

**Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek**

Sonja Jelić

**UČINKOVITOST TROSKE NA RAST I FIZIOLOŠKE PROCESE KUKURUZA
(Zea mays L.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2010.

Ovaj je diplomski rad izrađen u Botaničkom zavodu
pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Radi Brkanac
u okviru diplomskog studija pri Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja zvanja magistar struke znanosti o okolišu

ZAHVALA

Najljepše zahvaljujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Sandri Radi Brkanac na iskazanom povjerenju, pomoći i podršci tijekom rada kao i na korisnim savjetima tijekom izrade rukopisa.

Također zahvaljujem dipl.ing. Katarini Glavaš, dipl.ing. Valeriji Vujčić i prof. biol. Dubravki Naumovski kao i svim ostalim članovima Laboratorija za fiziologiju bilja koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada.

Zahvaljujem dipl.ing. Heleni Crnojević iz Glavnog vodnogospodarskog laboratorija Hrvatskih voda na pomoć i pri mjerenju sadržaja metala, dušika i fosfora.

Zahvaljujem dr. sc. Tahiru Sofiliću na svim materijalima neophodnim za ovo istraživanje te na iskazanoj ljubaznosti.

Hvala mojoj cijeloj obitelji, a posebno mami Mirjani, tati Željku i bratu Viboru na strpljenju i podršci tijekom svih godina mog studiranja. Također hvala Neni i Spasi, Sašici i njevoj obitelji te mojoj teti Milki. I hvala Goranu koji je tu uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Diplomski rad
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UČINKOŠT TROSKE NA RAST I FIZIOLOŠKE PROCESE KUKURUZA (*Zea mays* L.)

Sonja Jelić

Botanički zavod Biološkog odsjeka
Prirodoslovno – matematički fakultet
Sveučilište u Zagrebu
Roosveltova trg 6, Zagreb

Bazna troska koja se koristi u ovom istraživanju je nusproizvod pri proizvodnji elika u elektrolu noj pe i. Obzirom da je sadržaj P, Fe, Ca, Mg i Mn u tako dobivenoj troski visok, a sadržaj Cd, Pb, Hg i ostalih toksi nih teških metala vrlo nizak, usitnjena troska je potencijalni izvor mineralnih tvari za rast i razvoj biljaka, posebice na tlima siromašnim željezom. Cilj istraživanja bio je procijeniti u inkovitost troske kao izvora odre enih hranjivih elemenata na rast i fiziološke procese kukuruza te utvrditi da li troska u biljci dovodi do oksidacijskog stresa kao posljedica primanja pove anih koli ina Fe i Cu. Kao supstrati za sadnju biljaka korištene su mješavine zemlje i pijeska u razli itim omjerima. Sjemenke kukuruza su zasijane u posudice i napunjene samo supstratom (kontrola) ili supstratom uz dodatak fino mljevene troske. Nakon dva tjedna, dijelu kontrolnih biljaka kao i onih uzgojenih uz dodatak troske dodan je NH_4NO_3 kao izvor N. Dijelu kontrolnih biljaka koje služe kao pozitivna kontrola dodano je teku e gnojivo – NPK i Fe. Osim parametara rasta, izmjerena je fluorescencija klorofila i prinos suhe tvari biljaka, sadržaj mineralnih tvari u supstratu i listovima biljaka, sadržaj klorofila i karotenoida, lipidna peroksidacija te aktivnosti antioksidacijskih enzima. Rezultati su pokazali da je troska vrlo dobar i jeftin izvor mikroelemenata poglavito Fe, Mn i Mg potrebnih biljci te da se njezinom upotrebom znatno smanjuje kloroza listova u biljaka koje rastu na tlima siromašnim željezom.

(54 stranice, 16 slika, 5 tablica, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: troska / kukuruz / hranjiva / fluorescencija klorofila a / oksidacijski pokazatelji

Mentor: Dr. sc. Sandra Radi Brkanac, doc.

Ocjenjiva i: Dr. sc. Sandra Radi Brkanac, doc.; Dr. sc. Renata Matonić, doc.;

Dr. sc. Nenad Buzjak, doc.; Dr. sc. Alan Moro, izv.prof.

Rad prihvaćen: 10.09.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

EFFECT OF STEEL SLAG ON GROWTH AND PHYSIOLOGY OF CORN (*Zea mays* L.)

Sonja Jeli

Department of Biology
Faculty of Science
University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Basic slag used in this study is a byproduct in the production of steel in electric arc furnaces. Given that the content of P, Fe, Ca, Mg and Mn in the slag is high and those of Cd, Pb, Hg and some other toxic heavy metals is very small, finely ground slag is a potential source of minerals necessary for plant growth and development, especially on iron-poor soils. The aim of this study was to evaluate the effects of steel slag, as a source of specific nutrient elements, on growth and physiological processes of corn and to determine whether steel slag can induce oxidative stress in plant cells. A mixture of earth and sand in different proportions was used as a substrate for planting. Corn seeds were sown in containers and filled with either pure substrate (control) or substrate mixed with finely ground slag. After two weeks, control plants and those grown with the addition of slag were supplemented with NH_4NO_3 as a source of N. A part of control plants that served as a positive control was supplemented with liquid fertilizers - NPK and Fe. Beside growth parameters, chlorophyll fluorescence, dry matter yield of plants, mineral content in the substrate and plant leaves, chlorophylls and carotenoids content, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities were measured after six weeks of cultivation. The results showed that steel slag is a very good and inexpensive source of microelements especially Fe, Mn and Mg essential to plants and that its usage significantly reduces leaf chlorosis in plants growing on iron-deficient soils.

(54 pages, 16 figures, 5 tables, 29 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: steel slag / corn / nutrients / chlorophyll a fluorescence / oxidative stress parameters

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

Reviewers: Dr. Sandra Radi Brkanac, Asst. Prof.; Dr. Renata Matoni kin, Asst. Prof.;
Dr. Nenad Buzjak, Asst. Prof.; Dr. Alan Moro, Assoc. Prof.

Thesis accepted: September, 10th 2010

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MINERALNA ISHRANA	2
1.2. TEŠKI METALI	2
1.3. TROSKA	3
1.4. OKSIDACIJSKI STRES	5
1.5. POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA	6
1.5.1. Lipidna peroksidacija	6
1.6. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV	7
1.6.1. Enzimski mehanizmi	8
1.6.1.1. Peroksidaze	8
1.6.1.2. Glutation reduktaza	9
1.6.2. Neenzimski mehanizmi	9
1.6.2.1. Karotenoidi	9
1.7. FLUORESCENCIJA KLOOROFILA	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. BILJNI MATERIJAL	14
3.1.1. Kukuruz (<i>Zea Mays</i> L.)	14
3.2. METODE	15
3.2.1. Sastav supstrata za saenje i uzgoj biljaka	15
3.2.2. Parametri rasta	16
3.2.3. Odreivanje sadržaja metala, dušika i fosfora u supstratu i listovima	16
3.2.3.1. Priprema uzoraka za odreivanje sadržaja metala u supstratu	16
3.2.3.2. Odreivanje sadržaja olova, kadmija i bakra u supstratu	17
3.2.3.3. Priprema uzoraka za odreivanje sadržaja metala u listovima	18
3.2.3.4. Odreivanje sadržaja natrija, magnezija, mangana i željeza u listovima	18
3.2.3.5. Priprema uzoraka za odreivanje sadržaja dušika i fosfora u supstratu i listovima	19

3.2.3.6. Određivanje sadržaja dušika i fosfora	20
3.2.4. Mjerenje uinkovitosti fotosinteze mjerenjem fluorescencije klorofila <i>a</i>	20
3.2.5. Određivanje sadržaja pigmenata	22
3.2.6. Određivanje sadržaja malondialdehida	23
3.2.7. Ekstrakcija topivih proteina i aktivnost antioksidacijskih enzima	23
3.2.7.1. Ekstrakcija i određivanje sadržaja topivih proteina	23
3.2.7.2. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	24
3.2.7.3. Određivanje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza	25
3.2.7.4. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze	25
3.2.8. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI	28
4.1. POKAZATELJI RASTA KUKURUZA	28
4.1.1. Visina biljaka	28
4.1.2. Broj listova	29
4.1.3. Dužina listova	30
4.1.4. Širina listova	31
4.1.5. Suha masa lista	32
4.2. SADRŽAJ METALA, DUŠIKA I FOSFORA	33
4.2.1. Sadržaj pojedinih metala, dušika i fosfora u supstratu	33
4.2.2. Sadržaj pojedinih metala, dušika i fosfora u listovima	34
4.3. FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA	35
4.3.1. <i>In situ</i> fluorescencija klorofila <i>a</i>	35
4.3.1.1. Optimalni i efektivni prinos fotosustava ii	35
4.3.1.2. Relativna stopa transporta elektrona	36
4.3.1.3. Fotokemijsko gašenje fluorescencije	37
4.3.1.4. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije	38
4.4. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA	39
4.4.1. Sadržaj klorofila <i>a</i> i <i>b</i>	39
4.4.2. Sadržaj ukupnih karotenoida	40
4.5. POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA	41
4.5.1. Sadržaj malondialdehida	41

4.5.2. Aktivnost glutation reduktaze	42
4.5.3. Aktivnost peroksidaza	43
4.5.3.1. Aktivnost gvajakol peroksidaze	43
4.5.3.2. Aktivnost askorbat peroksidaze	44
5. RASPRAVA	46
6. ZAKLJUČAK	50
7. LITERATURA	52

1.1. MINERALNE TVARI

Mineralne tvari se prirodno nalaze u tlu i vodi i od tamo dospijevaju u biljni i životinjski organizam. Ključni korak ugradnje mineralnih tvari u biosferu je asimilacija. Mineralne tvari ulaze u biljku kroz sustav korijena, a prenose se provodnim elementima ksilema do organa. Oko 98% mineralnih tvari nalazi se u tlu u obliku teško topljivih fosfata i karbonata, 2% mineralnih tvari u tlu adsorptivno je vezan za estice tla, a manje od 0,2% nalazi se u otopini tla. Biljkama je za razvoj nužno potrebno 17 elemenata koji su nezamjenjivi sastojci molekula potrebnih za njihov metabolizam. Makroelementi su: ugljik, kisik, vodik, dušik, sumpor, fosfor, kalij, kalcij i magnezij te su oni u većoj količini potrebni biljkama. Mikroelementi su: željezo, mangan, cink, bakar, nikal, klor, bor, molibden i neki drugi, a u biljkama djeluju većinom kao kofaktori u enzimima kataliziranim reakcijama, pa su zato potrebni u malim količinama (Pevalek-Kozlina, 2003).

1.2. TEŠKI METALI

Teški metali su metali koji imaju veliku specifičnu težinu (veću od 5 g cm^3), kao što je antimon, bizmut, kadmij, bakar, zlato, olovo, živa, nikal, srebro, i cink. Ovi metali se u prirodi javljaju kao rijetki elementi. Ljudskom aktivnošću, industrijskom upotrebom gnojiva i pesticida dolazi do povećanja koncentracije teških metala u tlu te njihovog širenja u tlu. Teški metali mogu biti toksični čak i u malim količinama, opstaju u okolišu i mogu se nakupljati do nivoa koji ograničavaju rast biljkama i time postaju stresni čimbenici za biljke.

Teški metali često djeluju inhibitorno na mnoge fiziološke procese, a može ih se podijeliti u dvije skupine. U prvoj su skupini metali poput željeza, bakra, mangana i molibdena koji su u malim količinama prijeko potrebni za metabolizam, ali u višim koncentracijama postaju toksični. U drugoj su skupini oni elementi koji biljci nisu potrebni, na primjer kadmij, živa i olovo, a u malim količinama su toksičniji od metala prve skupine.

1.3. TROSKA

elika je vrsta otopina ugljika, mangana, silicija, kroma i niza drugih elemenata. Prilikom taljenja elika nastaje troska kao rezultat staljivanja oksida. Nakon završetka oksidacijskih procesa, troska se uklanja iz peći. Pri procesu proizvodnje elika u elektroli noj peći nastaje oko 15% troske po toni elika. Velike količine troske zahtijevaju poseban pristup odlaganju, skladištenju i zbrinjavanju tog materijala. Kako bi se troska mogla upotrebljavati kao sekundarna sirovina ispitana su joj kemijska svojstva, elementarni i fazni sastav, morfologija te sadržaj metala u eluatima.

U Tablici 1. prikazan je kemijski sastav troske (Rastov an-Mio, 1996).

Tablica 1. Prosječne vrijednosti kemijskog sastava EAF troske dobivene u procesu proizvodnje ugljenih nelegiranih i nisko legiranih elika.

Kemijski sastav	%
Fe	10-35 %
CaO	25-45 %
SiO ₂	10-18 %
Al ₂ O ₃	3-8 %
MgO	4-13 %
Cr ₂ O ₃	1-5 %
TiO ₂ , P ₂ O ₅ , Na ₂ O, K ₂ O, V ₂ O ₅ , ZnO, CuO, S i C	nešto niže količine

Opširna ispitivanja troske ukazala su na njen stabilan kemijski sastav i nisku radioaktivnost. Ta stabilnost troske prema okolini dozvoljava mogućnost šire primjene materijala kao sekundarne sirovine u silikatnoj industriji. Također, gamaspektrometrijom utvrđeno je da troska ima niske vrijednosti radioaktivnih nuklida koje ne prelaze dozvoljenu granicu radioaktivne kontaminacije i time ukazuje na mogućnost upotrebe i odlaganja ispitane troske bez opasnosti (Rastov an-Mio, 1996).

U ovom je radu korištena troska TV-04 dobivena prilikom lijevanja najzastupljenijih vrsta elika (vodom hlađena troska iz proizvodnje ugljenih nelegiranih i nisko legiranih elika) u proizvodnom programu CMC Sisak d.o.o. (bivša Valjaonica cijevi Sisak). Na temelju analize eluata troske provedene u

Laboratoriju za tlo i otpad Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, otpadna troska TV-04 (nusproizvod pri proizvodnji elika u elektrope i) zadovoljava uvjete za odlaganje neopasnog otpada prema Pravilniku o na inima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada za odlagališta otpada: NN 117/2007 (Tablica 2).

Tablica 2. Rezultati ispitivanja eluata troske izmjereni atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.

