

Utjecaj kadmija na uzgoj kelja i kupusa u onečišćenim tlima

Sažetak

U ovom radu ispitan je utjecaj kadmija na rast kelja (*Brassica oleracea* var. *sabauda*) i kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*), distribucija kadmija u pojedine dijelove biljaka uzgojenih u tlu s različitim udjelima kadmija te njihov fitoekstrakcijski potencijal. Također je praćen i utjecaj povećanog udjela kadmija u tlu na sadržaj polifenola, kako bi se utvrdila moguća povezanost tih sekundarnih metabolita i odgovora biljke na stres uzrokovan prisutnošću teških metala u tlu. Dobiveni rezultati mogu biti od osobitog značaja za naše područje budući da su kupus i kelj važne i relativno često korištene namirnice u našoj prehrani te iznimno dobro uspijevaju u našem podneblju, stoga bitna je spoznaja kako one mogu akumulirati značajne količine teških metala prilikom rasta na onečišćenom tlu. Njihova dugotrajna konzumacija može nepovoljno utjecati na zdravlje ljudi i životinja.

Ključne riječi: fitoremedijacija, kadmij, kelj, kupus, teški metali

Uvod

Teški metali kao glavna skupina anorganskih kontaminanata izvor su onečišćenja razmjerno velikih područja tla (Yang i sur., 2005) te poprimaju sve veću pažnju uslijed povećanog otpuštanja u okoliš kao posljedice brzog industrijskog razvoja. Kultivacija usjeva za humanu upotrebu ili stočnu hranu na tlima kontaminiranim teškim metalima može potencijalno dovesti do unosa i akumulacije tih metala u jestive dijelove biljke (Gisbert i sur., 2006) što predstavlja značajnu opasnost po zdravlje ljudi i životinja (Yang i sur., 2005). Sanacija tla onečišćenih metalima primjenom tradicionalnih fizikalnih i kemijskih metoda zahtijeva velika ulaganja (Marchiol i sur., 2004). Fitoremedijacija kao tehnika koja se temelji na primjeni biljaka sa sposobnošću akumulacije teških metala iz tla i vode, pojavljuje se kao novo oruđe za *in situ* remedijaciju. Ekološki je prihvatljiva, potencijalno jeftina, vizualno nenametljiva i nudi mogućnost bioobnove tla onečišćenog teškim metalima (Yang i sur., 2005). Neki od uvjeta koje biljke moraju zadovoljavati kako bi proces fitoremedijacije bio učinkovit i ekološki isplativ su: brzi rast, velika biomasa, duboko korijenje, laka manipulacija, toleriranje i akumuliranje velikog broja teških metala u nadzemnim dijelovima biljke (Grispen i sur., 2006).

Posljednjih godina onečišćenje kadmijem (Cd), jednim od najopasnijih teških metala otpuštenim u okoliš, ubrzano raste. Budući da mnogobrojna istraživanja ukazuju na toksični učinak Cd na biološke sustave (Godt i sur., 2006; Takiguchi i Yoshihara, 2006), onečišćenje poljoprivrednih tala kadmijem svjetski je okolišni i zdravstveni problem od velikog značaja. Na području Republike Hrvatske provedeno je nekoliko istraživanja sadržaja kadmija u tlu (Romić i Romić, 1998; Vrbek i sur. 2009). Tako je na primjer u poljoprivrednim tlima Zagreba i okolice utvrđen visok sadržaj kadmija (3,85 mg kg⁻¹ suhog tla) te se cijelo područje unutar trokuta Velika Gorica- Jakuševac- Šćitarjevo (do Save) može izdvojiti kao kritično s obzirom na sadržaj kadmija (Romić i Romić, 1998). Stoga postoji veliki interes

¹ Tamara Jakovljević, Ivica Čehulić, Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko

² Manuela Panić, Ivana Radojčić Redovniković, Prehrambeno – biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb

za identifikaciju autohtonih biljnih vrsta sposobnih akumulirati povećane količine Cd, s ciljem njihove primjene za fitoremedijaciju kontaminiranih tla, pri čemu su brojni radovi usmjereni na biljke iz porodice *Brassicaceae* (Marchiol i sur. 2004; Gisbert i sur., 2006; Jahangir i sur., 2008; Liu i sur., 2010; Jakovljević i sur., 2013). Neki od pripadnika ove porodice poznati su kao značajni akumulatori metala kao npr. gorušica (*Hirschfeldia incana* L.) i smeđa gorušica (*Brassica juncea*) koje mogu apsorbirati i akumulirati velike udjele teških metala poput kadmija, bakra, nikla, cinka, olova i selenija. (Gisbert i sur., 2006). Brojne je istraživače zainteresirao utjecaj metala na ove biljke ne samo radi primjene u fitoremedijaciji nego i zbog uzgoja biljaka blizu onečišćenih područja koja mogu dovesti do akumulacije metala u biljkama što predstavlja mogući zdravstveni rizik za ljude i stoku koja se hrani tim biljkama (Jahangir i sur., 2008).

