prema Lichtenthaleru (1987). Za određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata izvagala sam po 15 mg uprašenih listova tršlje i alepskog bora i nakon homogenizacije u mlinu IST 400 (30 Hz, 1 min) dodala sam 1,5 mL 80%-tnog hladnog acetona u svaku epruvetu i ponovno ih homogenizirala (30 Hz, 2 min). Uzorci su zatim centrifugirani u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 min na  $5000\times g$ . Uzorke sam potom prebacila u plastične kivete, izmjerila im volumen i mjerila apsorbanciju svakog uzorka. Za slijepu probu koristila sam 80%-tni aceton. Apsorbanciju svakog uzorka mjerila sam pri valnim duljinama od 470, 646 i 663 nm. Iz dobivenih apsorbancija izračunala sam koncentracije klorofila *a* ( $C_a$ ), klorofila *b* ( $C_b$ ) i ukupnih karotenoida ( $C_k$ ) prema izrazima iz Wellburna (1994):

$$C_a = \frac{12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$$C_b = \frac{20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$$C_k = \frac{(1000 \times A_{470} - 3.27 \times C_a - 104 \times C_b)/198}{l \times 1000 \times m} \times V$$

$C_a$  – sadržaj klorofila a (mg/g suhe tvari)

$C_b$  – sadržaj klorofila b (mg/g suhe tvari)

$C_k$  – sadržaj ukupnih karotenoida (mg/g suhe tvari)

$A_{470, 664, 646}$  – apsorbancije uzoraka pri navedenim valnim duljinama

$V$  – volumen uzorka

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

$m$  – masa uzorka

#### 4.2.3. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost enzima

Za ekstrakciju ukupnih topivih proteina izvagala sam određenu masu uprašenih listova tršlje (50 mg) i alepskog bora (30 mg) te sam nakon homogenizacije u mlinu IST 400 (30 Hz, 1 min) u epruvete dodala 1 ml kalij-fosfatnog pufera (50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pH vrijednosti 7,0 s dodatkom 0,5 mM EDTA) te homogenizirala još jednu minutu na 30 Hz. U svaki uzorak dodala sam još po 1 ml kalij-fosfatnog pufera i netopivi polivinilpolipirrolidon (PVPP). Tako pripremljeni homogenat centrifugiran je u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4°C u trajanju od 30 min na 30 000×g. Dobiveni supernatant iskoristila sam za određivanje sadržaja topivih proteina metodom prema Bradfordu (1976), za određivanje aktivnosti enzima i za određivanje sadržaja malondialdehida.

Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa Coomassie Brilliant Blue G-250 na valnoj duljini 595 nm. U 50 µl uzorka dodala sam 1 ml Bradford reagensa sastavljenog od 15 ml EtOH, 30 ml 88%-tne  $H_3PO_4$  i 30 ml matične otopine (100 ml 96%-tnog EtOH, 200 ml 88%-tne  $H_3PO_4$  i 350 mg Coomassie Brilliant Blue G-250). Koncentraciju proteina u pojedinim uzorcima odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,1 do 0,8 mg/ml). Sadržaj proteina izrazila sam kao mg proteina po gramu suhe tvari (DW) biljnog tkiva (mg/gDW).

Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) odredila sam spektrofotometrijski prema metodi Giannopolitis i Ries (1977). Reakcijska otopina sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,8), 13 mM metionin, 75 µl kloridne soli nitrotetrazolijevog plavila (NBT), 0,1 mM

EDTA, 2  $\mu$ l riboflavina i ekstrakcijski pufer. Na 890  $\mu$ l reakcijske otopine dodala sam 100  $\mu$ l ekstrakcijskog pufera (kontrola), dok je proba sadržavala isti volumen enzimske otopine koja je dobivena miješanjem pufera i određenih volumena originalnih enzimskih ekstrakata (15, 30 i 60 ml). Neposredno prije mjerenja u reakcijsku smjesu dodala sam 10  $\mu$ l riboflavina. Uzorke sam promiješala i stavila ispod izvora svjetlosti (15 W) u zamračenom prostoru. Reakcija se pokreće uključivanjem svjetlosti jer se superoksidni radikali stvaraju u prisutnosti fotoreaktivnog riboflavina. Nakon 10 minuta izvor svjetlosti sam ugasila. NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 560 nm (Slika 12). Postotak inhibicije mjeri se prema izrazu:

$$\% \text{ Inhibicije} = \frac{A_{560}^K - A_{560}^U}{A_{560}^K} \times 100$$

$A^K$  – apsorbancija čiste otopine (referentni uzorak)

$A^U$  – apsorbancija mjerenog uzorka

Jedna jedinica aktivnosti SOD izražava se kao ona količina enzima koji uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina).



**Slika 12.** Plavo obojenje u kivetama zbog prisutnosti netopivog formazana

Reakcijska otopina za katalazu (CAT) sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0), 10 mM  $H_2O_2$  i uzorak (30  $\mu$ l biljnog supernatanta). Mjerila sam pad apsorbancije uzrokovan razgradnjom  $H_2O_2$  svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm (Aebi 1984). Aktivnost katalaze izražena je kao količina potrošenog  $H_2O_2$  u  $\mu$ molu po minuti po miligramu proteina. Izračunala sam je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ):

$$CAT = \frac{\Delta A \times t \times V_{UK}}{V_{UZ} \times \epsilon_{240} \times m_p} (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{proteina}}^{-1})$$

$\Delta A$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije

$t$  – faktor kojim se množi da bi se rezultat izrazio u minuti (=6)

$V_{UK}$  – ukupni volumen reakcijske otopine (1000  $\mu\text{l}$ )

$V_{UZ}$  – volumen uzorka (30  $\mu\text{l}$ )

$\epsilon_{240}$  – ekstinkcijski koeficijent

$m_p$  – masa proteina (g)

Reakcijska otopina za određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) sadržavala je 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0), 0,2 mM askorbinsku kiselinu, 0,1 mM EDTA, 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nakano i Asada 1981) i biljni supernatant (120  $\mu\text{l}$ ). Neposredno prije mjerenja dodala sam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10  $\mu\text{l}$ ) u reakcijsku smjesu. Za slijepu probu koristila sam ekstrakcijski pufer. Pad apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline mjerila sam svaku sekundu tijekom 60 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm (UV područje). Aktivnost APX izražena je kao količina potrošenog askorbata u  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . (jedna jedinica, 1 U) po miligramu proteina, uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon_{290}=2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), odnosno kao pad koncentracije supstrata prema izrazu:

$$APX = \frac{\Delta A \times t \times V_{UK}}{V_{UZ} \times \epsilon_{290} \times m_p} (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{proteina}}^{-1})$$

$\Delta A$  – srednja vrijednost promjene apsorbancije u 1 s

$t$  – faktor kojim se množi da bi se rezultat izrazio u minuti (=60)

$V_{UK}$  – ukupni volumen reakcijske otopine (1000  $\mu\text{l}$ )

$V_{UZ}$  – volumen uzorka (120  $\mu\text{l}$ )

$\epsilon_{290}$  – ekstinkcijski koeficijent

$m_p$  – masa proteina (g)

Za određivanje aktivnosti glutathion-S-transferaze (GST) koristila sam reakcijsku otopinu koja je sadržavala 100 mM kalij-fosfatni pufer (pH 6,5), 10 mM reducirani glutathion, 1mM EDTA, 100 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) i biljni supernatant (10  $\mu\text{l}$ ) (Habig i Jacoby 1981). Pratila sam porast apsorbancije zbog redukcije supstrata CNDNB putem SH-grupe od glutathiona svakih 15 sekundi dvije i pol minute pri valnoj duljini od 340 nm. Aktivnost GST izražena je kao količina nastalog produkta u  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . (jedna jedinica, 1 U) te je izračunata

prema gore navedenim izrazima, samo uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon_{340}=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.2.4. Određivanje malondialdehida i drugih aldehida

Kako bih odredila sadržaj malondialdehida (MDA) kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 200  $\mu\text{l}$  biljnog supernatanta sa 600  $\mu\text{l}$  reakcijske otopine (0,25% tiobarbiturine kiseline (TBA) otopljene u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA) uz dodatak 0,01%-tnog butiliranog hidroksitoluena). Kao slijepu probu koristila sam reakcijsku smjesu. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroeprevete (Slika 13) i zagrijala ih u sušioniku na 95°C 30 minuta. Tijekom zagrijavanja reakcijske otopine niskog pH dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa pri čemu nastaju malondialdehidi. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA zbog čega nastaje crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Nakon grijanja, semimikroeprevete podvrgnula sam naglom hlađenju u ledenoj kupelji te su centrifugirane 10 minuta na 10 000 $\times$ g. Uzorke i slijepu probu potom sam prelila u kivete i očitavala im apsorbancije na valnim duljinama 532 i 600 nm (korekcija za nespecifičnu замуćenost) (Heath i Packer 1968) te na 455 nm (Meir i sur. 1992).



