

# Modifikacija biopristupačnosti bakra i kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari i saliniteta tla

---

Filipović, Lana

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:157243>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

Lana Filipović

**MODIFIKACIJA  
BIOPRISTUPAČNOSTI BAKRA I  
KADMIJA BILJCI BOBA (*Vicia faba*  
L.) POD UTJECAJEM  
ORGANSKE TVARI I SALINITETA TLA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Lana Filipović

**MODIFICATION OF COPPER AND  
CADMIUM BIOAVAILABILITY TO FABA  
BEAN PLANT (*Vicia faba* L.) AS AFFECTED  
BY SOIL  
ORGANIC MATTER AND SALINITY**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.



Sveučilište u Zagrebu

AGRONOMSKI FAKULTET

LANA FILIPOVIĆ

**MODIFIKACIJA  
BIOPRISTUPAČNOSTI BAKRA I  
KADMIJA BILJCI BOBA (*Vicia faba*  
L.) POD UTJECAJEM  
ORGANSKE TVARI I SALINITETA TLA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof. dr. sc. Davor Romić

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF AGRICULTURE

Lana Filipović

**MODIFICATION OF COPPER AND  
CADMIUM BIOAVAILABILITY TO FABA  
BEAN PLANT (*Vicia faba* L.) AS AFFECTED  
BY SOIL  
ORGANIC MATTER AND SALINITY**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Prof. dr. sc. Davor Romić

Zagreb, 2016.

Bibliografski podaci:

- Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
- Znanstveno polje: Poljoprivreda (agronomija)
- Znanstvena grana: Ekologija i zaštita okoliša
- Institucija: Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za melioracije
- Voditelj doktorskog rada: Prof. dr. sc. Davor Romić
- Broj stranica: 112
- Broj slika: 14
- Broj tablica: 25
- Broj priloga: 0
- Broj literaturnih referenci: 187
- Datum obrane doktorskog rada: 14. 07. 2016.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:  
Izv. prof. dr. sc. Gabrijel Ondrašek, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet  
Prof. dr. sc. Sanja Sikora, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet  
Izv. prof. dr. sc. Helena Grčman, Biotehnički fakultet Sveučilišta u Ljubljani

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p.  
550, 10 000 Zagreb,  
Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10  
000 Zagreb

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 05.04.2016. te odobrena na sjednici Senata  
Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 19.05.2016.

Doktorski rad je obranjen 14. 07. 2016. pred povjerenstvom u sastavu:

Izv. prof. dr. sc. Gabrijel Ondrašek

---

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Prof. dr. sc. Sanja Sikora

---

Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Izv. prof. dr. sc. Helena Grčman

---

Biotehnički fakultet Sveučilišta u Ljubljani

Mentor:

Prof. dr. sc. Davor Romić

Davor Romić rođen je 4. siječnja 1958. godine u Metkoviću. Diplomirao je, magistrirao i doktorirao na Agronomskom fakultetu gdje je vršio dužnosti prodekana za poslovodstvo (1999-2001), predstojnika Zavoda za melioracije (2001-2006) te, u dva mandata, dekana Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2006-2012). U dva mandata bio je član Rektorskog kolegija u širem sastavu (2007-2012) i član Senata Sveučilišta u Zagrebu (2006-2012). Od 2016. vrši dužnost Ministra poljoprivrede Republike Hrvatske.

Kao član istraživačkog tima proveo je šest mjeseci (1985) na međunarodnom projektu Horo-Aleltu u Etiopiji. Završio je poslijediplomske specijalizacije u Bariju, Italija (1990-1991), Haifi, Izrael (1999) te usavršavanje iz područja navodnjavanja na Utah State Universityju, Logan, SAD (2000). Autor je više od 120 znanstvenih radova, od toga je 70 radova zastupljeno i citirano u relevantnim bazama podataka. Autor je četiri knjige od kojih su dvije sveučilišni udžbenici, četiri poglavlja u knjizi stranog izdavača te deset priručnika i 3 monografije.