Metali i metaloidi	mg/kg suhe tvari
Ukupni krom	<0,5
Bakar	<1
Cink	<1
Nikal	<1
Olovo	<1
Kadmij	<0,1
Arsen	<0,1
Živa	<0,05
Selen	<0,05
Barij	<15,9
Molidben	<0,628
Antimon	<0,05

Stoga se elektrope na troska sve više koristi kao sekundarni materijal npr. u građevinskoj industriji kao dodatak cementu te kao zamjena za prirodne mineralne agregate u proizvodnji asfaltnih mješavina u cestogradnji. Naime, takva troska ima veliku gustoću i vrstoću te je visoko otporna na poliranje i habanje pa je stoga vrlo pogodan materijal za izgradnju cesta (Sofili i sur., 2010).

Obzirom na svoj sastav, elektrope na troska se također sve više koristi u poljoprivredi kao anorganski poboljšivač tla (Rastov an-Mio i sur., 2009).

1.4. OKSIDACIJSKI STRES

Oksidacijski stres rezultat je stvaranja suviška kisikovih reaktivnih oblika (eng. ROS) koji uključuju: superoksid (O_2^-), singletni kisik (O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i vodikov peroksid (H_2O_2) te ostale slobodne radikale. Oksidacijski stres može biti i rezultat normalne metaboličke aktivnosti ili imbenika okoliša.

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica 3 imbenika:

1. povećano stvaranje oksidanasa
2. smanjenje antioksidacijske zaštite
3. neuspješan popravak oštećenja

Slobodni radikali kemijski su spojevi s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Taj nespareni elektron slobodna je valencija, zbog čega slobodni radikali imaju vrlo veliku kemijsku reaktivnost. Kisik nije molekula koja izravno izaziva oksidacijski stres, ali je prekursor svih reaktivnih oblika kisika (Blokhina i sur., 2003). U kemijskoj reakciji, poznatoj i kao *oksidacija*, dolazi do brzog spajanja slobodnih radikala s bilo kojim bliskim proteinom, lipidom, ugljikohidratom ili nukleinskom kiselinom. Vezivanjem slobodnih radikala na spomenute organske molekule mogu nastati novi spojevi, također sa svojstvima radikala i mogu dovesti u pokretanje novog niza neenzimskih i enzimskih reakcija. Takvi spojevi mogu denaturirati proteine i oštetiti nukleinske kiseline. Kisikovi radikali mogu također štetno djelovati na membrane tako da uzrokuju peroksidaciju membranskih lipida i dovode do oštećenja tj. povećane propusnosti membrana (Shalata i sur., 2001).

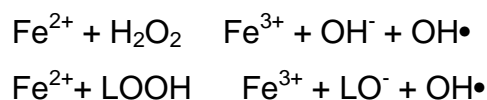
Reaktivni oblici kisika se razlikuju u svojim svojstvima kao što su topivost, sposobnost difuzije i reagiranja s različitim biološkim molekulama, a također nastaju i u raznim staničnim i međustaničnim odjeljcima. Zbog toga je u biljnoj stanici u svim njenim dijelovima potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane. Antioksidacijski sustav kao odgovor biljnih stanica na stres uključuje različite enzimske i neenzimske mehanizme za uklanjanje štetnih spojeva kisika (Breusegem i sur., 2002).

1.5. POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA

1.5.1. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Stresni uvjeti uzrokuju promjene u staninjoj membrani, a time utječu i na procese vezane uz provođenje signala i stvaranje energije (Uma i sur., 1995). Lipidna peroksidacija ukazuje na indukciju oksidacijskog stresa u biljnom organizmu do kojeg dolazi ukoliko je produkcija otrovnih spojeva kisika premašila mogućnosti mehanizama za uklanjanje tih otrova (Jinmin i Huang, 2002). To je sekundarna reakcija na stres, a izazivaju je primarni proizvodi stresa, radikali kisika i otrovni spojevi kisika.

Glavne sastavnice stanine membrane su polinezasiene masne kiseline koje su posebno osjetljive na peroksidaciju. Njihova sinteza *de novo* zahtijevala bi mnogo energije pa je obnovavanje membranskih lipida pomoću antioksidacijskog sustava najbolji način obnovavanja funkcionalnih membrana. Hidroksilni radikal i singletni kisik nastali u stresnim uvjetima reagiraju s metilenskom skupinom polinezasiene masne kiseline uz izdvajanje vodika s metilne skupine te nastaje peroksilni radikal. Taj je radikal vrlo reaktivan i reagira s drugom polinezasienom masnom kiselinom. Tada nastaju lipidni hidroksiperoksid i lipidni radikal koji nastavlja lančanu reakciju. Lančana reakcija završava kada reagiraju dva radikala stvarajući i produkte koji nisu radikali. Slobodni radikali kisika mogu formirati i konjugirane diene masnih kiselina kidajući i dvostruke veze u njima. Željezo ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redoks sustav) je najvažniji prooksidant koji rastavlja vodikove i lipidne perokside na reaktivne slobodne radikale putem Fentonove reakcije.



Lipidna peroksidacija može se zaustaviti neenzimskim i enzimskim sustavima. Tokoferol (vitamin E) važan je antioksidans koji zaustavlja lipidnu peroksidaciju popravljajući i radikale masnih kiselina tako da donira vodikov kation radikalulipida, a kako time postaje i sam radikal za oporavak mu treba askorbinska kiselina (vitamin C) ili glutation. Tokoferol funkcionira u lipidnoj

fazi membrane, a askorbat u hidrofилnoj fazi i njihovo je djelovanje sinergetsko (Blokhina i sur., 2003).

1.6. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

Antioksidansi su skupina različitih prirodnih spojeva koji u organizmima igraju važnu ulogu zaštite od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Kapacitet i djelovanje antioksidacijskog obrambenog sustava važni su u ograničavanju oksidacijske štete i uništavanju reaktivnih vrsta kisika koji se proizvode u većoj količini od one koja je potrebna za ravnotežu staninog metabolizma. Biljni i drugi organizmi su razvili širok spektar mehanizama za antioksidaciju, te su brojne biljne vrste izvrsni izvori prirodnih antioksidansa. Antioksidacijski obrambeni sustav biljke obuhvaća različite antioksidacijske molekule i enzime.

Čimbenici koji utječu na antioksidacijski sustav uključuju: intenzivno stvaranje tvari s aktivnim kisikom i slobodnim radikalima, smanjenje antioksidacijskog sustava zbog smanjenog unosa ili endogenog stvaranja antioksidanasa ili zbog njihovog intenzivnog trošenja (Perl-Treves i Perl, 2002).

Štetni kisikovi spojevi se razgrađuju enzimskim i neenzimskim mehanizmima (Breusegem i sur., 2002). Enzimski mehanizmi uključuju glavne antioksidacijske enzime – katalazu, peroksidaze i superoksid dismutazu (Blokhina i sur., 2003) te enzime koji sudjeluju u obnavljanju aktivnih oblika antioksidanasa – glutation reduktaza, monodehidro- i dehidroaskorbat reduktaza (ciklus Halliwell-Asada). Također postoje i enzimi za otklanjanje štetnih produkata lipidne peroksidacije (Blokhina i sur., 2003). Neenzimski mehanizmi uključuju antioksidanse male molekularne mase kao što su glutation, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E), karotenoide, antocijane i neke druge fenolne spojeve.

1.6.1. ENZIMSKI MEHANIZMI

1.6.1.1. PEROKSIDAZE

Peroksidaze (vodik peroksid oksidoreduktaze) su široko rasprostranjeni enzimi na eni u biljnom i životinjskom svijetu. Biljne peroksidaze su monomerni glikoproteini molekularnih masa od 35 do 45 kDa koji kao prosteti ku skupinu imaju protohematin IX koji je pomo u dviju molekula histidina povezan s glikoproteinskim dijelom enzima. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju razli itih stani nih sastojaka (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koriste i vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao supstrat.

S obzirom na fiziološku ulogu i supstratnu specifi nost peroksidaze su podijeljene u dvije grupe (Asada, 1992):

- Prva skupina peroksidaza su nespecifi ne peroksidaze (POX), koje koriste H_2O_2 za razli ite oksidacijske reakcije i imaju slabu supstratnu specifi nost. Zbog slabe supstratne specifi nosti kao donori elektrona mogu poslužiti fenolne molekule kao gvajakol i pirogalol. Uklju ene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zaraštavanje rana te obranu od patogena zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava (Laloue i sur., 1997).
- Drugoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APX) i glutation peroksidaza (GR). Glavna funkcija im je uklanjanje viška H_2O_2 , organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala koji oksidiraju sve stani ne sastojke i uzrokuju ošte enja stanica. Za redukciju vodikovog peroksida potreban je reduciraju i supstrat, a to je u biljaka uglavnom askorbat.

Askorbat peroksidaza najvažnija je za detoksikaciju H_2O_2 u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta. Da bi se reducirala jedna molekula H_2O_2 potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata.

1.6.1.2. GLUTATION REDUKTAZA

Glutation reduktaza je enzim koji osigurava redukciju oksidiranog glutationa. Donor elektrona u tom redoks sustavu je NADPH. Kao izvor NADPH u stanici služi mitohondrijski NADH koji prenosi elektrone na NADP⁺ pomoću NADP⁺ specifičnih dehidrogenaza, te pentoza-fosfatni put koji na taj način povezuje bazalni metabolizam stanice sa zaštitom stanice od djelovanja slobodnih radikala (Arora i sur., 2002). Glutation služi za regeneraciju askorbinske kiseline pomoću enzima dehidroaskorbat reduktaze pri čemu se glutations oksidira do glutationdisulfida. Glutation reduktaza je flavoprotein najčešće prisutan u kloroplastima, ali se može naći i u mitohondrijima i citosolu (Inzé i Van Montagu, 2002).

1.6.2. NEENZIMSKI MEHANIZMI

1.6.2.1. KAROTENOIDI

Karotenoidi su tetraterpenoidi organskih pigmenata (opće formule C₄₀H₅₀) koji se prirodno pojavljuju u kloroplastima i kromoplastima biljaka te i u nekih drugih organizama kao što su fotosintetske alge i neke vrste gljivica. Po fizičkim svojstvima su lipidi pa su time molekule topive u mastima i organskim otapalima. Imaju karakterističnu žutonaranu boju, a najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm (plavi spektar), proširuju i tako spektar boja koje mogu pokretati fotosintezu (Pevalek-Kozlina, 2003). Njihova se zaštitna uloga temelji na nekoliko antioksidacijskih svojstava (Burton i Ingold, 1984):

- sudjeluju u završetku lananih reakcija lipidne peroksidacije pojava u kojima time u slučaju nedostatka tokoferola u vezanju peroksidnih radikala
- vežu na sebe energiju sa singletnog kisika i otpuštaju je u obliku topline apsorbiraju višak pobudne energije s molekule klorofila sprečavaju i tako stvaranje singletnog kisika
- otpuštaju višak pobudne energije kroz ksantofilni ciklus koji uključuje reverzibilnu pretvorbu violaksantina u zeaksantin

1.7. FLUORESCENCIJA KLOROFILA

Najaktivnije fotosintetsko tkivo u viših biljaka je mezofil lista. Stanice mezofila imaju veliki broj kloroplasta (30 do više od 100). Kloroplasti imaju 3 različite membrane – vanjsku, unutrašnju i tilakoidnu. Tilakoidne membrane sadrže molekule klorofila i ostale komponente nužne za pretvorbu energije. Klorofil najbolje apsorbira plavi i crveni dio spektra, a reflektira samo crvenu svjetlost (veće valne duljine). Apsorpcijom crvene svjetlosti molekula klorofila dolazi u prvo pobudeno stanje koja je energijom najsiromašnije, ali je za fotosintezu najvažnije područje jer se pri prelasku elektrona iz prvog pobudjenog stanja u osnovno stanje oslobođena energija koristi za kemijski rad. Apsorpcijom plave svjetlosti, molekula klorofila prelazi u tzv. drugo singletno stanje.

Pri djelovanju intenzivnog izvora svjetlosti na molekule klorofila, u optimalnim okolišnim uvjetima se najveći dio apsorbirane energije (oko 95%) koristi za fotokemijske reakcije fotosinteze. Međutim, dio energije se gubi te molekule klorofila nakon apsorpcije fotona emitiraju i toplinu i svjetlost. Apsorpcija svjetlosti odvija se prema Stark - Einsteinovom zakonu pri čemu jedna molekula klorofila može apsorbirati samo jedan foton svjetlosti. Elektron se podiže u stanje s više energije, a pri povratku u osnovno stanje otpušta se foton. Ta se pojava naziva fluorescencijom. Zbog gubitka energije reflektirani kvant svjetlosti ima veću valnu duljinu nego apsorbirani kvant. Spektar fluorescencije je za pojedine tvari karakterističan pa se na temelju fluorescencije može dokazati prisutnost i malih količina takvih tvari (Pevalek-Kozlina, 2003).

Troska koja se koristi u ovom istraživanju je nusproizvod pri proizvodnji elika u elektrole. Sadržaj pojedinih mikroelemenata npr. Fe, Ca, Mg, Mn i Na u tako dobivenoj troski je visok, a sadržaj toksi nih teških metala vrlo nizak. Pretpostavka je da bi se usitnjena troska mogla koristiti kao potencijalni izvor mineralnih tvari za rast i razvoj biljaka ili kao poboljšiva tla.

Ovo je istraživanje raeno na kukuruzu koji je vrlo važna poljoprivredna kultura jer osim što se koristi u prehrambenoj industriji i za prehranu stoke, koristi se i za proizvodnju biogoriva.

Stoga je cilj ovog istraživanja bio:

- procijeniti uinkovitost troske kao poboljšiva tla i/ili izvora odre enih hranjivih elemenata na rast i razvoj kukuruza
- utvrditi, putem pokazatelja oksidacijskog stresa, da li troska ima štetno djelovanje na rast i razvoj biljaka (kao posljedica primanja pove anih koli ina Fe)

3.1. MATERIJAL

3.1.1. KUKURUZ (*Zea mays* L.)

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice Poaceae (trave), porijeklom iz Srednje Amerike, a nakon otkrića američkog kontinenta prenesen je i proširen u Europu i druge kontinente. Korijen mu je žilast, a stablo visoko i lankovito s odvojenim muškim i ženskim cvjetovima. Plod mu je klip sa zrnjem koje je uglavnom žuto ili bijelo. Kukuruz obiluje prehranbenim vlaknima koja snižavaju povišeni kolesterol, folnom kiselinom što čuva krvožilni sistem, vitaminom B1 važnim za dobar rad mozga te ugljikohidratima koji nam daju brzo raspoloživu energiju. Agrotehnička važnost kukuruza vrlo je velika jer se sije na vrlo velikim površinama pa na većim površinama dolazi kao predkultura drugim kulturama. Kukuruz se uzgaja u cijelom svijetu, a područja uzgoja vrlo mu je velika što mu omogućuje različita duljina vegetacije i raznolika mogućnost upotrebe. Upotrebljava se za ishranu ljudi i domaćih životinja i za industrijsku proizvodnju (bioetanol, bioplin). Kukuruz najbolje uspijeva na dubokim, plodnim i strukturnim tlima, slabo kisele ili neutralne reakcije, dobrog toplinskog, vodnog i zračnog režima.