**Slika 13.** *Uzorci i slijepa proba u semimikroeprevetama prije zagrijavanja*

Sadržaj MDA izražen je uz ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{532}=155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , a sadržaj aldehida (1-propanal, 1-butanal, 1-heksanal, 1-heptanal i 1-propanal-dimetil-acetal) uz ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{455}=457 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (prosjek za 5 aldehida).

#### 4.2.5. Statistička obrada podataka

Za provedbu statističke analize i njihovih grafičkih prikaza koristila sam računalni program STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel program Microsoft Office paketa. Svaki brojčani prikaz grafikonom aritmetička je sredina 3 replike. Razlike između eksperimentalnih grupa testirala sam jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom

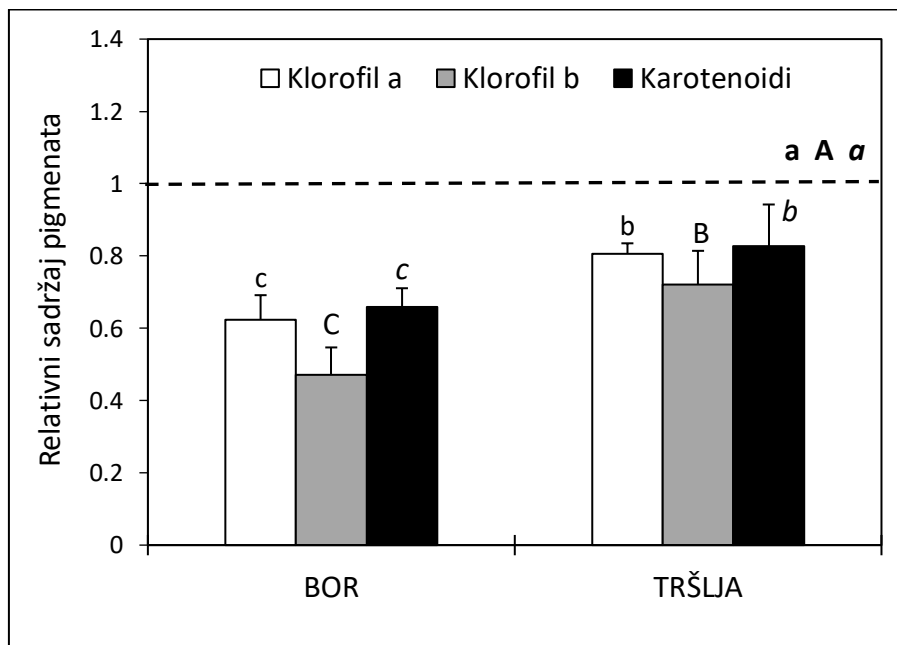
višestrukih usporedbi nakon normalizacije pojedinog tretmana na odgovarajuće kontrole. Kontrolama je dodijeljena vrijednost 1, a statistički značajne razlike uz razinu značajnosti od 0,05 ( $p < 0,05$ ) između kontrole i biljaka sakupljenih na odlagalištu pepela i šljake prikazane su različitim slovima. Originalni podaci prikazani su u Tablici 9 u prilogu. Uz to, izračunala sam Pearsonov koeficijent korelacije za promatrane parametre.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Vrijednosti sadržaja klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida (mg/g DW) izražene su kao relativne jedinice u odnosu na odgovarajuće kontrole (vrijednost 1) za pojedinu biljnu vrstu (Slika 14).

Vidljivo je da je sadržaj svih pigmenata u listovima tršlje i alepskog bora s lokacije Jugovinil statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu, s tim da je znatno veće smanjenje pigmenata zabilježeno u alepskom boru u odnosu na tršlju. Rezultati pokazuju da je klorofil *b* izmjerjen u listovima tršlje i bora s lokacije Jugovinil pokazao najveće smanjenje u usporedbi s drugim pigmentima sa iste lokacije.

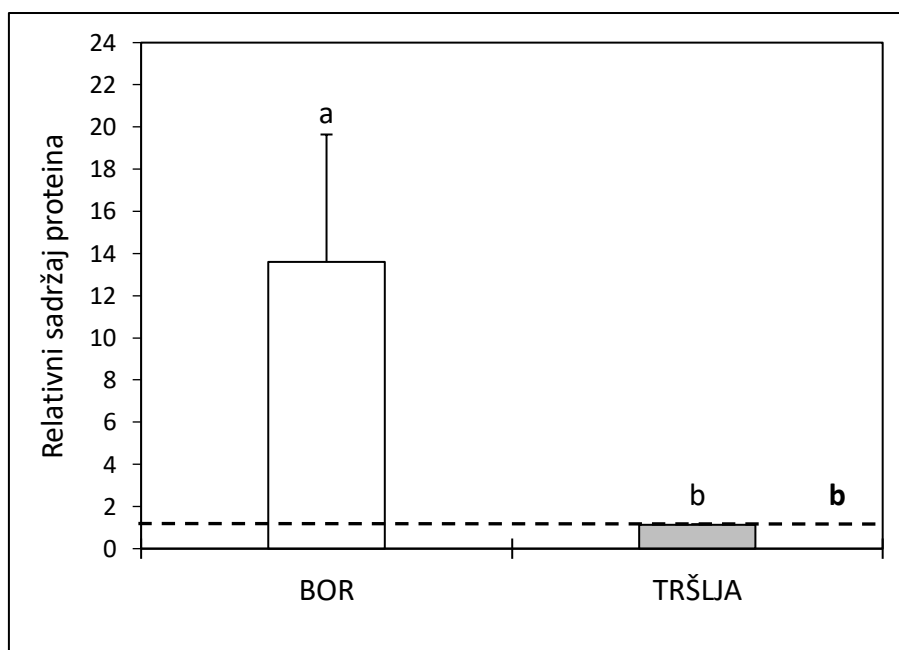


**Slika 14.** Relativni sadržaj klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida u listovima alepskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 5.2. Relativni sadržaj proteina

Ukupni sadržaj topivih proteina (mg/gDW) izražen u relativnim jedinicama prikazan je na Slici 15.

U listovima alepskog bora s lokacije Jugovinil zabilježen je 13 puta veći sadržaj proteina u odnosu na kontrolu i na sadržaj proteina u listovima tršlje s lokacije Jugovinil. Relativni sadržaj proteina u listovima tršlje s lokacije Jugovinil nije se statistički značajno razlikovao od kontrole.