Posljedica rasta biljaka pri visokim udjelima teških metala u tlu je pojava oksidativnog stresa, te velike promjene u profilu genske ekspresije pod čijom su kontrolom višestruki stanični putevi. Genski reguliran odgovor na stres očituje se u gotovo svim aspektima biljnih funkcija i metabolizma, uključujući i sekundarni metabolizam (Kalifa i sur., 2004). Nekoliko studija ukazuje da sekundarni metaboliti imaju značajnu ulogu u odgovoru biljke na stres uzrokovan metalima (Tolrá i sur., 2006; Jahangir i sur., 2008). Postoje mnoga istraživanja u kojima je uočena promjena udjela glukozinolata i polifenola, uslijed izlaganja biljaka visokim udjelima teških metala no mehanizmi tih interakcija još nisu sasvim razriješeni (Jahangir i sur., 2008).

Cilj ovog rada je (i) utvrditi potencijal autohtonih sorata kelja (*Brassica oleracea* var. *sabauda*) i kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*) u fitoremedijaciji Cd te je u tu svrhu ispitan utjecaj Cd na rast biljaka, fitoekstrakcijski potencijal te distribucija Cd u pojedine dijelove biljke (list, stabljika, korijen) (ii) procijeniti rizik po ljudsko i životinjsko zdravlje uslijed konzumacije kelja i kupusa kultiviranih na poljoprivrednim područjima s prekomjernom količinom prisutnog Cd te (iii) istražiti utjecaj povećanog udjela kadmija u tlu na sadržaj polifenola, kako bi se utvrdila moguća povezanost tih sekundarnih metabolita i odgovora biljke na stres uzrokovan prisutnošću teških metala u tlu.

Materijali i metode

Biljne presadnice kelja sorte Virossa (*Brassica oleracea* var. *sabauda*) i kupusa sorte Saratog (*Brassica oleracea* var. *capitata*) dobivene su iz rasadnika „Piket“, Zemunik Donji. Za pokus je korišteno smjesa tla Profi mix1 i Profi mix 2 (Durpeta Litva) (Tablica 1). Mjesec dana prije sadnje tlo je tretirano s određenom vodenom otopinom kadmijevog klorid hidrata (35 mg L^{-1} i 88 mg L^{-1}) te je postignut udio kadmija u tlu od 10 odnosno 25 mg kg^{-1} suhe tvari tla.

	Parametar	Vrijednost
Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva tla (iz izvještaja o rezultatima analize tla Hrvatskog šumarskog instituta)	pH u H_2O CaCl_2	6,10
	E.C. (1:2 vol.)	$1,77 \text{ mS cm}^{-1}$
	Organska tvar	95,0 %
	N (1:2 vol.)	$170,2 \text{ mg L}^{-1}$
	P_2O_5 (1:2 vol.)	$167,0 \text{ mg L}^{-1}$
	K_2O (1:2 vol.)	280 mg L^{-1}

Uvjeti uzgoja

Presadnice kelja i kupusa posađene su pojedinačno u teglice promjera 16 cm. Sveukupno je posađeno 45 presadnica kelja i 45 presadnica kupusa, i to 15 za svaki pojedini maseni udio kadmija u tlu (0, 10 i 25 mg kg⁻¹ suhe tvari zemlje) u stakleniku unutar Hrvatskog šumarskog instituta u Jastrebarskom (Slika 1). Dnevna temperatura tijekom uzgoja u stakleniku iznosila je 25 ± 0,5 °C te noćna 14 ± 0,5 °C, a vlažnost je iznosila 75-85 %. Uzgoj je trajao 75 dana te je prilikom berbe uzeto po 6 biljaka za svaki udio kadmija u tlu. Biljke su vagane kako bi se utvrdio utjecaj kadmija na rast biljaka. Biljke su podijeljene na list, stabljiku i korijen te liofilizirane radi daljnjih analiza.



Slika 1. Presadnice kelja i kupusa u stakleniku Hrvatskog šumarskog instituta u Jastrebarskom

Određivanje biomase biljnog materijala

Nakon skupljanja biljnog materijala, korijen je očišćen od viška tla ispiranjem destiliranom vodom, te je slijedilo određivanje mase biljaka. Prvo je određena masa cijele biljke te je zatim podijeljena na korijen i nadzemni dio biljke te je tako određena masa svakog dijela biljke posebno. Rezultati određivanja biomase biljke su prosjek određivanja 6 biljaka.

Određivanje kadmija atomskom apsorpcijom spektrofotometrijom (AAS)

Udio kadmija određena je na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru s grafitnom pećnicom i autosamplrom (Perkin Elmer Aanalyst 600). Prikupljeni uzorci tla su sušeni na zraku, usitnjeni i prosijani u frakcije <2 mm (Cools i De Vos, 2010). Uzorci biljnog materijala su sušeni u sušioniku na 80 °C kroz 24 h (Rautio i sur., 2010) i potom samljeveni u mlinu da bi se dobio homogeni prah (Ika-Werke, M20, Njemačka). Približno 0,3 g uzoraka pripremljeno je mokrim spaljivanjem (1 ml 30% H₂O₂ i 5 ml 65% HNO₃ za biljni materijal i 3 ml 65% HNO₃ i 9 ml 37% HCl za tlo) pomoću uređaja za mikrovalnu razgradnju (Anton-Paar, Multiwave 3000, Njemačka). Mjerenje je provedeno na valnoj duljini od 228,8 nm (ISO 11047, 1998). Sve analize su provedena za 3 biljke u dva paralelna mjerenja.