Slika 1. Kukuruz (*Zea mays* L.) uzgojen na polju

3.2. METODE

3.2.1. SASTAV SUPSTRATA ZA SA ENJE I UZGOJ BILJAKA

Za sa enje biljaka pripremila sam dva supstrata - mješavina zemlje i pijeska u omjeru 1:1 (supstrat 1:1 ili „bogatiji“ supstrat) i mješavina zemlje i pijeska u omjeru 1:2 (supstrat 1:2 ili „siromašniji“ supstrat). Zemlja i pijesak upotrijebljeni u ovom pokusu potječu iz Botaničkog vrta u Zagrebu. Takvi supstrati su predstavljali kontrolne podloge (K). Na temelju literaturnih podataka (Wang i Cai, 2006), odabrala sam dvije različite količine fino mljevene troske (veličina zrna: 2 mm) - 10 i 20 g/kg supstrata - koje sam dodala u pripremljene supstrate i dobro promiješala (Tablica 3). Nakon toga sam sjemenke kukuruza posadila u posudice napunjene određenom smjesom i zalila destiliranom vodom. Kad su mlade biljke razvile prve prave listove (nakon dva tjedna), dijelu kontrolnih biljaka i biljaka isključanih u prisutnosti troske dodan je izvor dušika u obliku NH_4NO_3 (50 mg N/kg supstrata). Dijelu kontrolnih biljaka dodan je izvor dušika (7 ml/L) u obliku tekućeg gnojiva NPK (Substral, N:P:K=4:5:6) te izvor Fe (3 ml/L) u tekućem obliku (Floragard, 2% FE vodotopivo, 1% Fe vodotopivo u helatnom obliku, 1% vodotopivo iz FeSO_4). Te su biljke nadalje u pokusu služile kao pozitivna kontrola. Biljke su rasle u stakleniku u Botaničkom vrtu u uvjetima dugog dana (biljke su zasađene 01.03.2010.) pri čemu je prosječna dnevna temperatura iznosila prosječno $25 \pm 2^\circ\text{C}$, a noćna $14 \pm 2^\circ\text{C}$. Biljke su tijekom pokusa bile izložene količini svjetlosti od prosječno $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Biljke su uzimane za pokus tj. za različita mjerenja nakon šest tjedana rasta.

Tablica 3. Različiti tretmani dobiveni miješanjem temeljnih supstrata 1:1 (zemlja i pijesak u omjeru 1:1, K) i supstrata 1:2 (zemlja i pijesak u omjeru 1:2, K) s troskom u količinama od 10 (T1) ili 20 (T2) g/kg supstrata ili NPK i tekućeg Fe (pozitivna kontrola).

K	supstrat 1:1 + 0 g troske/kg	supstrat 1:2 + 0 g troske/kg
T1	supstrat 1:1 + 10 g troske/kg	supstrat 1:2 + 10 g troske/kg
T2	supstrat 1:1 + 20 g troske/kg	supstrat 1:2 + 20 g troske/kg
NPK+Fe	supstrat 1:1 + NPK/Fe	supstrat 1:2 + NPK/Fe

3.2.2. PARAMETRI RASTA

Kako bih procijenila rast, mjerila sam visinu biljaka (cm), ukupan broj listova te dužinu i širinu 2. i 3. lista (cm). Tako er sam (nakon mjerenja u inkovitosti fotosinteze mjerenjem fluorescencije klorofila *a*) odredila prinos mase suhe tvari biljaka (g). Listove mase 1 g posušila sam na 80°C do konstantne mase (24h) te suhu lisnu masu izvagala.

3.2.3. ODRE IVANJE SADRŽAJA METALA, DUŠIKA I FOSFORA U SUPSTRATU I LISTOVIMA

Sadržaj pojedinih metala u supstratu i listovima biljaka odre en je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom. Plamena (FAAS) i grafitna (GFAAS) tehnika temelje se na postizanju temperatura dovoljno visokih da kemijske spojeve razore do atoma koji zatim isparavaju, a mjerenje se vrši u nastalom "oblaku" atoma. Obje su tehnike visoko specifi ne jer se spektralne linije atoma nikada ne preklapaju, a suvremeni monokromatori mogu lako razdvojiti ak i vrlo bliske spektralne linije.

Sadržaj ukupnog dušika i fosfora u supstratu i listovima odre en je spektrofotometrijski.

3.2.3.1. PRIPREMA UZORAKA ZA ODRE IVANJE SADRŽAJA METALA U SUPSTRATU

Uzorci posušeni do konstantne mase (80 °C, 48h) su razarani u smjesi koncentrirane nitratne i koncentrirane kloridne kiseline (omjer 1:3) u mikrovalnom ure aju za pripremu uzoraka (Anton Paar Multiwave 3000) na 200 °C te potom razrije eni do odre enog volumena. Sadržaj kadmija i olova odre en je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom na grafitnoj kiveti a sadržaj natrija, bakra i željeza odre en je plamenom atomskom apsorpcijskom spektrometrijom.

3.2.3.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA OLOVA, KADMIJA I BAKRA U SUPSTRATU

Olovo: Određivanje se vrši metodom GFAAS na instrumentu Perkin Elmer Analyst 800 (Zeemanova korekcija 0,9 T) opremljenim auto samplerom Perkin ElmerAS 800.

Instrumentalni uvjeti:

volumen uzorka: 20 μ l

matriks modifikator: Pd(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂ (5 μ g Pd + 3 μ g Mg(NO₃)₂)

lampa: EDL valna duljina 283,3 nm

slit: 0,7 nm

kiveta: transverzalno grijana L'vovom platformom od piroliti kog grafita

protok argona: 250 ml/min

temperaturni program: sušenje, 110 °C i 130 °C; piroliza 850 °C, atomizacija 1 600 °C; ispušanje 2 450 °C

kalibracijski standardi: 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml i 50 ng/ml

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

Kadmij: Određivanje se vrši metodom GFAAS na instrumentu Perkin Elmer Analyst 800 (Zeemanova korekcija 0,9 T) opremljenim auto samplerom Perkin ElmerAS 800.

Instrumentalni uvjeti:

volumen uzorka: 20 μ l

matriks modifikator: Pd(NO₃)₂, Mg(NO₃)₂ (5 μ g Pd + 3 μ g Mg(NO₃)₂)

lampa: EDL valna duljina 228,8 nm

slit: 0,7 nm

kiveta: transverzalno grijana L'vovom platformom od piroliti kog grafita

protok argona: 250 ml/min

temperaturni program: sušenje, 110 °C i 130 °C; piroliza 600 °C, atomizacija 1 500 °C; ispušanje 2 450 °C

kalibracijski standardi: 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml i 2,5 ng/ml

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

Bakar: Određivanje se vrši metodom AAS na instrumentu Perkin Elmer Analyst 800 uz korekciju deuterijevom lampom.

Instrumentalni uvjeti:

lampa: HCL valna duljina 324,8 nm

slit: 0,7 nm

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

kalibracijski standardi: 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 2,5 µg/ml

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

Željezo i natrij: Instrumentalni uvjeti za određivanje sadržaja željeza i natrija opisani su u podpoglavlju 3.2.3.4.

3.2.3.3. PRIPREMA UZORAKA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA METALA U LISTOVIMA

Nakon vaganja, posušene listove sam samljela, razorila u koncentriranoj nitratnoj kiselini u mikrovalnom uređaju za pripremu uzoraka (Anton Paar Multiwave 3000) na 230 °C te potom razrijedila do određene volumena.

Sadržaj natrijevih iona određuje se plamenom atomskom emisijskom spektrometrijom, a sadržaj ostalih iona atomskom apsorpcijskom spektrometrijom na grafitnoj kivetici. Sadržaj svih kationa izražen je u mg/kg suhe tvari. Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost tri replike ± standardna devijacija te sam ih izrazila u odnosu na kontrolu.

3.2.3.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA NATRIJA, MAGNEZIJA, MANGANA I ŽELJEZA U LISTOVIMA

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

Instrumentalni uvjeti:

lampa: HCL valna duljina 279,5 nm

slit: 0,2 nm

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

kalibracijski standardi: 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml i 2,5 µg/ml

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

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

Instrumentalni uvjeti:

lampa: HCL valna duljina 248,3 nm

slit: 0,2 nm

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

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

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

Natrij: Određivanje se vrši metodom AES na instrumentu Perkin Elmer AAnalyst 800

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 589 nm

slit: 0,2 nm

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

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

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

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

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina emisijske linije: 285,2 nm

slit: 0,2 nm

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

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

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

3.2.3.5. PRIPREMA UZORAKA ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA DUŠIKA I FOSFORA U SUPSTRATU I LISTOVIMA

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

peroksida te su potom razrije eni do odre enog volumena. Sadržaj dušika i fosfora odre uje se spektrofotometrijski. Sadržaj dušika i fosfora izražen je u mg/kg suhe tvari.

3.2.3.6. ODRE IVANJE SADRŽAJA DUŠIKA I FOSFORA

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

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina: 655 nm

Reagensi:

Salicilat-citratna otopina i Na-dikloroisocijanurat

Mjerenje apsorbancije nakon 2 sata od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml i 1 µg/ml

Fosfor: Odre ivanje se vrši metodom sa kiselim molibdatom na UV/Vis spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25.

Instrumentalni uvjeti:

valna duljina: 880 nm

Reagensi:

Askorbinska kiselina i kiseli molibdat

Mjerenje apsorbancije nakon 15 minuta od dodatka reagensa.

Kalibracijski standardi: 0,01 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml i 1 µg/ml

3.2.4. MJERENJE U INKOVITOSTI FOTOSINTEZE MJERENJEM FLUORESCENCIJE KLOROFILA *a*

Fluorescenciju klorofila *in situ* mjerila sam metodom saturacijskog pulsa pomo u „Qubit“ sustava za mjerenje fluorescencije. Metoda saturacijskog pulsa (Schreiber i sur., 1994) temelji se na primjeni dovoljno jakog (saturacijskog) svjetlosnog impulsa uslijed kojeg dolazi do potpune redukcije vezanog plastokinona (Q_A). Na taj na in je fotokemijsko gašenje (engl. "quenching") fluorescencije zaustavljeno, a preostalo gašenje je

nefotokemijsko tj. toplina. Kada su svi plastokinoni potpuno oksidirani, reakcijski centri su potpuno otvoreni, pa elektroni sudjeluju u fotokemijskim reakcijama. Ovo se događa u uvjetima slabog osvjetljenja i tada se mjeri minimalni prinos fluorescencije (F_0). Maksimalni prinos fluorescencije (F_m) mjeri se u uvjetima jakog osvjetljenja kada su plastokinoni potpuno reducirani i reakcijski centri zatvoreni. Razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije naziva se varijabilnom fluorescencijom (F_v). Iz tih podataka se računa optimalni prinos fotosustava II, F_v/F_m . Ovaj omjer predstavlja mjeru potencijalnog maksimalnog prinosa kvanta fotosustava II, a za većinu biljnih vrsta ima vrijednost oko 0,83. Uslijed osvjetljenja, a primjenom impulsa saturacijske svjetlosti mijenja se vrijednost maksimalne fluorescencije (F'_m). Razlika $F_m - F'_m$ predstavlja nefotokemijsko, a razlika $F'_m - F$ fotokemijsko gašenje fluorescencije. F je prinos fluorescencije uzorka prilagođen određenoj količini svjetlosti. Iz ovih podataka računa se efektivni prinos fotosustava II (F/F'_m), te se može izračunati vrijednost rel. ETR ("Relative Electron Transport Rate") koja opisuje funkcioniranje transportnog lanca elektrona i vrijednost NPQ koja opisuje nefotokemijsko gašenje fluorescencije:

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

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

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

PPFD predstavlja gustoću fotosintetski aktivnog toka fotona ("Photosynthetically active Photon Flux Density"), a faktor 0,5 uzima se zbog pretpostavke o jednakoj eksitaciji fotosustava II i I.

Prije samog mjerenja, biljke sam držala 30 minuta u potpunoj tami. List prilagođen uvjetima tame koristila sam za mjerenje vrijednosti F_0 i F_m . Nakon toga sam list osvjetlila određenom svjetlosti od $100 \mu\text{mol}_{\text{FOTONA}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tijekom 30 minuta, odnosno dok se vrijednosti F i F'_m nisu ustalile. Prethodna mjerenja za svaku količinu aplicirane svjetlosti uzela sam kao relevantno za izračun vrijednosti F/F'_m , PQ, NPQ i relativne brzine prijenosa elektrona.

3.2.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PIGMENATA

Sadržaj pigmenata određila sam spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotometar Specord (Analytik Jena, Germany). Uzorke svježih listova mase 30 mg ekstrahirala sam u 1,5 ml 80%-tnog hladnog acetona na ledu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 5 000 g, svakom sam uzorku izmjerila volumen dobivenog supernatanta i zatim ga kvantitativno prenijela u kivetu. Mjeren je cijeli spektar apsorbancije za svaki uzorak te su zatim određeni podaci na tri valne duljine: 663, 646 i 470 nm (Arnon, 1949). Sadržaj fotosintetskih pigmenata određen je prema sljedećim izrazima (Lichtenthaler, 1987):

a) za klorofil *a*:

c_a = sadržaj klorofila *a* (mg / g svježe tvari)

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

b) za klorofil *b*:

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

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

c) za ukupne karotenoide:

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

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

A_x = apsorbancija uzoraka pri određenim valnim duljinama

V = volumen uzorka (ml)

l = duljina optičkog puta = 1 cm

m = masa uzorka = 30 mg

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

3.2.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA

Kako bih odredila sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 200 μ l uzorka (opisano u poglavlju 3.2.7.1.) s 1300 μ l reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina otopljena u 10%-tnoj trikloroetanoj kiselini). Kao slijepu probu koristila sam 1,5 ml reakcijske smjese. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene semimikroeprovete, te ih zagrijavala u sušioniku 30 min na 95 °C. Nakon toga sam ih naglo ohladila na ledu te centrifugirala 10 min na 10 000 g. Nakon toga slijedilo je određivanje apsorbancije na 532 nm te na 600 nm zbog korekcije na nespecifičnu apsorpciju (Heath i Packer, 1968). Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbcija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol/g sv. t uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna devijacija.