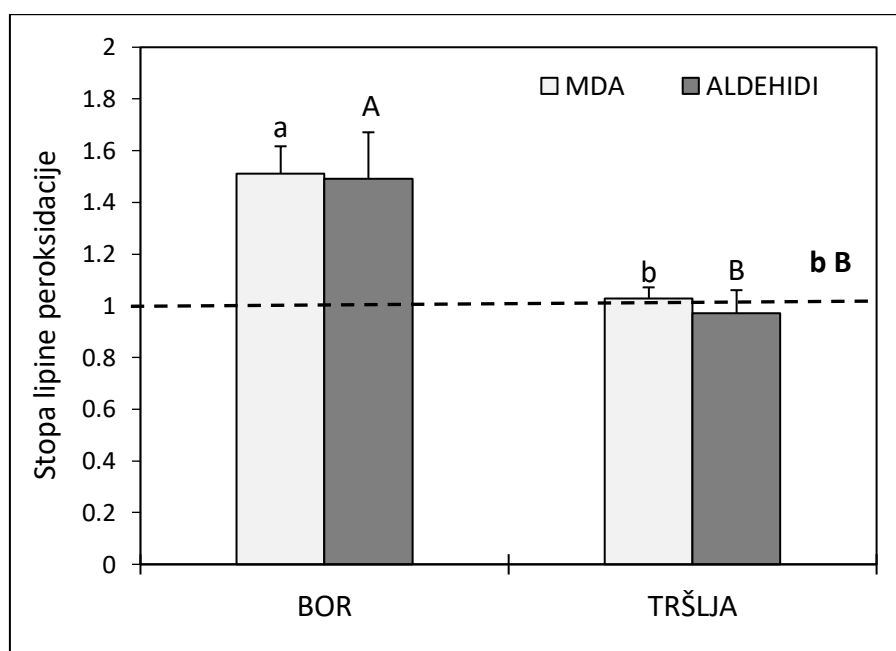


**Slika 15.** Relativni sadržaj ukupnih proteina u listovima alepskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Sadržaj malondialdehida i ostalih aldehida

Stopa lipidne peroksidacije odnosno razina oštećenja lipidne komponente staničnih membrana procijenjena je putem sadržaja malondialdehida (kao jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije) i sadržaja ostalih aldehida (nmol/g DW).

Relativni sadržaj MDA i ostalih aldehida prikazan je na Slici 16. U listovima alepskog bora s lokacije Jugovinil zabilježen je porast lipidne peroksidacije obzirom da su oba parametra, sadržaj MDA i ostalih aldehida, bili znatno povećani u odnosu na kontrolnu lokaciju. S druge strane, vrijednost MDA i ostalih aldehida u listovima tršlje s lokacije Jugovinil nije se bitno razlikovala od kontrolne vrijednosti.



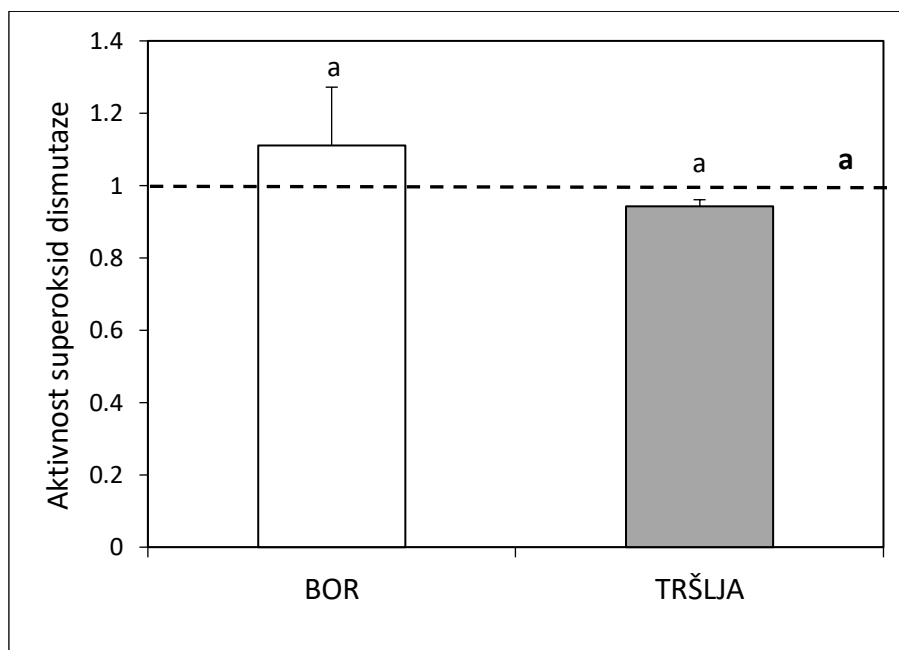
**Slika 16.** Relativni saržaj malondialdehida i aldehida u listovima alepskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).



## 5.4. Aktivnost enzima

### 5.4.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Na Slici 17. prikazana je aktivnost SOD (U/mg proteina) u relativnim jedinicama. Rezultati pokazuju da se aktivnost tog enzima u listovima tršlje i bora s lokacije Jugovinil statistički značajno ne razlikuje u odnosu na kontrolnu lokaciju.



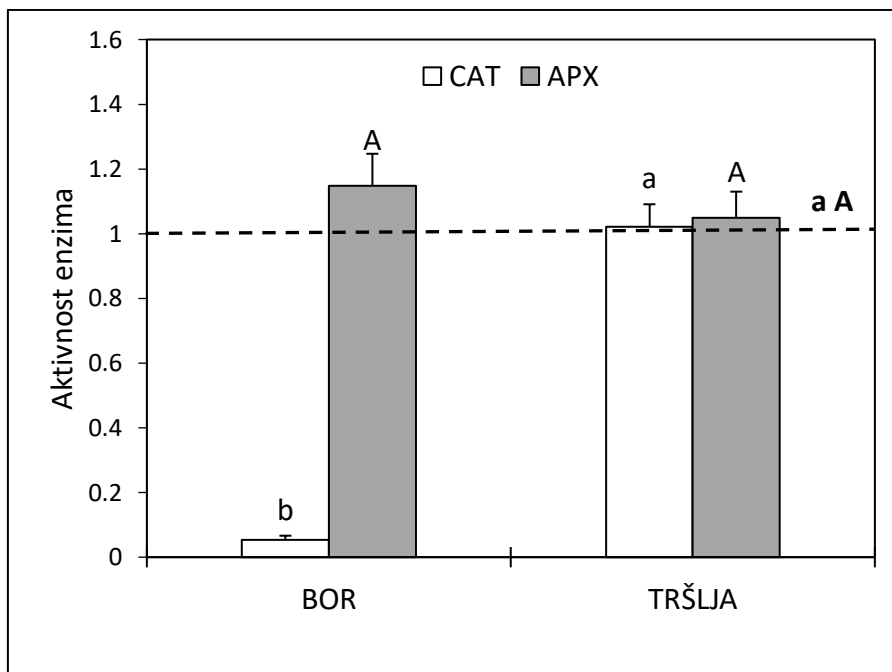
**Slika 17.** Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u listovima alepskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.2. Aktivnost katalaze i askorbat peroksidaze

Aktivnost enzima koji kataliziraju razgradnju vodikovog peroksida, katalaze (CAT) i askorbat peroksidaze (APX), prikazana je na Slici 18.

U listovima alepskog bora s lokacije Jugovinil uočena je statistički značajna inhibicija CAT (otprilike 19 puta niža vrijednost u odnosu na kontrolnu lokaciju). Aktivnost CAT u listovima tršlje s lokacije Jugovini bila je slična kontrolnim vrijednostima.

Što se tiče aktivnosti APX, može se uočiti da se aktivnost tog enzima u listovima alepskog bora i tršlje s lokacije Jugovinil ne razlikuje statistički značajno u odnosu na kontrolu.