Određivanje bioakumulacijskog i translokacijskog faktora

Kako bi se utvrdio fitoremedijacijski potencijal određeni su bioakumulacijski i translokacijski faktori (Wu i sur. 2010). Sposobnost biljaka da akumuliraju teške metale prika-

zuje se kao bioakumulacijski faktor (BF), a on se računa kao omjer koncentracije kadmija u cijeloj biljci te koncentracije kadmija u tlu [1].

$$BF = \frac{c(\text{biljka})}{c(\text{tlu})} \quad [1]$$

Biljka može translocirati teške metale kroz korijenje do drugih dijelova biljke, a ta sposobnost izražava se kao translokacijski faktor (TF) i izračunava se kao omjer između koncentracije kadmija u nadzemnom dijelu biljke i koncentracije kadmija u korijenu [2].

$$TF = \frac{c(\text{izdanak})}{c(\text{korijen})} \quad [2]$$

Određivanje polifenola

Spektrometrijsko određivanje ukupnih polifenola s pomoću Folin-Cio calteau reagensa provedeno je prema metodi koju su opisali Singleton i Rossi (1995). Masa od 300 mg liofiliziranih uzoraka kupusa i kelja ekstrahirana je sa 5 mL metanola (70 %, V/V) uz pomoć vodene kupelji (75 °C /15 min). Ekstrakt je centrifugiran i pohranjen u hladnjak na -18 °C i čuvani do daljnje analize. Na UV/VIS spektrofotometru (Cary 3, Varian, USA) iz mjere na je apsorbancija pri $\lambda = 760$ nm. Za izračunavanje masenog udjela polifenola rabljena je galna kiselina. Dobiveni podaci mjerenja izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline po gramu od suhe tvari povrća. Sve analize su provedena za 3 biljke u dvije paralele.

Statistička analiza

Statistička analiza provedena je upotrebom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirani ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Značajna razlika je razmatrana na razini $p < 0,05$.

Rezultati i rasprava

Povrće roda *Brassica* značajno je u ljudskoj prehrani kao neprocjenjiv izvor biljnih ulja, proteina, različitih nutrijenata poput vitamina, topljivih šećera, karotenoida i vlakana te fitokemikalija poput glukozinolata, polifenola i flavonoida. Također, zbog široke rasprostranjenosti u prirodi i prilagodbe ekstremno različitim uvjetima okoliša, biljke roda *Brassica* postale su jedne od najvažnijih biljnih modela pomoću kojih se istražuje interakcija između biljaka i različitih abiotičkih i biotičkih čimbenika kao što su prisutnost metali u tlu. Iako se biljke iz roda *Brassica* uglavnom koriste zbog njihovih nutritivnog značaja, istraživanja u području fitoremedijacije postaje područje od velikog interesa (Jahangir i sur., 2008). Posljednjih godina postoji značajan interes za identifikaciju autohtonih biljnih vrsta sposobnih akumulirati povećane količine teških metala u tkivu (Gisbert i sur., 2006). Akumulacija teških metala proučavana je kod brojnih biljaka vrsta *Brassica* kao što kineski kupus (*Brassica pekinensis*), smeđa gorušica (*Brassica juncea*), etiopijska gorušica (*Brassica carinata*), gorušica (*Hirschfeldia incana*), repica (*Brassica napus*) i rotkva (*Raphanus sativus*) (Marchiol i sur., 2004; Qadir i sur., 2004; Gisbert i sur., 2006; Liu i sur., 2010).

Potencijal kelja (*Brassica oleracea* var. *sabauda*) i kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*) za fitoremedijaciju kadmija

Tolerancija biljaka na kadmij može biti određena na temelju promjene u biomasi kao odgovoru na toksičnost kadmija u usporedbi s kontrolom (Liu i sur., 2010). Promjena u masi cijele biljke, posebno nadzemnog i podzemnog dijela određena je nakon 75-dnevnog

uzgoja u tlu s različitim udjelom kadmija od 10 i 25 mg kg⁻¹ suhe tvari tla (Tablica 2). Izmjerene vrijednosti za mase cijelih biljaka kelja ne ukazuju na statistički značajnu ($p < 0,05$) promjenu količine biomase u odnosu na kontrolu nakon tretmana kadmija. Za masu stabljika kelja i kupusa nije uočena statistička značajna razlika, dok je kod mase listova uočeno statistički značajno smanjenje biomase pri visokim udjelima kadmija od 25 mg Cd kg⁻¹ suhe tvari tla u odnosu na kontrolu. Vrijednosti dobivene za masu korijena ukazuju na statistički značajno povećanje mase korijena kelja i kupusa nakon tretmana kadmijem u odnosu na kontrolu.