3.2.7. EKSTRAKCIJA TOPIVIH PROTEINA I AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

3.2.7.1. EKSTRAKCIJA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA TOPIVIH PROTEINA

Listove kukuruza (250 mg) prelila sam s tekućim dušikom i homogenizirala u 1 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) pH vrijednosti 7,0 koji je sadržavao 0,1 mM EDTA uz dodatak netopivog PVPP-a. Homogenat sam centrifugirala 30 minuta u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi +4 °C i 25000 g.

Dio dobivenog supernatanta koristila sam kao sirovi ekstrakt u kojem sam odredila koncentraciju proteina metodom Bradforda (1976), a drugi dio za određivanje aktivnosti enzima.

Bradfordova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljini 595 nm. U 1 ml radne otopine Bradford - 15 ml etanola, 30 ml 88%-tne H_3PO_4 , 30 ml Bradford mati ne otopine (100 ml 96%-tnog etanola, 200 ml 88%-tne H_3PO_4 i 350 mg Coomassie brilliant blue G 250) i 450 ml H_2O – dodala sam 50 μ l uzorka sirovog ekstrakta. Koncentraciju proteina u pojedinim uzorcima odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog albumina iz goveda poznatih koncentracija (od 0,096 mg/ml do 0,8 mg/ml). Koncentraciju proteina izrazila sam kao mg proteina po ml otopine i po gramu svježe mase biljnog tkiva.

3.2.7.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ASKORBAT PEROKSIDAZE

Za određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) koristila sam ekstrakt u kojem sam odredila i aktivnost katalaze. Kao reakcijsku otopinu za askorbat peroksidazu koristila sam otopinu po Nakanu i Asadi (1981) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7), 0,2 mM askorbinske kiseline, 0,2 mol/l EDTA i 1,2 mM H_2O_2 . Vodikov peroksid (20 μ l) dodala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 960 μ l ove otopine dodala sam 40 μ l sirovog ekstrakta i mjerila pad apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm. Aktivnost APX je izražavana kao količina potrošenog askorbata u μ molu po minuti po gramu svježe tvari i po miligramu proteina uz odgovarajuće i ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{290} = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$1) \text{ APX} = \frac{A_{sv} \times t \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times l} \quad [\mu\text{mol}/\text{min ml}]$$

$$\text{APX} = \frac{A_{\mu\text{mol min ml}}}{m(\text{g})} \quad [\mu\text{mol}/\text{min g}_{\text{svt}}]$$

$$= 290 \text{ nm}$$

A_{sv} = srednja vrijednost promjene apsorbancije u 1 s

$t =$ faktor s kojim se množi A_{sv} da bi se rezultat izrazio u minuti (60 za APX)

$$\epsilon_{290} = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

2) specifi na aktivnost askorbat peroksidaze

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

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

3.2.7.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI NESPECIFIČNIH PEROKSIDAZA

Kao reakcijsku otopinu za nespecifične ili tzv. „gvajakol“ peroksidaze (POX) koristila sam otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0, 18 mM gvajakola i 5 mM H_2O_2 . Vodikov peroksid dodala sam u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 990 μl ove otopine dodala sam 10 μl sirovog ekstrakta mjerila povećanja apsorbancije uslijed stvaranja tetragvajakola svakih 15 sekundi tijekom 2,5 minute pri valnoj duljini od 470 nm.

Aktivnost POX je izražena kao količina nastalih produkata u μmolima po minuti po gramu svježeg tvari i po miligramu proteina koristeći $\epsilon_{470} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ za gvajakol. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.7.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION REDUKTAZE

Za mjerenje aktivnosti glutation reduktaze (GR) koristila sam reakcijsku otopinu koja je sadržavala 50 μl 20mM GSSG (oksidirani glutation), 850 μl 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) s 0,1 mM EDTA, 50 μl uzorka i 50 μl 20 mM NADPH kojeg sam dodala neposredno prije mjerenja (Foyer i sur., 1995).

Apsorbanciju sam mjerila na 340 nm svakih 15 sekundi tijekom 2,5 min. Aktivnost glutation reduktaze izražena je kao količina potrošenog NADPH (koji se oksidira u NADP⁺ i donira elektrone za nastanak GSH tj. reduciranog glutationa) u μmolu po minuti po gramu svježeg tvari i po miligramu proteina uz odgovarajuće ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika \pm standardna devijacija i izraženi u odnosu na kontrolu.

3.2.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svaki broj i podatak prikazan grafikonom ili tablicom aritmetička je sredina određenog broja replika dobivenih iz dva nezavisna pokusa.

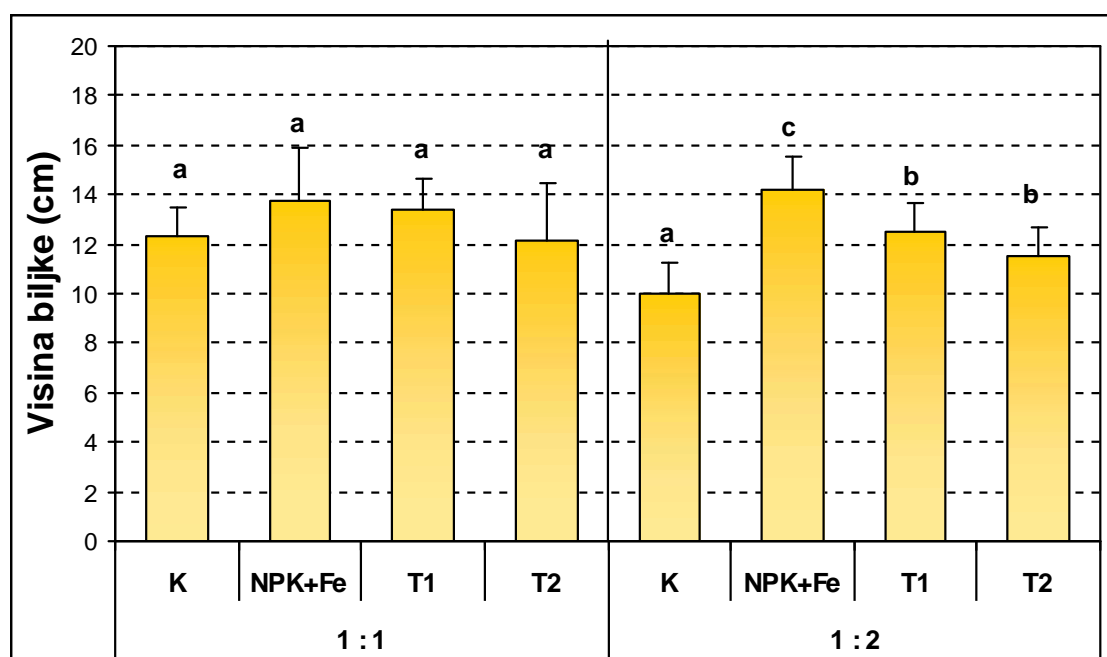
Usporedba kontrole i tretmana (pojedinačno i međusobno) provedena je testom "Duncan's New Multiple Range Test" za svaki pojedini dan (Duncan, 1955). Statistički značajnim smatrala sam rezultate koji su se razlikovali na razini $p \leq 0,05$. Koristila sam računala program STATISTICA 7.0 (Stat Soft Inc., SAD).

4.1. POKAZATELJI RASTA KUKURUZA

Parametri rasta koje sam pratila u ovom istraživanju su: visina biljaka te broj, širina, dužina i suha masa listova.

4.1.1. VISINA BILJAKA

Troska dodana u mješavinu zemlje i pijeska u omjeru 1:1 (supstrat 1:1) nije uzrokovala statistički značajnu razliku u visini biljaka u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgojene s dodatkom NPK i Fe (NPK+Fe). Visina biljaka uzgojenih na mješavini zemlje i pijeska u omjeru 1:2 (supstrat 1:2) uz dodatak troske (10 ili 20g troske/kg supstrata) bila je znatno povećana u odnosu na kontrolu. Najviše biljke na supstratu 1:2 zabilježene su uz dodatak umjetnog gnojiva NPK i tekućeg željeza (slika 2).

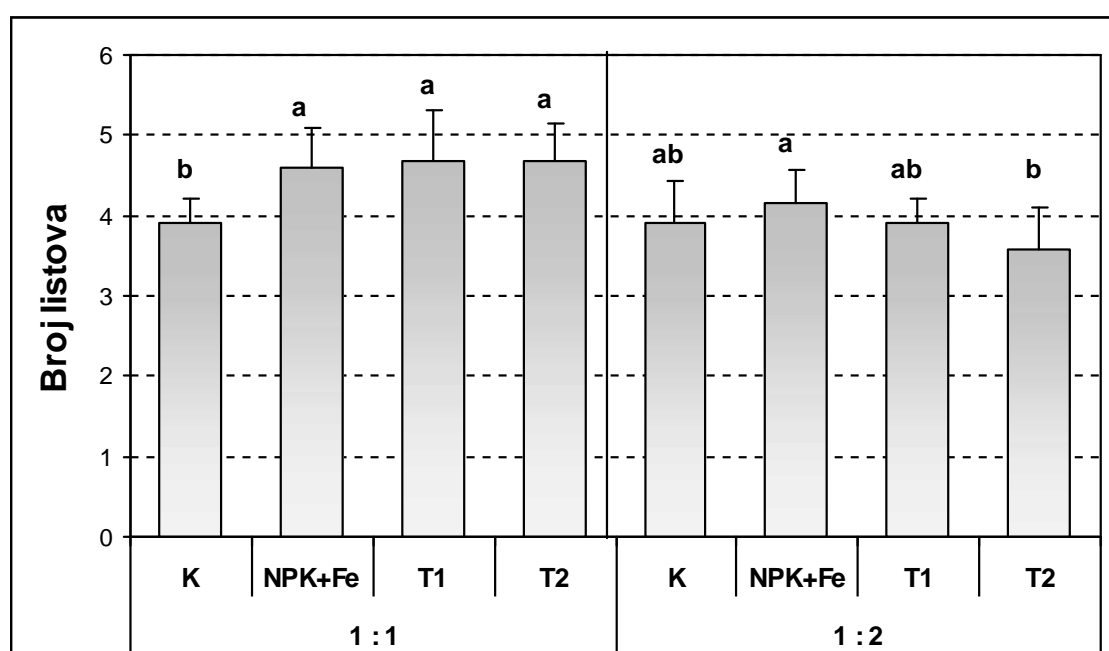


Slika 2. Visina biljaka (cm) kukuruza uzgajanih 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.1.2. BROJ LISTOVA

Broj listova kukuruza uzgajanih na mješavini zemlje i pijeska u omjeru 1:1 bio je bitno veći kod biljaka pozitivne kontrole i biljaka s dodatkom troske (10 i 20 g) nego kod kontrolnih biljaka (slika 3).

Na mješavini zemlje i pijeska u omjeru 1:2 broj listova nije se znatno razlikovao između tretmana. Jedina statistički značajna razlika u broju listova zabilježena je između pozitivne kontrole (NPK+Fe) i biljaka uzgojenih uz dodatak 20 g troske.

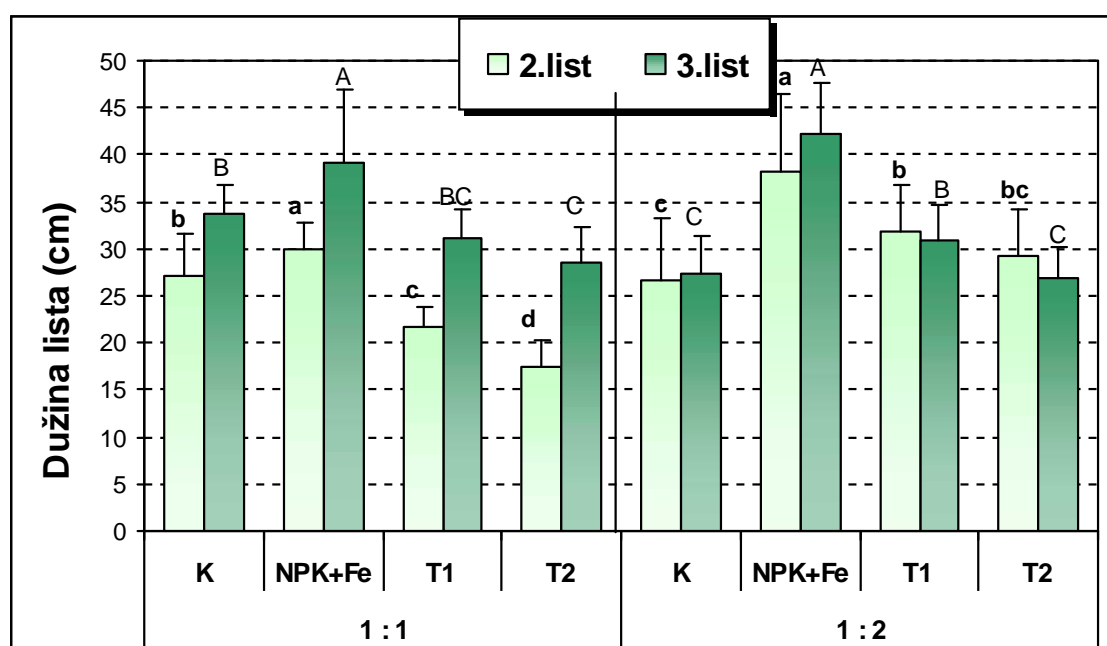


Slika 3. Broj listova kukuruza uzgajanih 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuche gnojivo NPK i tekuche Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.1.3. DUŽINA LISTOVA

Troska (10 g i 20 g) dodana u supstrat 1:1 je značajno smanjila dužinu 2. lista, posebice u količini od 20 g u odnosu na biljke kontrole. Najduži listovi izmjereni su na biljkama raslim uz dodatak NPK+Fe. Na supstratu 1:2 također su najduži listovi zabilježeni na biljkama pozitivne kontrole. Listovi biljaka raslih uz dodatak 10 g troske bili su bitno duži od kontrole, dok troska u količini od 20 g nije značajno utjecala na dužinu 2. lista (slika 4).

Dužina 3. lista na oba supstrata (1:1 i 1:2) bila je najveća na pozitivnoj kontroli tj. u biljkama uzgojenim s dodatkom NPK+Fe. Troska u koncentraciji od 20 g/kg supstrata 1:1 uzrokovala je statistički značajno smanjenje dužine listova u usporedbi s kontrolom. Listovi biljaka uzgojenih na supstratu 1:2 s dodatkom 10 g troske bili su značajno duži od listova kontrole dok je dužina 3. lista biljaka raslih uz 20 g troske bila slična kontrolnim vrijednostima (slika 4).