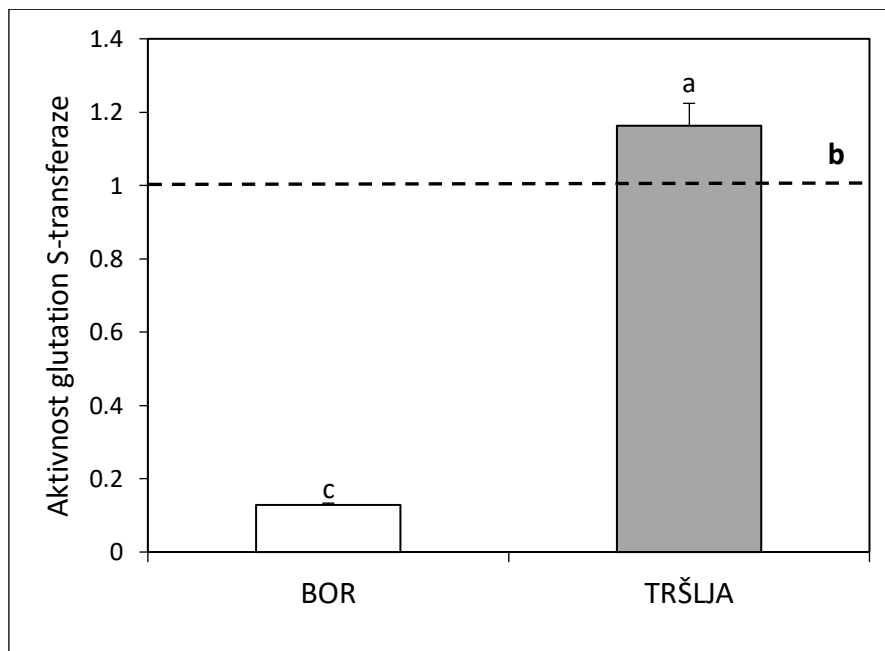
**Slika 18.** Aktivnost katalaze (CAT) i askorbat peroksidaze (APX) u listovima alepskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

### 5.4.3. Aktivnost glutation-S-transferaze

Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) prikazana je na Slici 19.

Aktivnost GST u listovima alepskog bora s lokacije Jugovinil pokazuje statistički značajno smanjenje (gotovo 8 puta niža vrijednost) u odnosu na aktivnost tog enzima u listovima s kontrolne lokacije i u odnosu na aktivnost tog enzima u listovima tršlje s lokacije Jugovinil.

U listovima tršlje s lokacije Jugovinil aktivnost bila je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu.



**Slika 19.** Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u listovima alpskog bora i tršlje sakupljenih s taložnice Jugovinil u odnosu na kontrolnu lokaciju (isprekidana linija). Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 5.5. Pearsonov koeficijent korelacije

Pearsonov koeficijent korelacije je izračunat za sve varijable mjerene u listovima tršlje i alepskog bora (Tablica 8). Proteini pokazuju vrlo jaku pozitivnu korelaciju s MDA i aldehidima te jaku negativnu korelaciju sa fotosintetskim pigmentima te s aktivnosti CAT i GST. Izrazito jaka pozitivna korelacija je uočena između MDA i ostalih aldehida, a MDA pokazuje vrlo negativnu korelaciju sa fotosintetskim pigmentima te s aktivnosti CAT i GST. Klorofil a, klorofil b i karotenoidi pokazuju vrlo jaku pozitivnu međusobnu korelaciju. Također, može se uočiti jaka negativna korelacija između fotosintetskih pigmenata i APX, te vrlo jaka pozitivna korelacija između pigmenata i GST. Klorofil b pokazuje jaku pozitivnu korelaciju sa SOD. Vrlo jako pozitivna korelacija uočava se i između CAT i GST.

**Tablica 8.** Pearsonov koeficijent korelacije za varijable mjerene u listovima tršlje i bora s lokacija Jugovinil i Čiovo (kontrolna lokacija)

	proteini	MDA	aldehidi	klorofil a	klorofil b	karotenoidi	CAT	APX	SOD
<b>MDA</b>	0,96								
<b>aldehidi</b>	0,98	0,96							
<b>klorofil a</b>	-0,83	-0,93	-0,86						
<b>klorofil b</b>	-0,78	-0,88	-0,81	0,98					
<b>karotenoidi</b>	-0,83	-0,91	-0,82	0,97	0,93				
<b>CAT</b>	-0,89	-0,97	-0,93	0,94	0,89	0,91			
<b>APX</b>	0,38	0,54	0,41	-0,75	-0,69	-0,81	-0,65		
<b>SOD</b>	0,69	0,73	0,69	-0,53	-0,47	-0,51	-0,64	0,19	
<b>GST</b>	-0,89	-0,96	-0,93	0,89	0,82	0,87	0,99	-0,60	-0,66

Korelacije označene crvenom bojom su statistički značajne ( $p < 0,05$ ).

## 6. RASPRAVA

Odgovor biljaka na stres vrlo je složen sustav koji objedinjuje genetske, molekularne i fiziološke mehanizme, a mnogi od njih još su nepoznanica. Fitotoksikološka analiza uzoraka tršlje i alepskog bora s područja taložnice bivše tvornice Jugovinil nadovezala se na već postojeća istraživanja radiološkog učinka na istom području Skoko iz 2014. godine. Metaboličke promjene kod biljaka u stresnim uvjetima obično se javljaju prije vidljivih simptoma, stoga dobiveni rezultati mogu biti indikacija budućeg stanja u okolišu. No, usporedba rezultata dobivenih u ovom radu s rezultatima drugih istraživanja bila je otežana obzirom da literaturnih podataka gotovo da i nema, odnosno utjecaj prirodnih radioaktivnih materijala na biljke na ovom nivou se dosad nije istraživao.

Poznato je da na sadržaj fotosintetskih pigmenata mogu utjecati sezonske promjene (godišnja doba), promjene u temperaturi, prejaki intenzitet svjetlosti, suša, stres uzrokovan teškim metalima, ozonom i drugim zagađivačima. Niska temperatura uzrokuje inhibiciju aktivnosti enzima uključenih u fotosintezu i padu fluidnosti membrane što utječe na normalno funkcioniranje proteina u fotosintetskim sustavima. Također, dolazi do povećanog stvaranja i nakupljanja ROS koji mogu uzrokovati oksidacijski stres i dovesti do smanjenja fotosinteze oštećenjem brojnih komponenti fotosistema (Liu i sur. 2018). No, u ovom je radu zabilježeno značajno sniženje sadržaja mjerenih fotosintetskih pigmenata u listovima tršlje i alepskog bora s taložnice u odnosu na odgovarajuće kontrolne biljke. Takvi rezultati upućuju na negativan utjecaj prirodnih radionuklida prisutnih u biljkama. Naime, prijašnjom radiološkom analizom Skoko (2014) je utvrdila statistički značajno povećanje vrijednosti koncentracija aktivnosti  $^{226}\text{Ra}$  u biljkama s taložnice u odnosu na kontrolno područje. Tu pojavu objašnjava time što  $^{226}\text{Ra}$  pokazuje veću biološku mobilnost u odnosu na druge radionuklide, a njegovo oksidacijsko stanje (+2) čini ga sličnim  $\text{Ca}^{2+}$ , koji je jedan od esencijalnih makronutrijenata za biljku. Obzirom da je utvrđena vrlo jaka negativna korelacija između fotosintetskih pigmenata i MDA, moglo bi se zaključiti da  $^{226}\text{Ra}$  i drugi toksikanti prisutni u taložnici uzrokuju lipidnu peroksidaciju u fotosintetskim membranama u kloroplastima alepskog bora što je posljedično dovelo do smanjenja sadržaja fotosintetskih pigmenata. Osim potencijalnog toksičnog učinka  $^{226}\text{Ra}$ , do sniženja sadržaja mjerenih pigmenata moglo je doći zbog mogućeg smanjenja sadržaja kalcija u biljkama (obzirom na isto oksidacijsko stanje Ra i Ca). Taj makroelement ima važnu ulogu u fotosintezi, sudjeluje u regulaciji gibanja puči i u regulaciji nekoliko proteina koji sudjeluju u fotosintezi (Wang i sur. 2019). Kalcij također ima fundamentalnu ulogu u održavanju stabilnosti membrane (povezujući fosfatne i karboksilne grupe fosfolipida s proteinima). Brojni okolišni uvjeti (ekstremne temperature, suša, solni stres, anoksija, oksidativni stres, stres izazvan teškim metalima, biogeni stres) i razvojni signali mogu aktivirati kanale za  $\text{Ca}^{2+}$  u staničnim membranama koji dovode do porasta tog iona u citosolu gdje se primarno veže na Ca-proteine (poput kalmodulina, Ca-ovisnih protein kinaza, aneksina i drugih). Time se mijenjaju strukturna ili enzimska svojstva tih proteina što zauzvrat može dovesti do promjena u prijenosu otopljenih tvari, u metabolizmu, u morfologiji stanice i u genskoj ekspresiji

(Marschner 2012). Simptomi nedostatka kalcija u biljci vidljivi su i na habitusu biljke, a ponajprije na mladom lišću gdje se pojavljuje kloroza čime se dodatno može smanjiti stopa fotosinteze (Vukadinović i Vukadinović 2011).