Tablica 2. Rast kupusa i kelja te maseni udio kadmija u pojedinim dijelovima biljaka nakon tretiranja s različitim udjelima kadmija u tlu*

Cd tretman (mg kg ⁻¹ tla)	Svježa masa (g)				Udio Cd (µg g ⁻¹ s.t.)**		
	Cijela biljka	Listovi	Stabljika	Korijen	Listovi	Stabljika	Korijen
Kupus							
0	67.22 ^a ±2.67	49.93 ^a ±2.93	12.67 ^a ±2.03	3.62 ^b ±0.98	-	-	-
10	64.71 ^a ±4.89	46.67 ^{ab} ±4.09	11.62 ^a ±1.71	6.42 ^a ±1.10	6.14 ^a ±0.50	3.85 ^a ±0.48	47.33 ^a ±3.08
25	62.52 ^a ±3.23	41.37 ^{ab} ±3.79	10.62 ^a ±1.21	7.23 ^a ±1.10	7.35 ^a ±1.23	4.21 ^a ±0.83	55.06 ^b ±0.72
Kelj							
0	80.01 ^A ±3.72	66.46 ^A ±2.76	10.05 ^A ±1.93	3.90 ^B ±0.36	-	-	-
10	82.03 ^A ±4.89	60.17 ^A ±5.91	10.71 ^A ±1.79	12.20 ^A ±1.72	3.75 ^B ±0.59	2.97 ^B ±0.29	30.16 ^B ±2.72
25	78.18 ^A ±4.89	58.17 ^A ±3.91	9.71 ^A ±1.79	10.90 ^A ±1.67	5.73 ^A ±1.92	4.50 ^A ±0.90	37.01 ^A ±2.68

*rezultati su srednja vrijednost ± S.D. (n=6 za biomasu biljaka; n=3 za udio kadmija), vrijednosti sa istim slovom unutar istog stupca (a-b za kupus i A-B za kelj) statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

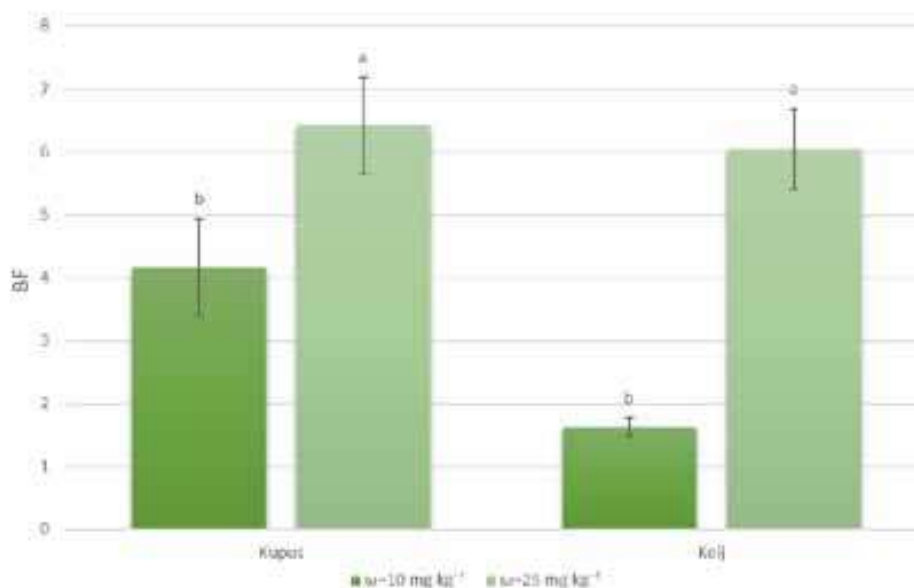
**udio kadmija u kontroli bio je ispod granice kvantifikacije (< 0.5 mg/kg)

Slični pozitivni i neutralni odgovori biomase na stres uzrokovan kadmijem su također utvrđeni kod različitih biljnih vrsta (Sun i sur., 2008; Liu i sur., 2010). Liu i sur. (2010) pratili su utjecaj kadmija (1,0, 2,5 i 5,0 mg Cd kg⁻¹ suhe tvari tla) na rast 18 sorti kineskog kupusa. Većina sorti kineskog kupusa pokazala je toleranciju na prisutnost kadmija u tlu. Biomasa 13 različitih kultivara tretiranih različitim količinama kadmija nije se značajno smanjila u odnosu na kontrolu, a kod triju sorti zabilježen je negativni utjecaj kadmija. S druge strane, njihova biomasa povećala se tijekom 9 tjedana uzgoja. Autori spominju da je mogući mehanizam stimulativnog djelovanja kadmija na rast biomase povezan s aktivacijom enzima u metabolizmu citokinina, što ubrzava rast biljaka.

S ciljem utvrđivanja razine akumulacije i distribucije kadmija u ispitivanim sortama kelja i kupusa utvrđeni su udjeli kadmija u pojedinim dijelovima biljaka (list, stabljika, korijen) (Tablica 2). Primijećena je povećana akumulacija kadmija u biljkama s povećanjem udjela kadmija u tlu te je utvrđen statistički značajan porast udjela kadmija u korijenu kupusa s povećanjem njegovog udjela u tlu te u svim dijelovima kelja. Usporedba udjela kadmija u