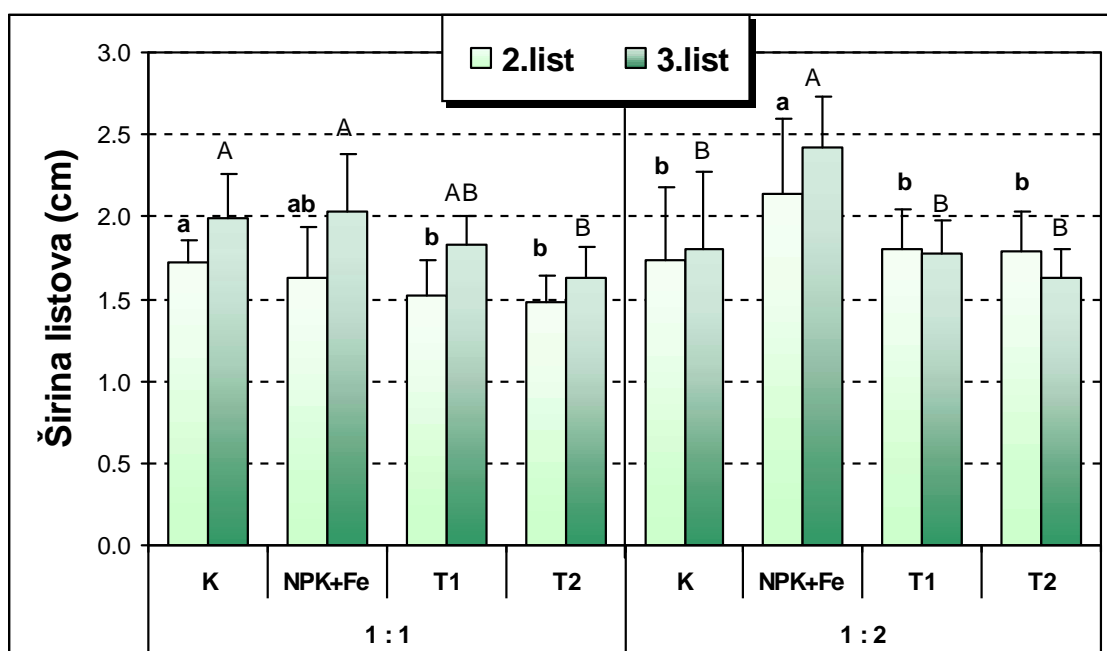


Slika 4. Dužina listova kukuruza uzgajanih 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.1.4. ŠIRINA LISTOVA

Na supstratu 1:1 sa dodatkom troske (10 i 20 g) zamije ena je statisti ki zna ajno manja širina 2.lista u usporedbi s kontrolom (slika 5). Širina 3. lista na supstratu 1:1 s dodatkom ve e koli ine troske (20 g) bila je statisti ki zna ajno smanjena u odnosu na kontrolu.

Listovi biljaka uzgojenih na supstratu 1:2 s dodatkom umjetnog gnojiva NPK i teku eg Fe bili su znatno širi u usporedbi s kontrolnim listovima. Na tom siromašnijem supstratu, širina 2. i 3. lista bila je sli na u kontrolnim biljkama i biljkama uzgojenim uz dodatak troske (10 i 20 g).

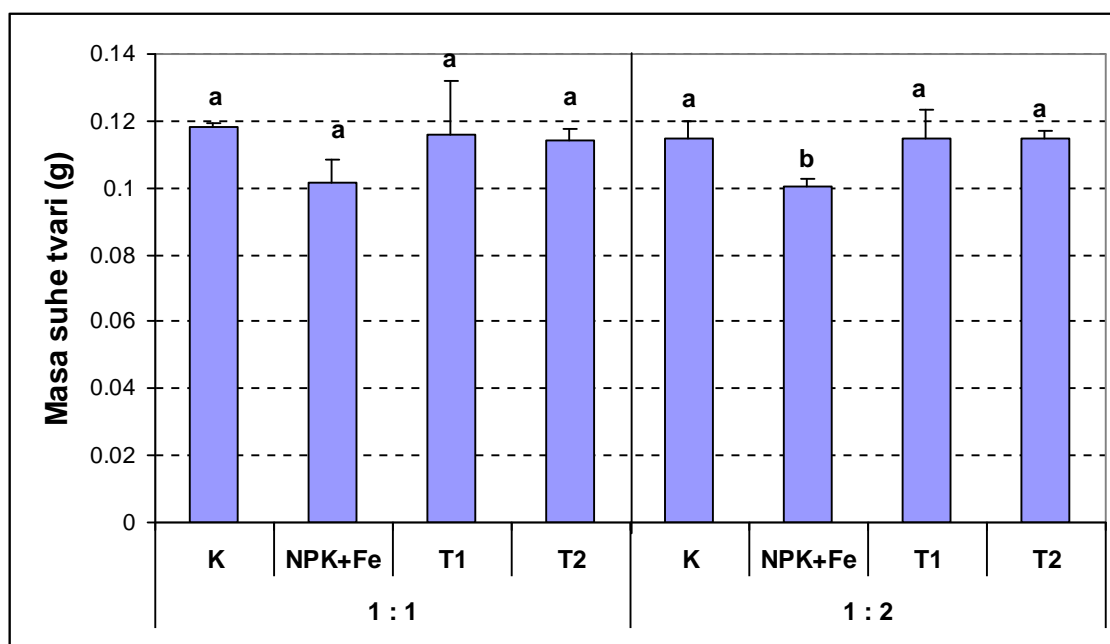


Slika 5. Širina listova kukuruza uzgajanih 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.1.5. SUHA MASA BILJKE

Suha masa biljaka raslih na supstratu 1:1 nije se bitno razlikovala me u razli itim tretmanima (slika 6).

U izdancima biljaka kukuruza zasa enih na supstratu 1:2 uz dodatak NPK i teku eg Fe zabilježeno je statisti ki zna ajno smanjenje suhe tvari (12%) u odnosu na kontrolu. Suha masa izdanaka biljaka raslih na kontrolnom supstratu 1:2 i biljaka raslih na istom supstratu s dodanom troskom (10 i 20 g) nije se bitno razlikovala (slika 6).



Slika 6. Masa suhe tvari izdanaka kukuruza uzgajanih 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.2. SADRŽAJ METALA, DUŠIKA I FOSFORA

4.2.1. SADRŽAJ POJEDINIH METALA, DUŠIKA I FOSFORA U SUPSTRATU

U Tablici 4. prikazan je sadržaj pojedinih metala – Cu, Pb, Cd, Na, Mg i Fe te sadržaj ukupnog dušika i fosfora u mješavini zemlje i pijeska tj. supstratu u kojem su biljke uzgajane tijekom šest tjedana. U usporedbi s kontrolnim supstratom, sadržaj Fe bio je povišen u supstratu 1:1, a posebice u supstratu 1:2 u kojima je bilo dodana ve a koli ina troske (20 g troske /kg supstrata, T2) te teku e gnojivo (NPK+Fe). Tako er je u supstratu 1:1 s dodatkom 20 g troske te posebice s dodatkom teku eg gnojiva (NPK+Fe) izmjerena i nešto ve a koli ina Pb i Cd u odnosu na kontrolu.

Sadržaj natrija bio je u svim supstratima ve i, dok je sadržaj magnezija u bogatijem supstratu s 10 i 20 g dodane troske te u siromašnijem supstratu s 10 g dodane troske bio dvostruko ve i u odnosu na kontrolne supstrate.

U bogatijem tlu s dodanom troskom zabilježen je i ve i sadržaj dušika u odnosu na kontrolni supstrat, no dodatak troske u supstrate nije utjecao na sadržaj fosfora. O ekivano, supstrati s dodatkom NPK+Fe su bili najbogatiji dušikom, no ne i fosforom ije su vrijednosti u tim supstratima bile sli ne kontrolnim.

Tablica 4. Sadržaj pojedinih metala te dušika i fosfora u bogatijem (supstrat 1:1) i siromašnijem supstratu (supstrat 1:2) s dodatkom troske u koli ini 10 (T1) ili 20 g (T2), teku eg gnojiva (NPK+Fe) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

mg/kg	supstrat 1:1				supstrat 1:2			
	K	NPK+Fe	T1	T2	K	NPK+Fe	T1	T2
Cu	13,0	15,1	6,3	14,0	13,3	11,2	9,4	17,0
Pb	27,7	99,3	19,2	43,9	30,3	27,0	23,5	36,9
Cd	0,165	0,333	0,210	0,309	0,219	0,097	0,094	0,265
Na	157,6	234,4	209,9	181,9	113,5	128,4	222,9	175,8
Fe	7221,0	8749,0	4072,0	8796,0	6656,0	7708,0	6017,0	10280,0
Mg	2023	2631	4780	4374	1868	1421	1964	2330
N	6510	13370	8454	11472	6975	13812	7667	6681
P	3031	2513	3014	3020	3367	3296	3162	3230

4.2.2. SADRŽAJ POJEDINIH METALA, DUŠIKA I FOSFORA U LISTOVIMA

Sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata određen je i u listovima kukuruza nakon šest tjedana uzgoja na supstratima 1:1 i 1:2 (Tablica 5).

Sadržaj mangana u listovima biljaka uzgajanih u supstratu 1:1 ili 1:2 s dodatkom troske bio je statistički značajno povećan u odnosu na vrijednosti tog metala izmjerene u kontrolnim biljkama. Dodatak veće količine troske (20 g/kg supstrata) u siromašnijem supstratu (1:2) izazvao je i značajno povećanje sadržaja magnezija, natrija i željeza a troska dodana u manjoj količini (10 g) uzrokovala je bitno povećanje sadržaja magnezija. Sadržaj željeza u listovima kukuruza uzgojenim u supstratu 1:1 s dodatkom troske (neovisno o količini) bio je znatno povećan. Manja količina troske dodana u supstrat 1:1 izazvala je bitno povećanje sadržaja magnezija, a veća količina troske bitno povećanje sadržaja natrija u listovima kukuruza.

Dodatkom NPK+Fe u supstrat (neovisno o omjeru zemlje i pijeska) zabilježen je statistički značajno povećan sadržaj željeza. Dodatak tekućeg gnojiva (NPK+Fe) u supstrat 1:1 uzrokovao je znatno povećanje sadržaja natrija u listovima biljaka, a u supstrat 1:2 znatno povećanje sadržaja magnezija u odnosu na vrijednosti tih metala u listovima kontrolnih biljaka. Sadržaj dušika u listovima kukuruza uzgajanim bilo u bogatijem ili siromašnijem supstratu s dodatkom NPK+Fe bio je znatno povećan u odnosu na kontrolne vrijednosti. U usporedbi s kontrolnim vrijednostima, ni dodatak troske niti tekućeg gnojiva nije značajno utjecao na sadržaj fosfora u biljkama.

Tablica 5. Sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata u listovima kukuruza uzgajanim 6 tjedana na bogatijem (supstrat 1:1) i siromašnijem supstratu (supstrat 1:2) s dodatkom troske u količini 10 (T1) ili 20 g (T2), tekućeg gnojiva (NPK+Fe, pozitivna kontrola) ili bez dodatka troske ili gnojiva (K, kontrola).

mg/kg	supstrat 1:1				supstrat 1:2			
	K	NPK+Fe	T1	T2	K	NPK+Fe	T1	T2
Mn	12,5 c	12,9 c	30,4 b	34,1 a	7,3 c	6,3 c	10,9 b	18,6 a
Mg	2,9 b	2,7 b	3,3 a	3,0 ab	2,5 b	3,5 a	3,5 a	4,0 a
Na	74,0 b	120,0 a	94,2 ab	114,4 a	98,5 b	105,2 b	107,9 b	131,3 a
Fe	50,6 b	61,0 a	65,7 a	60,9 a	65,4 b	84,0 a	69,1 b	81,6 a
N	18814 b	26631 a	20304 b	18463 b	14665 b	29914 a	17796 b	17917 b
P	3384,7	3763,7	3784,7	3566,7	4023,7	4758,3	4170,7	4052,0

Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu tri replike. Standardna devijacija iznosila je manje od 10%.

Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju (P < 0,05).

4.3. FUNKCIONALNOST FOTOSINTETSKOG APARATA

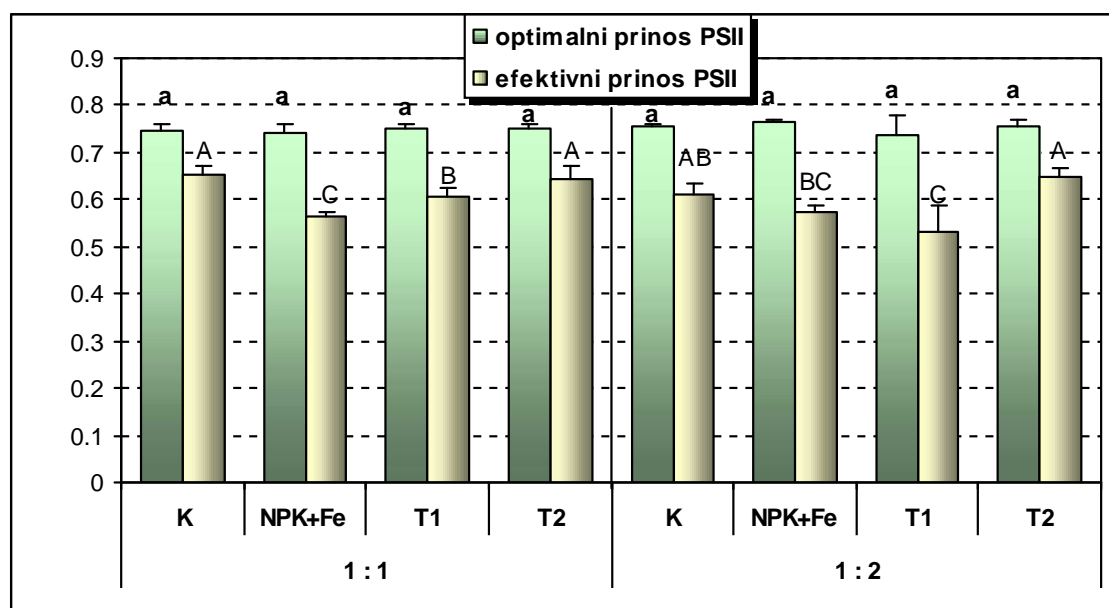
4.3.1. *IN SITU* FLUORESCENCIJA KLOROFILA *a*

4.3.1.1. OPTIMALNI I EFEKTIVNI PRINOS FOTOSUSTAVA II

Optimalni prinos fotosustava II (PSII) kod biljaka uzgajanih na supstratu 1:1 i 1:2 uz dodatak troske (10 i 20 g) te umjetnog gnojiva NPK i teku eg željeza se statisti ki zna ajno nije razlikovao u odnosu na kontrolne biljke (slika 7).