Obzirom da je sadržaj fotosintetskih pigmenata bio znatno niži u listovima bora nego u listovima tršlje, može se zaključiti da je bor osjetljiviji na onečišćenje uzrokovano radionuklidima prisutnim u pepelu i šljaki bivše kemijske tvornice Jugovinil. No, takvom su rezultatu mogli pridonijeti i primjerice različita starost biljaka (kod mlađih i fiziološki aktivnijih djelova biljaka obično su povećane vrijednosti aktivnosti radionuklida) ili razlika u mikrolokaciji.

Relativni sadržaj proteina u listovima tršlje sakupljenih na testnoj lokaciji nije se bitno razlikovao u odnosu na kontrolu, no sirovi podaci (Prilozi, Tablica 9) pokazuju da je sadržaj proteina neovisno o lokaciji razmjerno visok. S druge strane, u iglicama alepskog bora utvrđen je višestruko viši sadržaj proteina u odnosu na iglice s kontrolne lokacije. Sirovi podaci (Prilozi, Tablica 9) pokazuju da je sadržaj proteina u iglicama s kontrolne lokacije vrlo nizak. S obzirom da u iglicama alepskog bora s testne lokacije nisu utvrđene razmjerno veće količine istraživanih enzima (snižene aktivnosti SOD, CAT i GST), razlog povećanoj koncentraciji proteina vjerojatno su proteini druge vrste. Dokazano je da biljke u stresnim uvjetima sintetiziraju stresne proteine (Pevallek-Kozlina 2003) koji mogu objasniti viši sadržaj proteina u uzorcima alepskog bora s taložnice. Proteini toplotnog šoka (HSP) čine jednu od najvažnijih klasa stresnih proteina koji djeluju u odgovoru na različite stresne čimbenike, uključujući ekstremne temperature, prejaku svjetlost i teške metale (Mishra i sur. 2018). Mogući razlog mogao bi biti i različit postotak suhe tvari i koncentracija proteina u iglicama; obično su u svježim iglicama vrijednosti spomenutih parametara više u starijim (prošlogodišnjim) iglicama nego u mlađim (ovogodišnjim). U starijim iglicama dolazi do prirodnog nakupljanja organske tvari čiji pretežni dio čine proteini (Slišković 2001). To su najvjerojatnije periferni proteini (topivi u vodi), fotosintetski proteini (citokromi, RUBISCO i sl.) ili stresni proteini.

Lipidna peroksidacija je nespecifična sekundarna reakcija na različite vrste stresa koju potiču ROS, a uključuje promjene u fizičkim osobinama i funkcijama membrane te ukazuje na oksidacijski stres. Glavni razgradni produkti takvih reakcija su brojni aldehidi, među kojima se malondialdehid (MDA) najčešće koristi kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja lipida stanične membrane. Relativni sadržaj aldehida i MDA u listovima tršlje s testne lokacije nije se značajno razlikovao od kontrole što ukazuje na njenu fiziološku otpornost na različite stresne uvjete, uključujući i prirodne radionuklide. S druge strane, u iglicama alepskog bora utvrđeno je značajno povećanje relativnog sadržaja aldehida i MDA što dokazuje povećanu stopu lipidne peroksidacije. Kako je već spomenuto, vrlo jaka negativna korelacija između fotosintetskih pigmenata i MDA upućuje na oštećenje lipidne komponente tilakoidnih membrana. Također je utvrđeno da MDA vrlo jako negativno korelira s CAT i GST što dovodi do zaključka da je do inhibicije tih enzima u iglicama bora došlo zbog povećanog stvaranja

ROS. Volkova i sur. (2017) su istraživali učinak radijacije ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$ ) na populaciju običnog bora (*Pinus sylvestris* L.) 23 odnosno 27 godina nakon Černobilske katastrofe (uzorci su sakupljeni u periodu 2009-2013). U tom su istraživanju Volkova i sur. (2017) utvrdili su da je kronično izlaganje bora s pojedinih testnih lokacija relativno niskim dozama radijacije ( $50 \text{ mGyg}^{-1}$ ) dovelo do porasta MDA u listovima bora. Djelovanjem brojnih stresnih čimbenika povećava se stvaranje kisikovih radikala, a također se potiče ekspresija gena za antioksidacijske mehanizme što povećava razinu antioksidansa koji uklanjaju nastale radikale. Stvaranje kisikovih radikala i molekula koje su oštećene radikalima povećava se tijekom izlaganja biljaka stresnim čimbenicima jer se narušava ravnoteža između proizvodnje i eliminacije (Fodor 2002). Dakle, reakcija biljke na stres je stohastička i ovisi o karakteristikama stresnih čimbenika (trajanje, jačina, učestalost izlaganja), biljnim karakteristikama (vrsta tkiva i organa, razvojni stadij i genotip), ali i o sinergijskom djelovanju svih stresora prisutnih u okolišu (Zovko 2018). Osim radionuklida, u zaljevu su pronađene i veće koncentracije žive, olova, cinka i bakra koji također uzrokuju oštećenja vezana uz oksidacijski stres (Bertanjoli 2016).

Odgovor na stres iniciran je kada biljka prepozna stres na staničnoj razini. Nakon prepoznavanja i prenošenja signala slijedi indukcija gena koji odgovaraju na stres, a konačni rezultat je sinteza specifičnih proteina i metabolita. U slučaju da je odgovor biljke neovisan o vrsti stresnog čimbenika koji ga je uzrokovao javlja se nespecifični odgovor na stres. On uključuje i promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GST, APX). Prijašnjim je istraživanjima dokazano da enzim SOD čini prvu liniju antioksidacijskih mehanizama u obrani od stresnih čimbenika poput niskih temperatura (Liu i sur. 2018), solnog stresa (Hernandez i sur. 1995) i teških metala (Tkalec i sur. 2004); u tim je istraživanjima aktivnost SOD u biljkama bila povećana. U ovom istraživanju utvrđeno je da nije došlo do promjene aktivnosti SOD u listovima tršlje i bora s testne lokacije u usporedbi s kontrolnom lokacijom. Mogući razlog je da su se biljke u taložnici kroz godine već prilagodile na povećanu količinu radionuklida te da je to razlog nepromijenjene aktivnosti SOD.