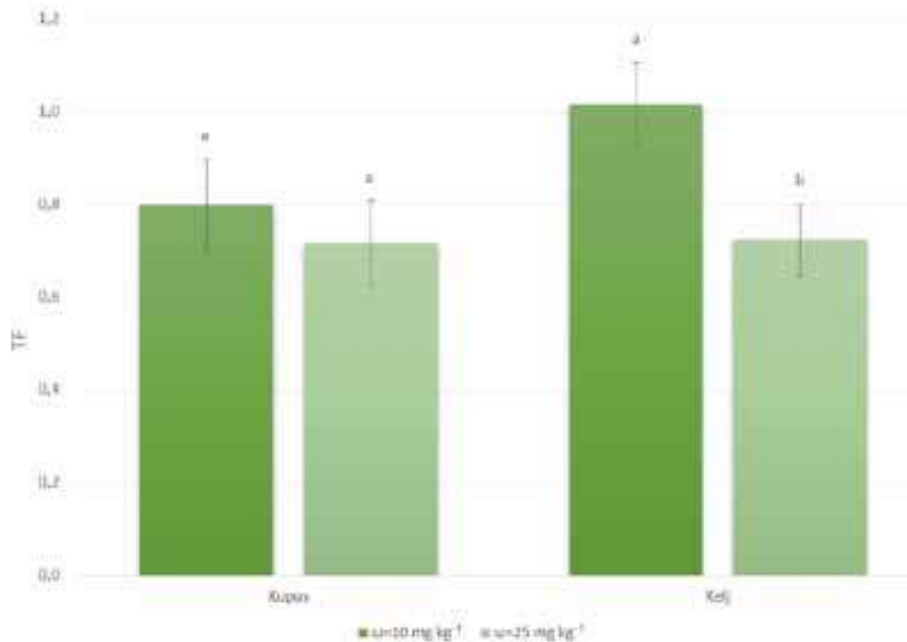
biljnom materijalu kelja i kupusa slična je i u nekim drugim vrstama *Brassica* kao što su *B. pekinensis*, *B. juncea* i *B. napus* i *R. sativus* koje imaju umjereni fitoremedijacijski potencijal (Marchiol i sur., 2004; Qadir i sur., 2004; Grispen i sur., 2006; Liu i sur., 2010). Udio kadmija kod hiperakumulirajućih biljaka u nadzemnom dijelu morao bi biti veći od 100 mg kg^{-1} suhe tvari biomase što nije slučaj za ispitivane sorte kelja i kupusa (Wu i sur., 2010). Ovakvi rezultati su očekivani budući da se ne radi o prirodnim hiperakumulatorima.

Nadalje, s ciljem određivanja fitoekstrakcijskog potencijala ispitivanih sorti kelja i kupusa određeni su bioakumulacijski faktor (BF) i translokacijski faktor (TF) (Slike 2 i 3). Faktor bioakumulacije je definiran kao omjer udjela metala u cijeloj biljci i udjela metala u tlu. Vrijednosti BF mogu biti pokazatelji sposobnosti biljke za akumulaciju teških metala obzirom na biokoncentraciju. Hiperakumulirajuće biljke su one čiji je $\text{BF} > 1.0$ (Cluis i sur., 2004; Niu i sur., 2007). U ovom ispitivanju utvrđena je BF vrijednost za kupus od 4,17 pri 10 mg Cd kg^{-1} suhe tvari tla, dok je pri 25 mg Cd kg^{-1} suhe tvari utvrđena vrijednost BF veća i iznosi 6,42. Utvrđena BF vrijednost za kelj pri 10 mg Cd kg^{-1} suhe tvari tla iznosi 1,63 dok je pri 25 mg Cd kg^{-1} suhe tvari utvrđena vrijednost BF veća i iznosi 6,05. Translokacijski faktor je definiran kao omjer udjela metala u nadzemnom dijelu biljke i udjela metala u korijenu, a koristi se za utvrđivanje učinkovitosti biljke u translokaciji kadmija iz korijena u nadzemni dio. TF vrijednosti mogu ukazati na kretanje i distribuciju teških metala u biljci (Sun i sur., 2009, Niu, 2007). Hiperakumulirajuće biljke karakterizira $\text{TF} > 1,0$ (Cluis i sur., 2004). U ovom ispitivanju utvrđena je TF vrijednost za kupus od oko 0,75 pri oba udjela Cd u tlu. Utvrđena TF vrijednost za kelj iznosi 1,01 pri 10 mg Cd kg^{-1} suhe tvari tla dok je pri 25 mg Cd kg^{-1} suhe tvari tla manja i iznosi 0,72 (slika 3).



Slika 2. Vrijednosti bioakumulacijskog faktora (BF) za kelj i kupus nakon uzgoja u tlu s različitim udjelom kadmija ($\omega = 10$ i 25 mg kg^{-1} suhe tvari tla)

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$), vrijednosti sa istim slovom (a-b) za istu kulturu statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izračunato post hoc Turkey's HSD testom