Efektivni prinos PSII na supstratu 1:1 bio je znatno smanjen na biljkama raslim uz dodatak 20 g troske, a posebice na biljkama uzgojenim uz dodatak umjetnog gnojiva.

Na supstratu 1:2, troska u koli ini od 10 g uzrokovala je statisti ki zna ajno smanjenje efektivnog prinosa PSII u odnosu na kontrolu. Ve a koli ina troske uzrokovala je lagano pove anje vrijednosti tog parametra (slika 7).

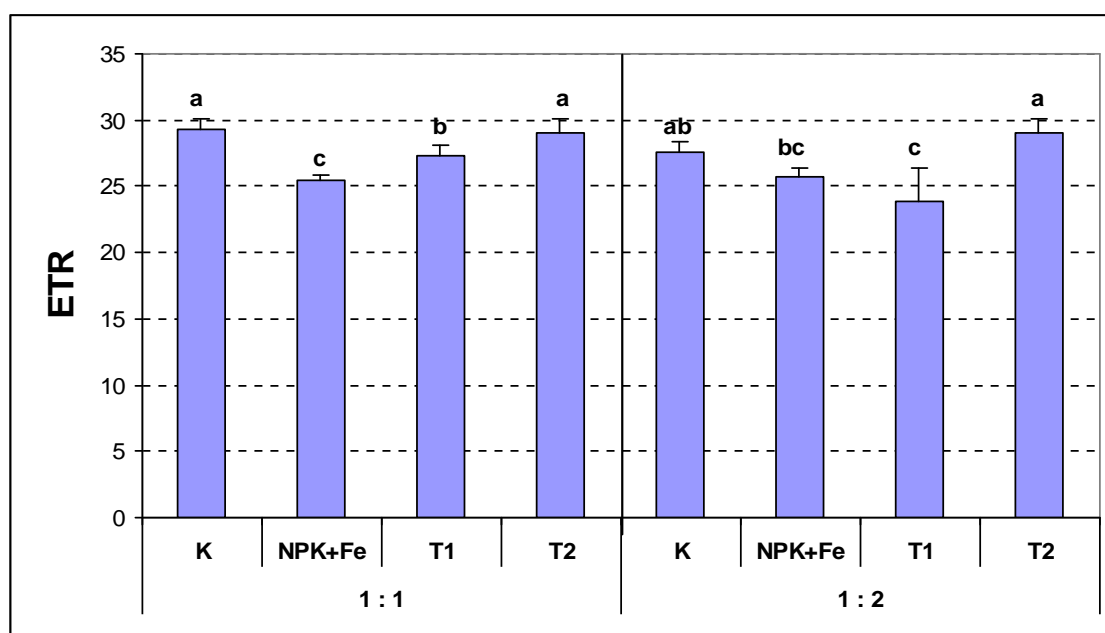


Slika 7. Optimalni prinos PSII kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.3.1.2. RELATIVNA STOPA TRANSPORTA ELEKTRONA

Dodatak 20 g troske na mješavini zemlje i pijeska u omjeru 1:1 (supstrat 1:1) nije uzrokovao statistički značajnu razliku relativne stope transporta elektrona (ETR) u odnosu na kontrolu (slika 8). U biljaka zasaenih na supstratu sa 10 g troske a posebice na supstratu sa umjetnim gnojivom zabilježeno je statistički značajno smanjenje stope ETR-a u usporedbi s kontrolom.

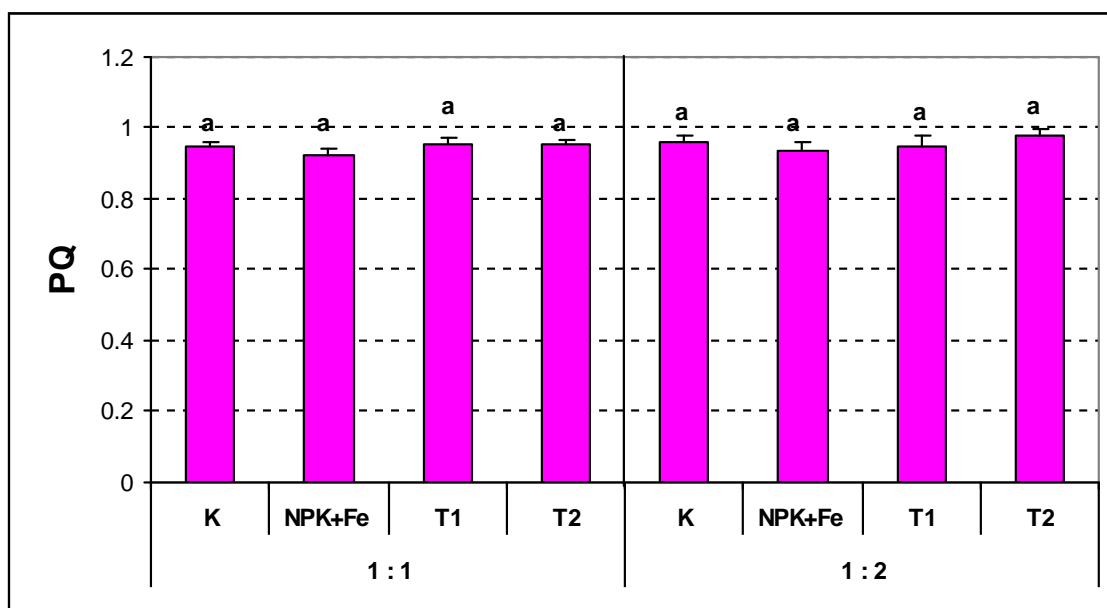
Na supstratu 1:2 sa 10 g troske stopa ETR-a biljaka bila je statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolne biljke. Relativna stopa transporta elektrona biljaka zasaenih uz dodatak 20 g troske bila je lagano povećana u usporedbi s kontrolom.



Slika 8. Relativna stopa transporta elektrona (ETR) kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.3.1.3. FOTOKEMIJSKO GAŠENJE FLUORESCENCIJE (PQ)

Fotokemijsko gašenje fluorescencije u biljkama uzgajanim na mješavini zemlje i pijeska u omjeru 1:1 i 1:2 nije pokazalo statistički značajnu razliku između različitih tretmana (slika 9).

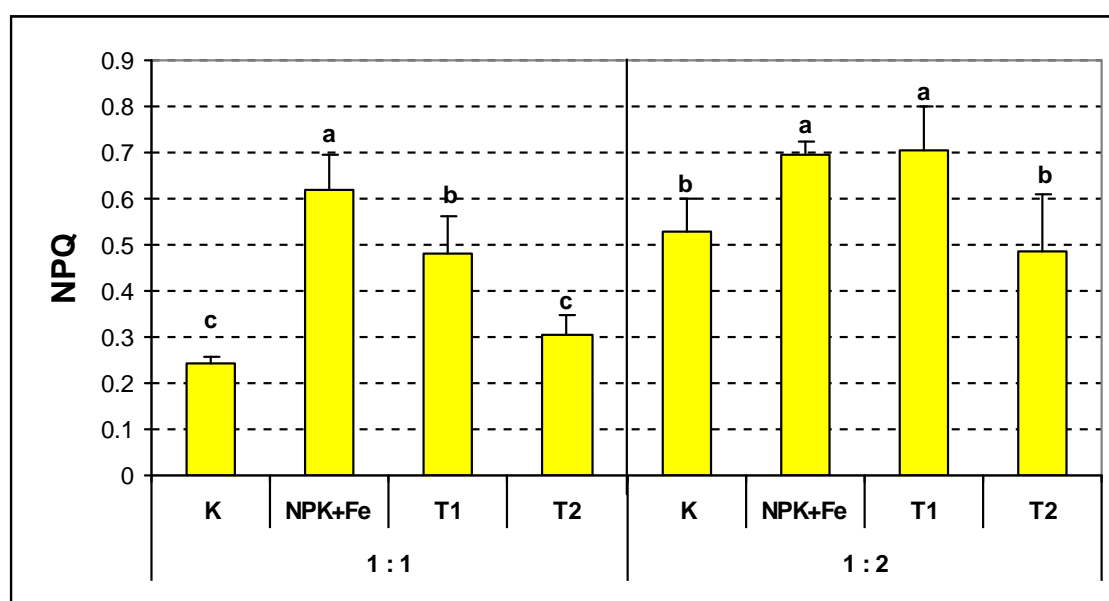


Slika 9. Fotokemijsko gašenje fluorescencije kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.3.1.4. NEFOTOKEMIJSKO GAŠENJE FLUORESCENCIJE

Statistički značajan rast vrijednosti nefotokemijskog gašenja fluorescencije (NPQ) zabilježen je u biljkama uzgajanim u supstratu 1:1 s dodatkom 10 g/kg troske dok je taj parametar u biljkama raslim s dodatkom 20g/kg troske bio sličan kontrolnim vrijednostima. Dodatak umjetnog gnojiva (NPK i tekuće Fe) u supstrat 1:1 izazvao je najveći porast NPQ u listovima kukuruza u odnosu na kontrolu (slika 10).

Troska dodana u količini od 20 g troske po kg supstrata 1:2 nije uzrokovala promjene NPQ u usporedbi s kontrolom. U biljaka uzgajanih s dodatkom umjetnog gnojiva ili 10 g troske zabilježeno je statistički bitno povećanje NPQ-a u odnosu na kontrolu (slika 10).



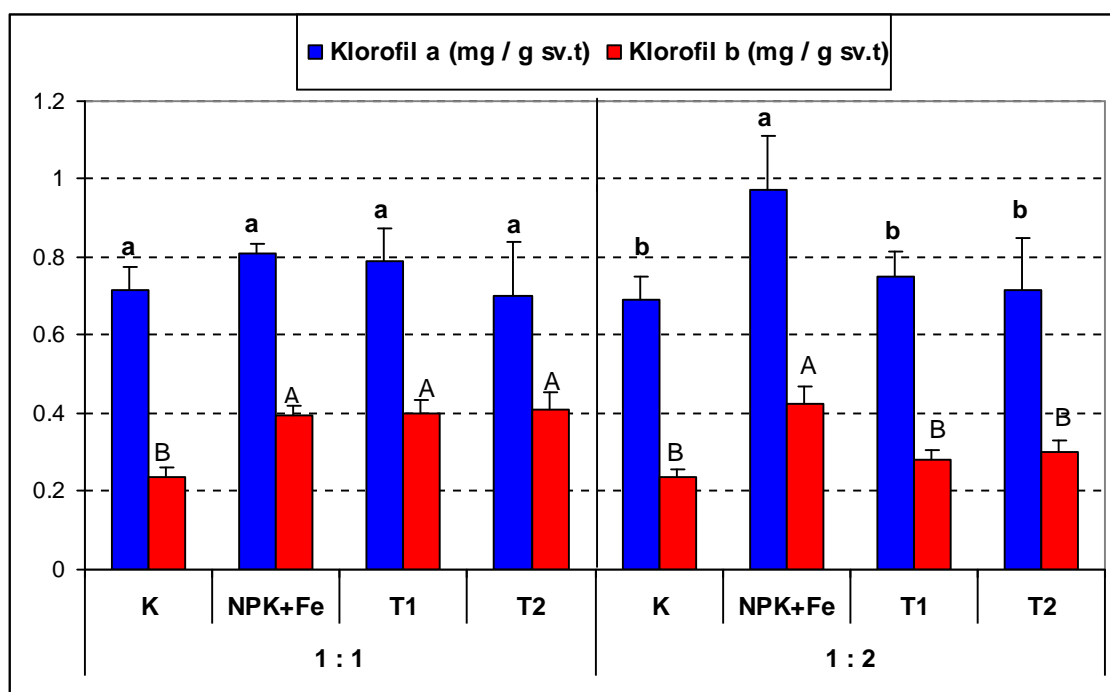
Slika 10. Nefotokemijsko gašenje fluorescencije kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.4. SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA

4.4.1. SADRŽAJ KLOROFILA *a* I *b*

Sadržaj klorofila *a* nije se bitno razlikovao u biljaka uzgajanih na supstratu 1:1, neovisno o dodatku umjetnog gnojiva ili troske (slika 11). Sadržaj klorofila *b* u biljaka uzgajanih na supstratu 1:1 znatno se povećao dodatkom troske (10 i 20 g/kg supstrata) i umjetnog gnojiva u usporedbi s kontrolnim biljkama.

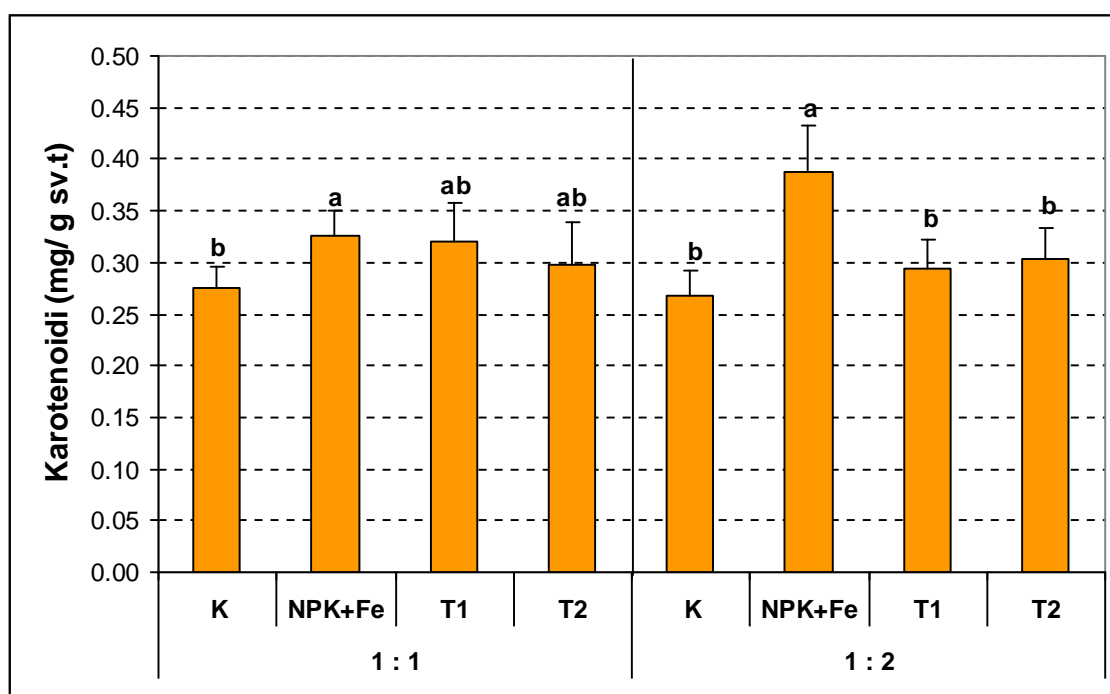
Dodatak troske u supstrat 1:2 bilo u količini od 10 ili 20 g nije bitno utjecao na sadržaj klorofila *a* i *b* (slika 11). Statistički značajno povećanje klorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolu vidljivo je u biljaka uzgajanih s dodatkom umjetnog gnojiva (pozitivna kontrola).