Enzimi koji razgrađuju  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CAT i APX, razlikuju se u specifičnosti tj. afinitetu za  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je kod CAT nizak (ali je reakcija brza), a kod APX visok, stoga taj enzim ima važniju ulogu u održavanju razine ROS u stanicama tijekom oksidacijskog stresa (Gill i Tuteja 2010). Aktivnost APX u listovima tršlje i alepskog bora s područja taložnice bivše tvornice nije se bitno razlikovala od kontrole. S druge strane, aktivnost CAT u listovima tršlje s testne lokacije također je bila nepromijenjena, a u iglicama bora znatno smanjena u odnosu na kontrolu. Nepromijenjene aktivnosti CAT i APX u listovima tršlje s testne lokacije ukazuju da nije bila potrebna indukcija tih enzima za razgradnju vodikovog peroksida, što je u skladu s nepromijenjenom aktivnosti SOD (čijom aktivnosti nastaje  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i nepromijenjenim sadržajem MDA u odnosu na kontrolu. S druge strane, lipidna peroksidacija je u iglicama bora s testne lokacije bila znatno povećana, a aktivnost CAT znatno smanjena. S obzirom da je aktivnost SOD i APX u iglicama bora s taložnice bila slična kontroli, moglo bi se zaključiti da APX sudjeluje u razgradnji  $\text{H}_2\text{O}_2$  za razliku od CAT čija je aktivnost bila znatno inhibirana u

odnosu na kontrolu. Zamijećeno smanjenje aktivnosti CAT u listovima tršlje s testne lokacije moglo bi upućivati na neravnotežu između povećanog sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastalog fotorespracijom i nemogućnosti razgradnje tog ROS u peroksisomima (Mittova i sur. 2003). Mogući razlozi za smanjenu aktivnost CAT mogu uključivati inhibiciju sinteze tog enzima ili promjenu u povezivanju podjedinica enzima u stresnim uvjetima, ili razgradnju tog enzima putem proteaze u peroksisomu (Distefano i sur. 1999). Također, Qian i sur. (2013) prilikom istraživanja na biljci *Arabidopsis thaliana* utvrdili su da se povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima događa kada je biljka pod blagim stresom protiv kojeg se može uspješno boriti, dok konstantan ili jaki stres uzrokuje smanjenje enzimske aktivnosti. Sniženu aktivnost CAT u iglicama bora mogli su izazvati prirodni radionuklidi prisutni u taložnici, ali i drugi stresni čimbenici npr. teški metali, iako je i potencijalno dulje izlaganje bora (starost biljke) stresorima prisutnim u taložnici moglo pridonijeti povećanoj lipidnoj peroksidaciji i inhibiciji pojedinih antioksidacijskih enzima. Naime, i aktivnost GST bila je znatno smanjena u iglicama bora s testne lokacije u odnosu na kontrolnu lokaciju. U listovima tršlje s testne lokacije aktivnost tog enzima bila je statistički značajno povećana u odnosu na kontrolu.

GST je superporodica enzima koji sudjeluju u fazi II biotransformacije tj. detoksikacije ksenobiotika. Ti enzimi kataliziraju konjugaciju između tiolne (-SH) grupe glutationa (GSH) i elektrofilnog dijela (obično hidrofobnih i toksičnih) ksenobiotika. Takvi konjugati se zatim upućuju u vakuolu ili staničnu stijenu (pohrana) ili se izlučuju iz biljnog organizma putem ATP-ovisnih crpki (eliminacija). Ekspresija GST inducirana je različitim stresnim čimbenicima, uključujući biotički stres (npr. razni patogeni) i abiotički stres (npr. niske temperature, suša, teški metali, povećani salinitet, ranjavanje), ali do ekspresije tih enzima dolazi i tijekom biljnog razvitka i u brojnim procesima. Primjerice, izuzev u detoksikaciji herbicida, istraživanja pokazuju uključenost GST u biosintezu biljnih hormona, razgradnju tirozina i razgradnju peroksida (Kumar i Trivedi 2018). U ovom je radu aktivnost GST dobar indikator razlika u osjetljivosti testnih biljaka (tršlje i bora) na prisutnost radionuklida i drugih mogućih toksikanata iz taložnice. Istraživanjem na biljkama utvrđeno je sinergističko djelovanje ionizirajućeg zračenja i teških metala (Geras'kin 2005). Ekspresija GST bila je povećana nakon izlaganja  $\gamma$ -zračenju, iako se tu radilo o kratkotrajnom izlaganju (Cho i sur. 2000). Kronično izlaganje uzoraka običnog bora s nekoliko testnih lokacija relativno niskim dozama radijacije (50 mGy·g<sup>-1</sup>) uzrokovalo je porast koncentracije GSH kao i porast omjera reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH/GSSG) (Volkova i sur. 2017) u listovima te biljke. GSH je tripeptid niske molekulske mase, topiv u vodi te kao antioksidans ima ključnu ulogu u spriječavanju stanične disfunkcije u stresnim uvjetima. Zbog toga se koncentracija glutationa u biljnim stanicama često koristi kao pokazatelj oksidativnog stresa u biljkama (Vukadinović i Vukadinović 2011).

Usporedbom rezultata može se zaključiti da alepski bor u odnosu na tršlju generalno snažnije reagira na prisutne stresore u taložnici te bi se moglo zaključiti da se radi o radiosenzitivnoj biljci, barem u odnosu na tršlju. Potonja biljka mogla bi se okarakterizirati kao radiorezistentna u odnosu na bor, odnosno općenito kao biljna vrsta koja se vjerojatno bolje



prilagodila na povećanu količinu prirodnih radionuklida i drugih potencijalno toksičnih spojeva prisutnih u taložnici. Iako, kao što je napomenuto, i drugi faktori kao što su starost biljke i ukupna duljina izlaganja biljke mogli su utjecati na rezultat.

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata fitotoksikološke analize uzoraka alepskog bora i tršlje prikupljenih na taložnici bivše tvornice Jugovinil u veljači 2020. može se zaključiti da su stresori prisutni u taložnici, prije svega vjerojatno prirodni radionuklidi, doveli do sljedećeg:

1. Povećani sadržaj proteina u listovima bora, što upućuje na sintezu proteina uključenih u odgovor te biljke na stres, primjerice HSP proteina
2. Smanjeni relativni sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima tršlje i posebice bora, što upućuje na negativan učinak stresora iz taložnice na fotosintezu
3. Nepromijenjena aktivnost SOD u listovima testnih biljaka, što upućuje na robusnost tog enzima kao prve linije obrambenih mehanizama i na moguću prilagodbu na stres
4. Nepromijenjena aktivnost APX u listovima testnih biljaka, što ukazuje da je taj enzim ključan u razgradnji peroksida i također može upućivati na moguću prilagodbu na stres
5. Povećanje sadržaja MDA i drugih aldehida te smanjena aktivnost CAT i GST u uzorcima alepskog bora u odnosu na kontrolu upućuje na oštećenje membranskih lipida i inhibiciju dijela antioksidacijskih obrambenih mehanizama
6. Nepromijenjen sadržaj MDA i drugih aldehida i CAT kao i povećana aktivnost GST u listovima tršlje ukazuje na učinkovitije antioksidacijske mehanizme te biljke te u konačnici na bolju prilagodbu te biljke na stres

Navedeni zaključci ukazuju:

- da je u usporedbi s tršljom, alepski bor biljna vrsta osjetljivija na prirodne radionuklide, teške metale i druge potencijalne stresore prisutne u taložnici bivše tvornice Jugovinil
- na važnost ekotoksikoloških istraživanja jer i prirodni radiokativni materijali iz taložnice mogu uzrokovati fitotoksičnost