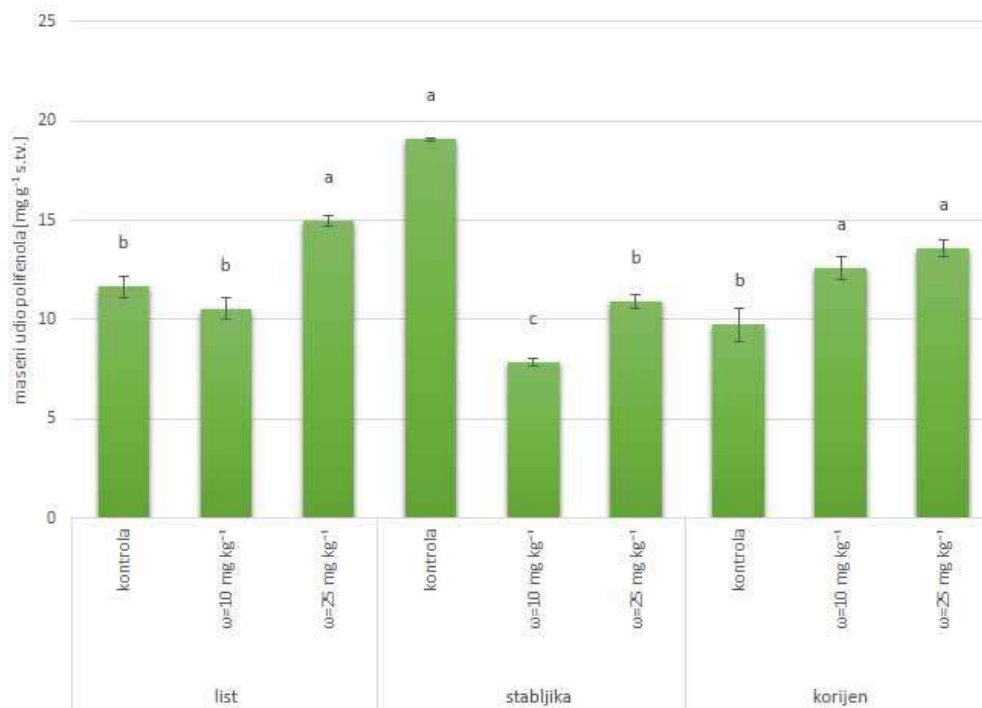
Slika 3. Vrijednosti translokacijskog faktora (TF) za kelj i kupus nakon uzgoja u tlu s različitim udjelom kadmija ($\omega = 0, 10$ i 25 mg kg^{-1} suhe tvari tla)

* rezultati su srednja vrijednost \pm S.D. ($n=3$), vrijednosti sa istim slovom (a-b) za istu kulturu statistički se ne razlikuju ($P < 0,05$) kako je izračunato post hoc Turkey's HSD testom

Uzevši u obzir utjecaj različite količine kadmija na rast biljaka te određene bioakumulacijske i translokacijske faktore dobiveni podaci upućuju na to da obje ispitivane vrste imaju karakteristike biljaka koje bi se mogle razmatrati za fitoekstrakciju onečišćenog tla kadmijem. Također, biljke roda *Brassica* su kao česte namirnice korištene u prehrani te poznavanje sposobnosti akumulacije i distribucije kadmija u biljci je značajno radi procjene rizika njihove konzumacije. U osnovi, fitoremedijacija ovisi o visokim količinama metala u biljnoj biomasi i produkciji relativno velike količine biomase. U usporedbi s nehiperakumulatorima, nadzemni dio biomase hiperakumulatora se ne smanjuje značajno uzgojem u tlu kontaminiranom teškim metalima, što je jedna od najznačajnijih karakteristika hiperakumulatora (Sun i sur., 2009). Nadalje, određene BF vrijednosti također ukazuju da se ove sorte zadovoljavaju jedan od kriterija ($BF > 1,0$) za hiperakumulirajuće vrste. Određene TF vrijednosti i slab utjecaj na biomasu kelja i kupusa ukazuju na visoku toleranciju na prisutnost kadmija u tlu čak i pri visokim udjelima kadmija. Pritom je, utvrđena vrijednost od $TF > 1,0$ za kelj pri 10 mg Cd kg^{-1} suhe tvari tla, zadovoljava jedan od kriterija za hiperakumulirajuće vrste dok se ta sposobnost smanjuje s povećanjem količine kadmija u tlu (Jakovljević i sur., 2013). Međutim, potrebno je provesti daljnja ispitivanja s ciljem povećanja udjela kadmija u biljnom materijalu primjenom specifičnih agronomskih tehnika koje bi poboljšale učinkovitost procesa, kao što je gnojidba, dostupnost vode te dodatak kelata kako bi se povećala dostupnost metala. Također, potrebno je ispitati i razinu akumulacije kadmija kod tala različitih fizikalno-kemijskih svojstava (različiti pH, sadržaja soli i teksture) te sposobnost akumulacije na višestruko kontaminiranom tlu.