Slika 11. Sadržaj klorofila *a* i *b* kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.4.2. SADRŽAJ UKUPNIH KAROTENOIDA

Lagano pove anje sadržaja ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolu vidljivo je u biljaka uzgajanih na supstratu 1:1 s dodatkom troske (slika 12). Me utim, u biljaka uzgajanih na supstratu 1:2, dodatak troske nije statisti ki zna ajno utjecao na sadržaj karotenoida. Bitno pove anje sadržaja karotenoida u usporedbi s kontrolnim biljkama zabilježeno je kod biljaka uzgajanih s umjetnim gnojivom NPK i teku im željezom, bez obzira na omjer pijeska i zemlje.



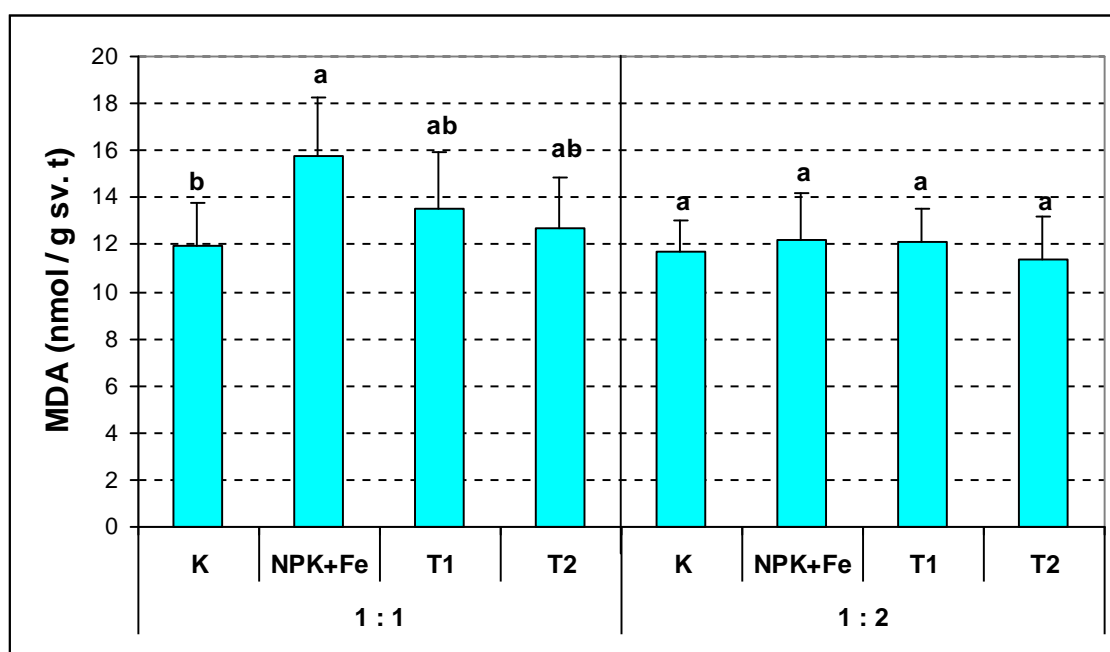
Slika 12. Sadržaj ukupnih karotenoida kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju (P 0,05). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.5. POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA

4.5.1. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA

Sadržaj malondialdehida (MDA) ukazuje na oštećenje lipidne komponente stanične membrane. Sadržaj MDA je lagano porastao u listovima biljaka raslih na supstratu 1:1 s dodatkom troske u usporedbi s kontrolom (slika 13). Statistički značajan porast MDA vidljiv je kod biljaka uzgajanih uz dodatak umjetnog gnojiva NPK i tekućeg Fe.

Opseg lipidne peroksidacije procijenjen na temelju sadržaja MDA nije se bitno razlikovao u biljaka uzgajanih na supstratu 1:2, neovisno o dodatku umjetnog gnojiva ili troske (slika 13).

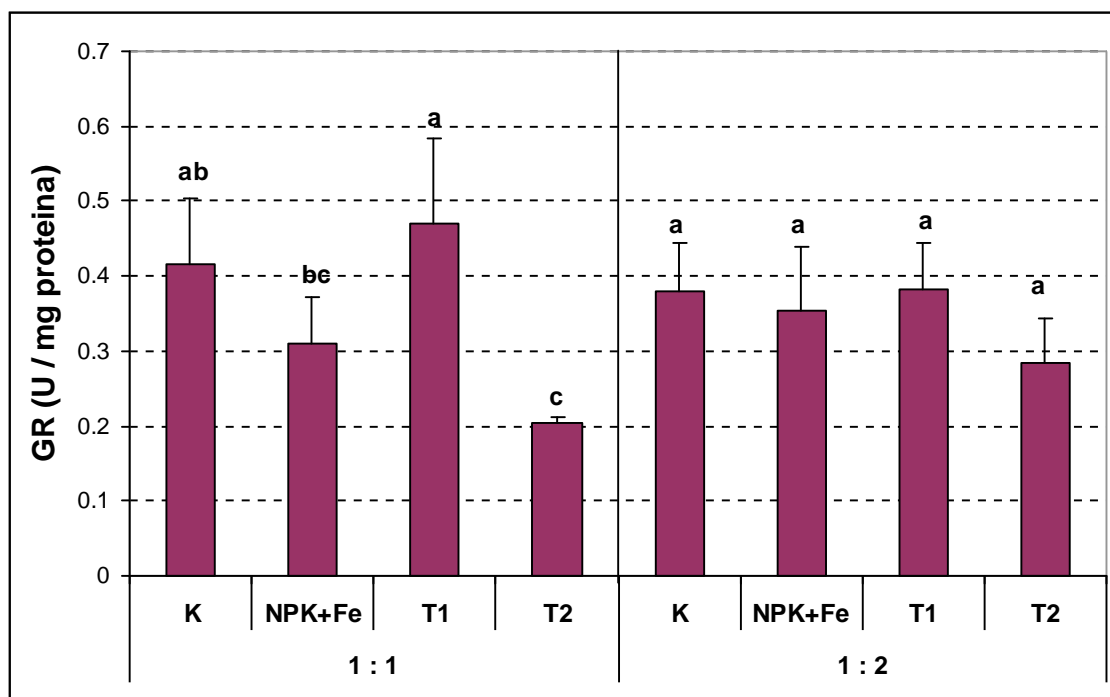


Slika 13. Sadržaj malondialdehida kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (tekuće gnojivo NPK i tekuće Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je označena standardna devijacija.

4.5.2. AKTIVNOST GLUTATION REDUKTAZE

Dodatak 20 g troske u mješavinu zemlje i pijeska u omjeru 1:1 uzrokovao je u listovima kukuruza statisti ki zna ajno smanjenje aktivnosti glutacione reduktaze u odnosu na kontrolne biljke (slika 14). U biljaka uzgajanih s dodatkom umjetnog gnojiva zabilježeno je lagano smanjenje aktivnosti tog enzima dok je dodatak 10 g troske/kg supstrata uzrokovao lagano pove anje glutacione reduktaze u odnosu na kontrolu.

U slu aju siromašnijeg supstrata (mješavina zemlje i pijeska u omjeru 1:2), aktivnost glutacione reduktaze bila je podjednaka u listovima kontrolnih biljaka, biljaka uzgojenih s dodatkom troske ili umjetnog gnojiva (slika 14).



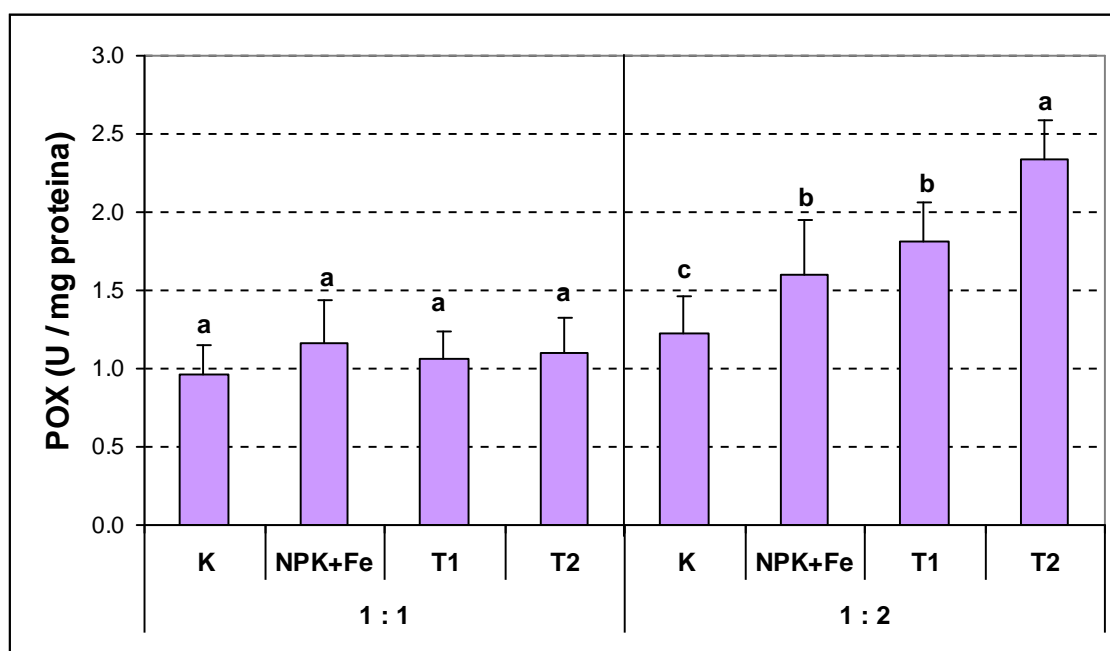
Slika 14. Aktivnost glutacione reduktaze kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.5.3. AKTIVNOST PEROKSIDAZA

4.5.3.1. AKTIVNOST GVAJAKOL PEROKSIDAZE

Aktivnost nespecifi nih peroksidaza izmjerena je uz gvajakol kao supstrat. Aktivnost gvajakol peroksidaze u listovima kukuruza uzgojenim na supstratu 1:1 nije se bitno promijenila dodatkom umjetnog gnojiva NPK i teku eg Fe, kao niti dodatkom troske (10 i 20 g) u usporedbi s kontrolnim biljkama (slika 15).

Usporedbom biljaka zasa enih na supstratu 1:2, vidljiv je zna ajan porast aktivnosti gvajakol peroksidaze u biljkama uzgojenim uz dodatak umjetnog gnojiva i 10 g troske u odnosu na kontrolu. Najve i porast aktivnosti tog enzima zabilježen u biljkama uzgojenim sa 20 g troske / kg supstrata.

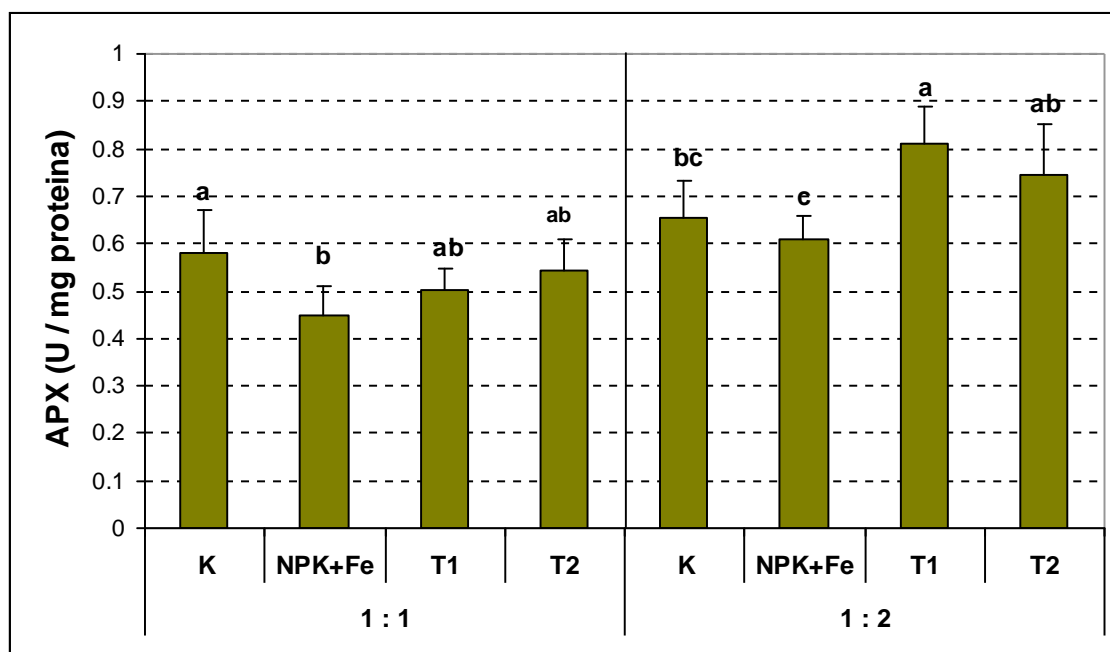


Slika 15. Aktivnost gvajakol peroksidaze kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju ($P < 0,05$). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

4.5.3.2. AKTIVNOST ASKORBAT PEROKSIDAZE

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) u biljkama uzgojenim u supstratu 1:1 uz dodatak troske nije se statisti ki zna ajno razlikovala u odnosu na kontrolne biljke (slika 16). Statisti ki zna ajno smanjenje aktivnosti tog enzima izmjereno je u biljkama uzgojenim uz dodatak umjetnog gnojiva.

Upotrebom supstrata 1:2 s ve om koli inom dodane troske (20g/kg) zabilježen je lagani porast aktivnosti APX-a dok je troska u nižoj koli ini izazvala statisti ki zna ajno pove anje aktivnosti tog antioksidacijskog enzima. Dodatkom umjetnog gnojiva, aktivnost APX-a se u listovima kukuruza lagano smanjila u odnosu na vrijednosti kontrolnih biljaka (slika 16).