## 8. LITERATURA

1. Aebi, H. (1984), Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1990), Toxicological profile for Radium, US Public Health Service, str. 45
3. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2015), Public health statement for Thorium, < <https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=658&tid=121> > (pristupljeno 3.11.2020.)
4. Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002), Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82, 1227-1238
5. Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M. (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada.
6. Barišić D., Marović G., Senčar J. (2002), Problem pepela i šljake nastalih izgaranjem ugljena – primjer Kaštelanskog zaljeva, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb
7. Bedalov, Z. (2017), Jugovinil kao mjesto društvenog sjećanja u pričama Kaštelana. Diplomski rad , Filozofski fakultet, Zagreb
8. Bertanjoli, M. (2016), Zagađenost Kaštelanskog zaljeva. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek
9. Bhattacharjee S. (2014), Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: The two faces of oxidative stress. *Current Science* 107, 1811-1823
10. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003), Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91, 179-194
11. Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
12. Brain, R. A., Cedergreen, N. (2009), Biomarkers in Aquatic Plants: Selection and Utility. U: Whitcare, D. M. (ur.) *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, str. 49-110
13. Bunzl, K., Krake, W., Schimmack, W., Auerswald, K. (1995), Migration of Fallout <sup>239+240</sup>Pu, <sup>241</sup>Am and <sup>137</sup>Cs in the various horizons of a forest soil under pine. *Journal of Environmental Radioactivity* 28, 17-34
14. Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky Papst, I., Tkalec, M., Balen, B. (2017), Toxicity of silver ions and differently

coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 18-28

15. Cvrtila, A. (2015), Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) zadarskog akvatorija. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
16. Distefano, S., Palma, J.M., McCarthy, I., del Río, L.A. (1999), Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta* 209, 308-313
17. Đikić, D., Glavač, H., Glavač, V., Hršak, V., Jelavi, V., Njegač, D., Simončić, V., Springer, O.P., Tomašković, I., Vojvodić V. (2001), Ekološki leksikon, Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja, Zagreb
18. Edreva, A., Yordanov, I., Kardjieva, R., Gesheva, E. (1998) Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical /active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum* 41, 185-191
19. Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. (2000), Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5(5),193-198
20. Fodor, F. (2002), Physiological responses of vascular plants to heavy metals. U: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad MNV, Strzałka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, str. 149-177
21. Gasperčić, I. (2010), Prilozi za povijest industrije plastike u Hrvatskoj: Proizvodnja poli(vinilklorida). *Polimeri* 31, 77-79
22. Geras'kin, S.A., Kim, J.K, Dikarev, V.G, Oudalova, A.A., Dikareva, N.S., Spirin, Y.V. (2005), Cytogenetic effects of combined radioactive (<sup>137</sup>Cs) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalate meristem cells. *Mutation Research* 586, 147-159
23. Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977), Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59, 309-314
24. Gill, S.S., Tuteja, N. (2010), Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930
25. Gosset, D.R., Millhollon, E.P., Lukas, M.C., Banks, S.W., Marney, M.M. (1994), The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant and Cell Reports* 13, 498-503
26. Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, K.P, Pakuwal, U. (2014) Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15(11), 4405-4409

27. Habig, W.H., Jacoby, W.B. (1981), Assays for differentiation of glutathione S-transferases, *Methods in Enzymology* 77, 398-405
28. Heath, R.L., Packer, L. (1968), Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I – Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125, 189-198
29. Herbinger, K., Tausz, M., Grill, D. (1999): Are winter adaptive changes in glutathione and chlorophyll contents in spruce needles triggered by low temperature or short days? *Phyton* 39, 171-174
30. Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Rio, L.A. (1995), Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105(1), 151-167
31. Horvatić, D. (2018), Primjena Lemna-testa u procjeni kvalitete površinskih voda. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek
32. Jezidžić, P. (2017), Genotoksičnost eluata tla onečišćenog rudarsko-industrijskim aktivnostima na području Istre. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
33. Jinmin, F., Huang, B. (2002), Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool- season grasses to localised drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 45, 105-114
34. Johnston, A.E., (2003), Understanding potassium and its use in agriculture. European Fertilizer Manufacturers Association, Brussels
35. Khavari-Nejad, R. A., Mostofi, Y. (1998): Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica* 35, 151-154
36. Kuk, V., Prelogović, E., Dragičević, I. (2000): Seismotectonically Active Zones in the Dinarides. *Geologia Croatica*, 53(2), 295 – 303, Zagreb
37. Kumar, S., Trivedi, P.K. (2018), Glutathione S-transferases: Role in combating abiotic stresses including arsenic detoxification in plants. *Frontiers in Plant Science* 9,751
38. Lichtenthaler, H. K. (1987), Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148, 350-382
39. Liu, X., Zhou, Y., Xiao, J., Bao, F. (2018), Effects of chilling on the structure, function and development of chloroplasts. *Frontiers in Plant Science* 9,1715.
40. Magdalenić, A., Crnković, B., Jašarević, I. (1980), Problemi vezani za radove u flišu. Gen. izvještaj, Zbornik radova 5. jug. simp. o meh. stijena i podz. rad., knjiga 2, Split, 93 – 109.

41. Mandre, M., Tuulmets, L. (1997), Pigments changes in Norway spruce induced by dust pollution. *Water, Air, and Soil Pollution* 94, 247-258
42. Marschner, H. (2012), *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* 3rd Edition. Amsterdam, Netherlands: Elsevier/Academic Press.
43. Mason, D. (1996), Responses of Venezuelan understory birds to selective logging, enrichment strips, and vine cutting. *Biotropica* 28, 296-309
44. Matić D., (2014), Uloga i metabolizam askorbinske kiseline u biljaka. Završni rad, Prirodoslovno-matematički rad, Zagreb
45. McGee, E.J., Synnott, H.J., Johanson, K.J., Fawaris, B.H., Nielsen, S.P., Horrill, A.D., Kennedy, V.H., Barbayiannis, N., Veresoglou, D.S., Dawson, D.E., Colgan, P.A., McGarry, A.T. (2000), Chernobyl fallout in a Swedish spruce forest ecosystem. *Journal of Environmental Radioactivity* 48, 59-78
46. Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Aharoni, N. (1992), Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(1), 128-132
47. Mihaljević, I., Lončar J., Smital T. (2016), Molekularna ekotoksikologija i biokemija. *Priroda* 1049, 54-57
48. Miloš, B., Maleš, P. (1998), Tla kaštelanskog zaljeva i problemi njihove zaštite. *Agronomski glasnik*, 60 (4), 185-204
49. Miličić, J. (2016), 30 godina od odluke o početku rada na projektu Gospodarenje prostorom Kaštelanskog zaljeva, Sveučilište u Splitu, Split
50. Miljak, J. (2017), Hidrološke značajke Kaštela. Diplomski rad, Odjel za geografiju Sveučilišta u Zadru, Zadar
51. Mishra, D., Shekhar, S., Singh, D., Chakraborty, S., and Chakraborty, N. (2018), Heat shock proteins and abiotic stress tolerance in plants. U: *Regulation of Heat Shock Protein Responses*, Asea, A., Kaur, P. (ur.). Springer: Cham, Switzerland, 41-69.
52. Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2003), Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant and Cell Environment* 26, 845-856

53. Mýśliwa-Kurdziel, B., Prasad, M. N. V., Strzalka, K. (2004), Photosynthesis in heavy metal stressed plants. U: Prasad, M. N. V. (ur.) Heavy metal stress in plants. from biomolecules to ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 148-152
54. Nakano, Y., Asada, K. (1981), Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867-880
55. Narodne novine, Strategija zbrinjavanja radioaktivnog otpada, iskorištenih izvora i iskorištenog nuklearnog goriva, br. 2382, 125/2014 < [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014\\_10\\_125\\_2382.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_10_125_2382.html) > (posjećeno 5.11.2020.)
56. Opća enciklopedija (1977) 3. izdanje (osam svezaka), Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb <[http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/veliki\\_periodni.html](http://www.pse.pbf.hr/hrvatski/veliki_periodni.html)> (pristupljeno 3.11.2020.)
57. Oreščanin, V., Barišić, D., Mikelić, L., Lovrenčić, I., Rožmarić Mačefat, M., Pavlović, G., Lulić, S. (2006), Chemical and radiological profile of the coal ash landfill in Kaštel Gomilica. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 57(1), 9-16
58. Paško, Č. (2015), Pronalaženje dokaza o djelotvornosti i sigurnosti antioksidansa u pacijenata s oboljelom jetrom. Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split
59. Pevalek-Kozlina B. (2003) Fiziologija bilja. Zagreb, Profil
60. Prlić, I. (2015), NORM – šljaka i pepeo kao ponovno upotrebljiv otpad. Hrvatska udruga za zdravo radno mjesto 6. Stručni skup „Zaštita zdravlja i sigurnost na radu, Gospodarenje otpadom – norme, propisi, novosti, zaštita, Zagreb
61. Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., Fu, Z. (2013), Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ion on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of environmental sciences*, 25(9), 1947-1956
62. Radetski C. M., Ferrari B., Cotelle S., Masfaraud J. F., Ferard J. F. (2004), Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment* 333, 209-216
63. Rayno, D.R. (1983), Estimated dose to man from uranium milling via the beef/milk food-chain pathway. *Science of The Total Environment* 31, 219-241  
Rozgaj, R. (1982), Biološki učinci urana. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 33, 353-360
64. Skoko, B. (2014a), Radiološki utjecaj otpada termoelektrane na ugljen na okoliš. Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb
65. Skoko, B. Marović, G., Babić, D. (2014b), Radioactivity in the Mediterranean flora of the Kaštela Bay, Croatia. *Journal of Environmental Radioactivity* 135, 36-43
66. Slišković D. (2001), Određivanje koncentracije proteina u iglicama smreke. Diplomski rad, Pedagoški fakultet, Osijek