Voditelj je osam domaćih i pet međunarodnih znanstvenih projekata te suradnik na brojnim domaćim i međunarodnim projektima. Koordinator je projekta FP7-PEOPLE-2012-IOF „*Organics-Metals-Salts Interactions in Food Safety and Environment Protection: Combined Experimental and Modelling Approach*“ te voditelj „Nacionalnog projekta navodnjavanja i gospodarenja poljoprivrednim zemljištem i vodama u RH“, najvećeg infrastrukturnog projekta u poljoprivredi danas. Također, zamjenik je voditelja projekta „Određivanje područja pod utjecajem prirodnih ili drugih specifičnih ograničenja u poljoprivredi s kalkulacijama (LFA)“ te je bio voditelj projekta „Utjecaj poljoprivrede na onečišćenje površinskih i podzemnih voda u Republici Hrvatskoj“ (SAGRA), koji su bili temelj za provedbu programa ruralnog razvoja u RH. Autor je više od 80 stručnih projekata i studija.

Član je Hrvatskog tloznanstvenog društva, dopredsjednik Hrvatskog društva za odvodnju i navodnjavanje, član Odbora za Geokemiju HAZU-a, član Hrvatskog agrometeorološkog društva te član International Society of Soil Science i International Society of Irrigation and Drainage. Dobitnik je mnogih društvenih nagrada i priznanja uključujući i nagradu HAZU za 2013. godinu za područje tehničkih znanosti za biotehnološka postignuća u području melioracije i gospodarenja vodom.

## **Zahvala**

*Ova doktorska disertacija izrađena je na Zavodu za melioracije Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Davora Romića, mentora doktorske disertacije i voditelja projekta MZOŠ „Zaslanjivanje tla - dijagnostika, procesi i utjecaj na biljku“ u sklopu kojeg je disertacija izrađena.*

*Mentoru prof. dr. sc. Davoru Romiću iskreno zahvaljujem na pruženoj prilici, potpori i razumijevanju, kao i velikoj pomoći i podršci tijekom istraživanja i pisanja doktorske disertacije. Zahvalna sam što je vjerovao u mene.*

*Izv. prof. dr. sc. Mariji Romić zahvaljujem na nesebičnoj pomoći kad god je bila potrebna te na korisnim savjetima koji su imali važnu ulogu kako u mom cjelokupnom znanstvenom radu, tako i pri izradi ove disertacije.*

*Zahvaljujem članovima povjerenstva izv. prof. dr. sc. Gabrijelu Ondrašeku, prof. dr. sc. Sanji Sikori i izv. prof. dr. sc. Heleni Grčman koji su svojim znanjem i trudom uvelike doprinijeli kvaliteti ovoga rada.*

*Od srca zahvaljujem svim bivšim i sadašnjim kolegama sa Zavoda za melioracije. Neću nikoga izdvojiti, ne bi bilo pošteno, baš svima dugujem zahvalnost.*

*Zahvaljujem djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i Zavoda za povrćarstvo.*

*Zahvaljujem prijatelju Damiru Prpiću, dipl. hisp. i dipl. ent. na lekturi rada.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, a posebno roditeljima.*

*Najveću zahvalnost ipak dugujem svom suprugu dr. sc. Vilimu Filipoviću.*

**Lana Filipović**

## SAŽETAK

Određivanje mobilnosti i biopristupačnosti metala u tlu predstavlja osnovu za procjenu rizika od njihovog potencijalnog uključivanja u hranidbeni lanac. Stoga je cilj rada bio definirati mehanizme kojima organska tvar (OT) i salinitet tla rezultiraju promjenama u mobilnosti i biopristupačnosti bakra (Cu) i kadmija (Cd) u tlu. Pretpostavljeno je da će povećanje OT i zaslanjenosti tla utjecati na mobilnost/biopristupačnost Cu i Cd te mikrobiološku dehidrogenaznu aktivnost (DHA) u tlu.

Istraživanje je obuhvatilo 2 pokusa koji su provedeni u kontroliranim uvjetima plastenika na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, s bobom (*Vicia faba* L. cv. Aguadulce) kao test kulturom. Eksperimentalni dizajn pokusa bio je split-split-plot u 3 ponavljanja. Glavni faktor bio je sadržaj OT u 2 razine: tlo uzeto iz područja Donje Neretve (OT<sub>1</sub>) te isto tlo miješano s tresetom u omjeru 4:1 (OT<sub>2</sub>). Podfaktor bio je NaCl salinitet u 3 razine (0, 50 i 100 mM), a podpodfaktor kontaminacija tla s 250 i 500 mg kg<sup>-1</sup> Cu (pokus 1), odnosno 5 i 10 mg kg<sup>-1</sup> Cd (pokus 2) i kontrolna (nekontaminirana) varijanta.