Slika 16. Aktivnost askorbat peroksidaze kukuruza uzgajanog 6 tjedana na mješavini zemlje i pijeska u omjerima 1:1 i 1:2 (supstrat 1:1 i 1:2) bez dodatka umjetnog gnojiva (teku e gnojivo NPK i teku e Fe, NPK+Fe) i troske (kontrola, K), na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom NPK+Fe (pozitivna kontrola, NPK+Fe), i na supstratu 1:1 i 1:2 s dodatkom 10 g troske/kg supstrata (T1) i 20 g troske/kg supstrata (T2). Stupci ozna eni razli itim slovima me usobno se statisti ki zna ajno razlikuju (P 0,05). Na stupcima je ozna ena standardna devijacija.

Primjena industrijskog otpada kao gnojiva je postala uobičajena praksa u poljoprivredi još od 19. stoljeća (Liu i sur., 2002, Yang i Zhang, 2005, Zhang i sur., 2003). Budući da troska sadrži visok nivo Fe, Mn, Mg i P, a nivo Cd, Pb i drugih štetnih metala je vrlo nizak, troska se smatra potencijalnim izvorom mineralnih tvari za rast i razvoj, posebice na tlima siromašnim željezom. U istraživanju Wintenborn i Green (1998) pokazano je da troska dobivena u elektrolu najprije i postepeno otpušta metale u okoliš te tako ne predstavlja rizik za zdravlje ljudi, životinje i biljke.

Vrijednost troske u agronomskom smislu varira ovisno o biljnoj vrsti (poljoprivredne kulture, trave, drvenaste vrste), tipu tla te klimatskim podneblju. No, uspješna upotreba bazične troske u umjerenoj klimi zabilježena je pri uzgoju krumpira, cikle i različitih žitarica (raž, kukuruz, uljana repica). U usporedbi s fosfatnim gnojivom topivim u vodi, učinkovitost troske bila je manje uspješna u kulturama koje zahtijevaju brzo iskoristiv fosfor kao što su mrkva, salata i brokula (Mattingley, 1968).

U ovom se radu nastojala procijeniti učinkovitost troske kao poboljšivača tla i/ili izvora određenih hranjivih elemenata na rast i razvoj kukuruza (*Zea mays* L.). U tu svrhu kao supstrat za sadnju biljaka korištene su mješavine zemlje i pijeska u omjeru 1:1 (bogatiji supstrat) i u omjeru 1:2 (siromašniji supstrat). Količina eksperimentalno primijenjene troske (10 g troske/kg i 20 g troske/kg supstrata) odabrana je na temelju istraživanja Wang i Cai (2006), a sam supstrat korišten je kao kontrola. Naravno i sam sastav troske utječe na njezinu učinkovitost kao gnojiva koje pospješuje rast i razvoj biljaka. Sastav troske varira od proizvođača do proizvođača i elika prije svega ovisno o izvoru Fe u procesu proizvodnje elika. Dijelu kontrolnih biljaka koje služe kao pozitivna kontrola dodano je umjetno gnojivo NPK i tekuće željezo kako bi se što bolje mogla procijeniti iskoristivost troske kao potencijalnog gnojiva ili poboljšivača tla.

Troska upotrijebljena u ovom radu je nusproizvod u proizvodnji elika u elektrolu najprije (CMC Valjaonica cijevi Sisak d.o.o.), a sadrži velike količine željeza, kalcijevog, silicijevog i magnezijevog oksida te manje količine mangana, ugljika, sumpora i oksida fosfora, aluminija, vanadija, kroma.

Analiza eluata troske (Tablica 2) je pokazala da troska sadrži vrlo niske koncentracije Cu, Pb i Cd te ostalih teških metala. Međutim, koncentracije Cu, Pb i Cd u supstratima upotrijebljenim u ovom istraživanju (Tablica 4), neovisno o tome da li je u supstrat dodana ili troska ili umjetno gnojivo, bile su veće nego u samoj troski. Na osnovu tih rezultata može se zaključiti da nešto veće koncentracije tih teških metala vjerojatno potječu iz zemlje ili pijeska. U prilog toj tezi ide i činjenica da je zemlja korištena za supstrate uzorkovana u Botaničkom vrtu (Zagreb) blizu željezničke pruge gdje se mogu naći ekvivalente tih metala.

Na temelju mjerenih pokazatelja rasta (visina biljaka te broj i dužina listova) vidljiv je pozitivan učinak troske, posebice na siromašnijem supstratu, na rast kukuruza. Taj bi se učinak vjerojatno mogao pripisati boljoj učinkovitosti fotosustava II i povećanom sadržaju klorofila kao i mikroelemenata u listovima kukuruza uzgajanim na supstratima s dodanom troskom. Naime, biljke uzgajane na supstratima s troskom sadržavale su znatno veće količine Mn, Mg, Na te poglavito Fe u odnosu na kontrolne biljke. Poznato je da su i Mg i Fe neophodni mikroelementi u biosintezi klorofila (Pevalek-Kozlina, 2003). Ti su rezultati u skladu s istraživanjem Wang i Cai (2006) koji su također utvrdili da je troska vrlo dobar i jeftin izvor Fe i drugih elemenata potrebnih kukuruza za rast i razvoj. Vrlo je sigurno zaključeno i u istraživanjima Zhang i sur. (2003) i Yang i Zhang (2005) gdje je dokazan pozitivan učinak troske kao gnojiva bogatog Si i Fe na rast i prinos riže.

Dodatak troske u supstrate nije utjecao na masu suhe tvari listova kukuruza dok je dodatak NPK i Fe u siromašnijem supstratu izazvao smanjenje mase suhe tvari biljaka. Suprotno ovim rezultatima, u istraživanju Wang i Cai (2006) zabilježeno je dvostruko povećanje mase suhe tvari biljaka uzgajanih na bogatijem supstratu, neovisno o tome je li dodana troska ili NPK i Fe, dok je značajno smanjenje mase suhe tvari u odnosu na kontrolu zabilježeno u kukuruza uzgajanom na siromašnijem tlu uz dodatak 20 g troske.

U ovom se istraživanju također pokušalo utvrditi utjecaj troske, zbog visokog sadržaja Fe, na aktivaciju antioksidacijskog sustava odnosno da li dovodi do oksidacijskog stresa u stanicama biljaka. Željezo je redoks aktivan tranzicijski metal koji je neophodan u mnogim fiziološkim reakcijama u stanicama jer ima više oksidacijskih stanja (Fe^{2+}/Fe^{3+} redoks sustav), no

toksi an je u ve im koli inama. U Fentonovoj reakciji djeluje kao katalizator dovode i do pove anog stvaranja hidroksilnih radikala koji djeluju štetno na lipide, proteine i molekule DNA. Željezo može reagirati i s lipidnim hidroperoksidima, daju i reaktivne lipidne alkoksilne radikale koji dalje sudjeluju u širenju lipidne peroksidacije (Inzé i Van Montagu, 2002). Iako je sadržaj željeza u listovima kukuruza uzgajanog u supstratu s troskom (neovisno o omjeru zemlje i pijeska) bio pove an, na temelju pra enih pokazatelja oksidacijskog stresa, može se zaklju iti da troska ne dovodi do pove anja reaktivnih oblika kisika u stanicama kukuruza. Pove anje aktivnosti nespecifi nih ili gvajakol peroksidaza, koje nemaju direktnu antioksidacijsku ulogu, izmjereno je samo u listovima kukuruza uzgajanog u siromašnijem supstratu s dodanom troskom. Me utim, sadržaj malondialdehida koji ukazuje na oksidacijsko ošte enje lipidne komponente stani ne membrane, nije bio pove an u biljkama uzganim u supstratima s troskom. Dodatkom troske u supstrat nije zabilježena ni indukcija glutathion reduktaze, a niti zna ajnija aktivacija askorbat peroksidaze u stanicama kukuruza. Oba enzima su važan dio antioksidacijskog sustava – askorbat peroksidaza ijom aktivnoš u dolazi do razgradnje vodikovog peroksida i stvaranja monodehidroksiaskorbata (oksidirani askorbat) te glutathion reduktaza ijom se aktivnoš u reducira oksidirani glutathion koji zatim osigurava regeneraciju askorbinske kiseline te tako sudjeluje u uklanjanju vodikovog peroksida.

Obzirom da opsežniji podaci o u inku troske na rast biljaka a posebice o u inku troske na fiziološke procese, uklju uju i i u inkovitost fotosintetskog aparata i pove ano stvaranje aktivnih oblika kisika, ne postoje ili dosad nisu objavljeni, nije mogu a direktna usporedba dobivenih rezultata u ovom radu s ostalim istraživanjima.

No, na temelju ovih rezultata možemo zaklju iti da je troska vrlo dobar i jeftin izvor Fe i drugih elemenata potrebnih biljci te da se njezinom upotrebom znatno smanjuje kloroza listova u biljaka koje rastu na vapnenastim tlima siromašnim željezom. Ovo istraživanje tako er može doprinijeti pove anoj upotrebi troske u poljoprivredi, što bi rezultiralo: 1. pove anjem prinosa poljoprivrednih kultura te 2. zna ajnim smanjenjem koli ine otpadne troske a time i smanjenjem financijskih sredstava potrebnih za njeno zbrinjavanje.

Na temelju rezultata mjerenih fizioloških parametara koji su pokazali da je troska:

- uzrokovala povećani rast kukuruza
- uzrokovala povećani sadržaj Mn, Fe, Mg i Na u listovima kukuruza te dušika na bogatijem supstratu
- povećala sadržaj klorofila na bogatijem supstratu a dodana u manjoj količini smanjila efektivni prinos fotosustava II u listovima kukuruza

te usporedbom s umjetnim gnojivom NPK+tekuće Fe koji je:

- povećao rast kukuruza
- poslužio biljkama kao izvor dušika te povećao raspoloživost Fe i Na
- smanjio efektivni prinos fotosustava II u listovima kukuruza te povećao sadržaj klorofila i karotenoida neovisno o supstratu

može se zaključiti da troska ne može zamijeniti klasično NPK gnojivo ali je izvrstan izvor mikroelemenata tj. obogaćuje tlo njima što je posebice važno za biljke koje rastu na siromašnijim tlima

Na temelju rezultata mjerenih parametara oksidacijskog stresa koji su pokazali da je troska:

- na bogatijem supstratu nije utjecala na aktivnost gvajakol (POX) i askorbat (APX) peroksidaze kao ni na opseg lipidne peroksidacije, a dodana u većoj količini smanjila je aktivnosti glutation reduktaze
- na siromašnijem supstratu nije promijenila aktivnost GR niti izazvala oštećenje lipidne komponente stanične membrane a dodana u većoj količini povećala je aktivnost POX i APX

te usporedbom s umjetnim gnojivom NPK+tekuće Fe koji je:

- na bogatijem supstratu povećao opseg lipidne peroksidacije a smanjio aktivnost GR i APX
- na siromašnijem supstratu smanjio aktivnost APX a nije bitno utjecao na ostale parametre

može se zaključiti da troska na siromašnijem supstratu stimulira aktivnost antioksidacijskih enzima tj. obrambenih mehanizama biljke te ne izaziva oksidacijski stres

- Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplast: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* **82**: 1227-1238.
- Asada, K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* **55**: 235-241.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* **91**: 179-194.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Breusegem, F., van Montagu, M., Inzé, D. (2002): Engineering stress tolerance in maize. U Inzé, D., van Montagu, M. (ur.): *Oxidative stress in plants*. Taylor & Francis Inc, London, New York, 191-217.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. (1984): β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**: 569-573.
- Chance, B., Maehly, A.C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. U Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (ur.): *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 764-775.
- Duncan, D.B. (1955): Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**: 1-42.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I - Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**: 189-198.
- Inzé, D., Van Montagu, M. (2002): *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, London and New York.
- Jinmin, F., Huang, B. (2002): Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Department of Horticulture, Forestry and Recreation Resources, Kansas State University.
- Laloue, H., Weber-Lotfi, F., Lucau-Danila, A., Guillemaut, P. (1997): Identification of ascorbate and guaiacol peroxidases in needle chloroplasts of spruce trees. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 341-346.
- Lichtenthaler, H.K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* **148**: 350-382.

- Liu, M.D., Zhang, Y.L., Wang, Y.J., Yang, D. (2002): Effect of slag application on dynamic changes of pH, water-soluble silicon concentration in paddy soil and rice yield. *Chinese J. Soil Sci.* **33**: 47-50.
- Mattingley, G.E.G. (1968): Evaluation of phosphate fertilizers II. *J. Agric. Science* **70**: 139-156.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**: 867-880.
- Perl-Treves, R., Perl, A. (2002): Oxidative stress: an introduction. U Inzé, D., van Montagu, M. (ur.): *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis Inc, London, New York, 1-33.
- Pevalek-Kozlina, B. (2003): *Fiziologija bilja*. Profil International, Zagreb.
- Rastov an-Mio , A. (1996): Efekti aktivacije troske elektrope i. Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveu ilište u Zagrebu, Zagreb.
- Rastov an-Mio , A., Sofili , T., Mio , B. (2009) Application of electric arc furnace slag. U *Proceedings matrib Vela luka otok / island Kor ula, Hrvatska 24-26. lipnja*. Grilec, K., Mari , G. (ur.). Zagreb, Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, 436-444.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994): Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecol. Stud.* **100**: 49-70.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2001): Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiol. Plant.* **112**: 487-494.
- Sofili , T., Merle, V., Rastov an-Mio , A., osi , M., Sofili , U. (2010): Steel Slag Instead Natural Aggregate in Asphalt Mixture. *Arch. Metall. Mater.* **55** (prihva en za objavljivanje).
- Uma, S., Prasad, T.G., Udaya Kumar, M. (1995): Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress proteins in response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Ann. Bot.* **76**: 43-49.
- Wang, X., Cai, Q-S. (2006): Steel slag as an iron fertilizer for corn growth and soil improvement in a pot experiment. *Pedosphere* **16**: 519-524.
- Wintenborn, J.L., Green, J.J. (1998): *Steelmaking Slag: A safe and valuable product*. Report prepared by Collier S, Rill & Scott, PPLC on behalf of the Steel Slag Coalition, National Slag Association.

Yang, D., Zhang, Y.L. (2005): Effect of applied blast furnace slags on pH and silicon in rice plant. *J. Agro-Env. Sci.* **24**: 446-449.

Zhang, Y.L., Liu, M.D., Wang, Y.J., Du, L.D. (2003): Effects of slag application on Si, Fe, and Mn in paddy soil and rice plant. *Chinese J. Soil Sci.* **34**: 308-311.