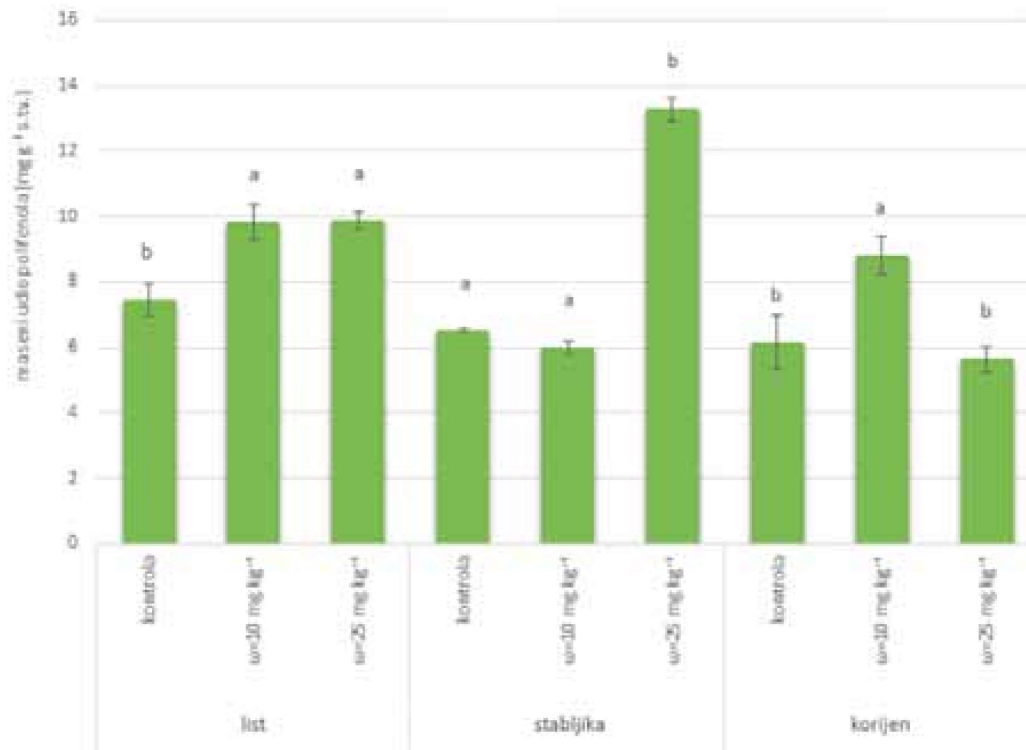
Utjecaj kadmija na udio polifenola kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata*) i kelja (*Brassica oleracea* var. *sabellica*)

U ovom radu određeni su ukupni polifenolni spojevi u pojedinim dijelovima (list, stabljika, korijen) kupusa i kelja kako bi se utvrdila moguća povezanost tih sekundarnih metabolita i odgovora biljke na stres uzrokovan prisutnošću kadmija u tlu. Iz dobivenih rezultata vidljivo da se vrijednosti udjela polifenolnih spojeva kupusa kreću od 7 do 19 mg g⁻¹ suhe tvari. U listu i korijenu kupusa uočeno je statistički značajno povećanje masenog udjela polifenola u odnosu na kontrolu i to u korijenu pri oba udjela kadmija u tlu, dok je povećanje u listu utvrđeno samo pri udjelu od 25 mg kg⁻¹ suhe tvari tla u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, u stabljici kupusa je utvrđeno statistički značajno smanjenje masenog udjela polifenola u prisutnosti kadmija. U svim dijelovima kelja uočeno je statistički značajno povećanje masenog udjela polifenola (slika 4 i 5). U listu je povećanje udjela polifenola utvrđeno pri oba masena udjela kadmija u tlu, u stabljici pri masenom udjelu kadmija od 25 mg kg⁻¹ suhe tvari tla te u korijenu pri masenom udjelu kadmija od 10 mg kg⁻¹ suhe tvari tla u odnosu na kontrolu. Povećanje masenog udjela polifenola povezano je sa povećanjem aktivnosti enzima koji su uključeni u metabolizam polifenolnih spojeva, čime dolazi do *de novo* sinteze polifenola uslijed izloženosti biljke stresu uzrokovanom teškim metalima. Povećanje udjela topljivih polifenola kao što su intermedijari u biosintezi lignina tijekom stresa može se odraziti na tipične promjene u anatomiji stanice kao što su: povećanje izdržljivosti stanične membrane te stvaranje fizičkih barijera čime se stanica štiti od toksičnih učinaka teških metala. Također, kod povećanog udjela polifenola dolazi do uspješnog keliranja s teškim metalima čime se ističe njihovo antioksidativno djelovanje. Povećani udio polifenola zabilježen je i kod drugih biljnih vrsta kao što su *Phaseolus vulgaris* i *Phyllanthus tenellus* (Michalak, 2006).



Slika 4. Maseni udio polifenola u listu, stabljici te korijenu kupusa izraslog u tlu s masenim udjelima kadmija od 0, 10 i 25 mg kg⁻¹ suhe tvari tla

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



Slika 5. Maseni udio polifenola u listu, stabljici te korijenu kelja izraslog u tlu s masenim udjelima kadmija od 0, 10 i 25 mg kg⁻¹ suhe tvari tla

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

Rezultati ovog rada kao i dostupna literatura ukazuju na potencijalnu ulogu polifenola u odgovoru biljke izložene povećanoj količini metala, međutim sami mehanizmi još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Također, razlike u odgovoru između kupusa i kelja ukazuju da su obrambeni mehanizmi biljaka složeni procesi, koji ovise o uvjetima okoline te mogu biti specifični za pojedine biljne vrste. Interakcija između okoline i pojedinih biljnih vrsta čini jedinstveni sustav koji na različite biotičke i abiotičke uvjete reagira pojedinačno, a odgovor mora biti precizno reguliran kako bi biljka pronašla najbolje rješenje za svoj opstanak i reprodukciju.