67. Strelb, F., Gerzabek, M.H., Bossew, P., Kienzl, K. (1999) Distribution of radiocaesium in an Austrian forest stand. *Science of The Total Environment* 226, 75-83
68. Sofilić, T. (2014), *Ekotoksikologija*, Metalurški fakultet sveučilišta u Zagrebu, Sisak
69. Šestanović, S. (1998), Engineering – geological characteristics of marl from Eocene flysch in the City of Split, Croatia, *The Geotechnics of Hard Soils – Soft Rocks*, Evangelista i Picarelli (eds.), Balkema, Rotterdam, 311-314.
70. Šoštarić M. (2017), *Radiološka svojstva tla u Republici Hrvatskoj*. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
71. Šparica, M., Bačani, A., Horvat, V. (2010), Karbonatne i klastične naslage paleogena u Istri (Geološki i hidrološki prikaz) U: Horvat, M. (ur.), 4. Hrvatski geološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem – Knjiga sažetaka
72. Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Šikić, S., Pavlca, M., Balen, B. (2014), The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE* 9, 1; e87582
73. Toševski, A., Grgec, D., Padovan, B. (2012), Osnovno o genezi, sastavu i trošenju eocenskog fliša Hrvatskog obalnog pojasa. *Rudarsko-geološko-naftni zbornik*, Vol. 25, 47-62, Zagreb
74. Urošević, T. (2015), *Kemijska i toksikološka karakterizacija filtrata tla iz okolice TE Plomin*, diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
75. Vukadinović, V., Vukadinović, V. (2011), *Ishrana bilja*. Poljoprivredni fakultet, Osijek
76. Volkova, P.Y., Geras'kin, S.A., Kazakova, E.A. (2017), Radiation exposure in the remote period after the Chernobyl accident caused oxidative stress and genetic effects in Scots pine populations. *Scientific Reports* 7, 43009
77. Wang, Q., Yang, S., Wan, S., Li, X. (2019), The significance of calcium in photosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1353
78. Wellburn, A. R. (1994), The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144, 307-313
79. Zovko, M. (2018), *Učinak nanočestica srebra na pojavu oksidacijskoga stresa i ekspresiju proteina u duhanu (Nicotiana tabacum)*. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb



Korištene mrežne stranice:

1. <https://www.imi.hr/hr/projekt/cost-tu1301-norm4building/>(Link 1) (posjećeno 21.11.2020.)
2. <https://www.iaea.org/topics/radiation-safety-norm> (Link 2) (posjećeno 2.11.2020.)
3. [www.fizika.unios.hr](http://www.fizika.unios.hr)> 05-Nuklearna fizika predavanje (Slika 1) (posjećeno 30.10.2020.)
4. <https://apsorpcijagamazraka.wordpress.com/radioaktivnost/> (Slika 2) (posjećeno 30.10.2020.)
5. [http://ishranabilja.com.hr/literatura/ekosustavi/Ekosustavi%20u%20ekoloskom%20bilinogojstvu\\_I.pdf](http://ishranabilja.com.hr/literatura/ekosustavi/Ekosustavi%20u%20ekoloskom%20bilinogojstvu_I.pdf) (Slika 3) (posjećeno 10.11.2020.)
6. <https://mozks-zzh.com/mozks/wp-content/uploads/2020/04/Intenzitet-fotosinteze-i-kemosinteza.pdf> (Slika 4) (posjećeno 13.11.2020.)
7. <http://webgis.hgi-cgs.hr/gk300/> (Slika 6) (posjećeno 26.11.2020.)
8. <https://www.google.com/maps/> (Slika 8) (posjećeno 2.11.2020.)
9. <https://geoportal.dgu.hr/>, (slika 9) (posjećeno 2.11.2020.)
10. <http://www.plantsoftheworldonline.org/> (Slika 10) (posjećeno 27.11.2020.)
11. <https://www.plantea.com.hr/> (Slika 11) (posjećeno 27.11.2020.)

## ŽIVOTOPIS

Zovem se Valerija Neduhal, rođena sam 14. veljače 1997. u Zagrebu gdje trenutno i živim. Odrasla sam u općini Dubrava (pokraj Vrbovca) gdje sam pohađala osnovnu školu i stekla ljubav prema prirodnim znanostima. 2011. godine upisala sam II. (opću) gimnaziju u Zagrebu koju sam završila s odličnim uspjehom.

Preddiplomski studij znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2015. godine, a 2018. stekla sam zvanje sveučilišnog prvostupnika znanosti o okolišu sa završnim radom na temu "Utjecaj konvencionalne i monokulturne poljoprivrede na okoliš i prednosti organskog uzgoja". Iste godine upisala sam diplomski sveučilišni studij znanosti o okolišu te sam tijekom studiranja odradila laboratorijsku stručnu praksu na polju histologije. Također, dva puta sudjelovala sam u obrazovnoj manifestaciji „Noć biologije“ na radionicama o invazivnim vrstama rakova i biljnoj ljekarni. Uz studij, povremeno radim u Udruženju za razvoj kulture (klub Močvara) i pomažem na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu koje se bavi ekološkim uzgojem povrća.

Tijekom studija, ali i kroz privatni angažman zavoljela sam rad s biljkama, stoga u želji da produbim svoje znanje iz područja fiziologije bilja odlučila sam se na izradu diplomskog rada ove tematike.

## PRILOZI

**Tablica 9.** Vrijednosti mjerenih parametara u listovima bora i tršlje (sirovi podaci) s kontrolne i testne lokacije. U zagradi je naznačena SD.

parametar	BOR		TRŠLJA	
	kontrolna lokacija - Čiovo	testna lokacija - taložnica Jugovinil	kontrolna lokacija - Čiovo	testna lokacija - taložnica Jugovinil
proteini (mg/g DW)	0,22 (0,15)	2,92 (1,30)	6,86 (0,48)	7,76 (0,20)
klorofil a (mg/g DW)	1,00 (0,07)	0,62 (0,07)	1,08 (0,16)	0,87 (0,03)
klorofil b (mg/g DW)	0,35 (0,02)	0,16 (0,02)	0,35 (0,03)	0,25 (0,03)
karotenoidi (mg/g DW)	0,48 (0,02)	0,31 (0,02)	0,59 (0,05)	0,48 (0,07)
MDA (nmol/g DW)	70,6 (11,7)	106,7 (0,01)	252,3 (0,03)	259,6 (0,01)
aldehidi (nmol/g DW)	3,81 (0,65)	5,68 (0,68)	12,78 (0,25)	12,41 (1,14)
SOD (U/mg proteina)	845,6 (91,5)	939,3 (136,4)	27,9 (0,15)	26,4 (0,51)
CAT (U/mg proteina)	0,83 (0,11)	0,04 (0,01)	0,24 (0,022)	0,24 (0,015)
APX (U/mg proteina)	3,93 (0,15)	4,51 (0,38)	0,33 (0,03)	0,34 (0,03)
GST (U/mg proteina)	27,1 (2,01)	3,48 (0,13)	0,88 (0,06)	1,02 (0,05)