Zaključak

Provedenim istraživanjem dokazano je da kelj i kupus imaju visoka tolerancija na kadmij. Budući da nisu uočeni vizualni simptomi fitotoksičnosti niti smanjenje prinosa, postoji rizik da povrćari ne dobiju dovoljno rano upozorenje o onečišćenju kadmijem ili visokom sadržaju kadmija u kelju, odnosno kupusu. Kupus i kelj su važne i relativno često korištene namirnice u prehrani stoga je bitna spoznaja kako one mogu akumulirati značajne količine teških metala prilikom rasta na onečišćenom tlu a što može nepovoljno utjecati na zdravlje ljudi i životinja uslijed dugotrajne konzumacije. Kada je riječ o kadmiju, osobito rizičnu populaciju čine djeca, trudnice i dojilje. Mnoge biljke hiperakumulatori se istražuju jer

potrebno znati više i o njihovoj fiziologiji te promjenama primarnog i sekundarnog metabolizma kao posljedicama akumulacije.

Literatura

- Cools, N., De Vos B. (2010) Sampling and Analysis of Soil, Manual Part X. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests, UNECE, ICP Forests, Hamburg, pp 208.
- Cluis, C (2004) Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. *BioTech Journal* 2, 60-67.
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Aviñó, J., Baixauli, C., Ginér, A., Serrano, R., Walker, D.J., Bernal, M.P. (2006) Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environ. Exp. Bot.* 56, 19-27.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., Groneberg, D. A. (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* 1, 22-30.
- Grispen, V. M. J., Nelissen, H. J. M., Verkleij, J. A. C. (2006) Phytoextraction with *Brassica napus* L.: A tool for sustainable management of heavy metal contaminated soils. *Environ. Pollut.* 144, 77-83.
- Jahangir, M., Abdel-Farid, I. B., Choi, Y. H., Verpoorte, R. (2008) Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. *J. Plant. Physiol.* 165, 1429-1437.
- Jakovljević, T., Cvjetko, M., Sedak, M., Đokić, M., Bilandžić, N., Vorkapić-Furač, J., Radojčić Redovniković, I. (2013) Balance of glucosinolates content under Cd stress in two Brassica species. *Plant Physiol. Bioch.* 63, 99-106.
- Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P. A. i Bar-Zvi, D. (2004) Overexpression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell. Environ.* 27, 1459-1468.
- Liu, W., Zhou, Q., An, J., Sun, Y., Liu, R. (2010) Variations in cadmium accumulation among Chinese cabbage cultivars and screening for Cd-safe cultivars. *J. Hazard. Mater.* 173, 737-743.
- Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P., Zerbi, G. (2004) Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environ. Pollut.* 132, 21-27.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 523-530.
- Niu, Z., Sun, L., Sun, T., Li, Y., Wang, H. (2007) Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *J. Environ. Sci.* 19, 961-967.
- Qadir, S., Qureshi, M. I., Javed, S., Abdin, M. Z. (2004) Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress. *Plant Sci.* 167, 1171-1181.
- Rautio, P., Furst, A., Stefan, K., Raitio, H., Bartels, U. (2010) Sampling and Analysis of Needles and Leaves, ICP Forests Manual Part XII. In: Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests, UNECE, ICP Forests, Hamburg, str. 19.
- Romić, M., Romić, D. (1998) Sadržaj olova, kadmija, cinka i bakra u poljoprivrednim tlima Zagreba i okolice. *Agricult. Consp. Sci.* 63, 147-154.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Sun, Y., Zhou Q., Diao C. (2008) Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technol.* 99, 1103-1110.
- Takiguchi, M., Yoshihara, S. (2006) New Aspects of Cadmium as Endocrine Disruptor. *Environ. Sci.* 13, 107-116.
- Tolrá, R., Pongrac, P., Poschenrieder, C., Vogel-Mikuš, K., Regvar, M., Barceló, J. (2006) Distinctive effects of cadmium on glucosinolate profile in Cd hyperaccumulator *Thlaspi praecox* and non-hyperaccumulator *Thlaspi arvense*. *Plant Soil* 288, 333-341.
- Vrbek, B., Pilaš I., Pernar, N., Dubravac, T., Bakšić, D., Medak, J., Jakovljević, T. (2009) Heavy metal in lysimetric solution of pseudogley soils in the Kupa and Česma river areas. *Period. Biol.* 111, 419-426.
- Wu, F., Yang, W., Zhang, J., Zhou, L. (2010) Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoides* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. *J. Hazard. Mater.* 177, 268-273.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffela, P. J. (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339-353.

Original scientific study

The importance and benefits of using the film in the production of vegetables

Abstract

*In this work the effect of cadmium on the growth of kale (*Brassica oleracea* var. *sabauda*) and cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*), distribution of cadmium in certain parts of the plants grown in soil with different concentrations of cadmium and their phytoextraction potential, was investigated. As well as the impact of an increased effect of cadmium content in the soil on polyphenol content, to be able to determine the possible relationship of these secondary metabolites and plant responses to stress caused by the presence of heavy metals in soil. The obtained results could be of particular importance for our region since cabbage and kale are important and relatively frequently used food in our diet and they extremely grow well in our climate in our climate. Their long-term consumption can have adversely effect on the human and animal health.*

Key words: cabbage, cadmium, heavy metal, kale, phytoremediation