Rezultati istraživanja ukazuju da je OT jedna od najznačajnijih pedovarijabli koje utječu na mobilnost/biopristupačnost istraživanih metala u tlu. Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> smanjio je biopristupačnost Cu u tlu procesima sorpcije i kompleksacije s OT (ukupna koncentracija Cu u tlu povećana je za 5 %, dok je koncentracija Cu u mahuni boba smanjena za 14 %). Rezultati upućuju i na smanjenu biopristupačnost Cu u uvjetima NaCl saliniteta i/ili smanjeno primanje Cu u test kulturu iz zaslanjene rizosfere. Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> i posljedično povećanje koncentracije DOC-a u otopini tla, smanjuje aktivnost slobodnog Cd<sup>2+</sup>, a time i njegovo primanje u korijen (koncentracija Cd u listu boba smanjena je za 28 %, u mahuni za 40 % te u sjemenu za 20 %). Primjena NaCl nije rezultirala povećanom biopristupačnošću Cd, nego samo njegovom redistribucijom unutar krute faze tla. Kontaminacija tla Cu i Cd nije utjecala na fotosintetske pokazatelje lista boba, upućujući na zaključak da nije utjecala na produktivnost biljaka boba, iako je indeks sadržaja klorofila (CCI) smanjen za 4 % s Cd<sub>10</sub> tretmanom. Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> povećao je za 30-65 %, a NaCl salinitet smanjio za 28-29 % pri NaCl<sub>100</sub> tretmanu dehidrogenaznu aktivnost (DHA) u tlu. Kontaminacija tla Cu smanjila je DHA za 50 % pri Cu<sub>500</sub> tretmanu. Kontaminacija tla Cd nije utjecala na DHA, ali modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan upućuje na mogućnost da kompleksi Cd i klorida (CdCl<sub>n</sub><sup>2-n</sup>) imaju izraženiji inhibitorni učinak na DHA u tlu.

**Ključne riječi:** sorpcija, kompleksacija, mobilnost Cu i Cd, NaCl, dehidrogenazna aktivnost

# **Modification of copper and cadmium bioavailability to faba bean plant (*Vicia faba* L.) as affected by soil organic matter and salinity**

## **ABSTRACT**

The aim of this research was to study the mechanisms by which soil organic matter (SOM) and increased soil salinity affect copper (Cu) and cadmium (Cd) mobility in soil, as well as the importance of afore mentioned mechanisms for their bioavailability in soil. Therefore, to study the Cu and Cd bioavailability in soil, two pot experiments were conducted in a greenhouse at the experimental station Maksimir of the Faculty of Agriculture University of Zagreb (Croatia). In a half of both experiments alluvial soil from cultivated land in a Neretva valley (Croatian Mediterranean region) (OT<sub>1</sub>) was used, and in the other half the same alluvial soil with added peat to increase SOM content (OT<sub>2</sub>). The soil (OT<sub>1</sub> and OT<sub>2</sub>) was spiked with Cu and Cd at two levels: 250 and 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>, and 5 and 10 mg Cd kg<sup>-1</sup>. The same treatment with NaCl salinity was applied in both experiments: control, 50 and 100 mM NaCl. Faba bean (*Vicia faba* L. cv. Aguadulce) was used as a test plant.

Copper solubility and therefore bioavailability in soil is lowered by sorption and complexation processes with SOM. Visual MINTEQ speciation revealed that the Cu in the soil solution is mostly present as Cu-dissolved organic carbon (DOC) complex. The proportion of other Cu species in the soil solution rise with increasing Cu concentration, but only if SOM level is not increased. Faba bean uptake of Cu increased with raising soil Cu concentration, although plants may have restricted the translocation of Cu, behaving like metal excluder plants. However, application of SOM decreased plant tissue Cu concentration, yet significantly only for faba bean pod. Nevertheless, results suggest that Cu phytoavailability may be affected by the increase in SOM, and that faba bean pod tissue provides a best (shoots) reflection of bioavailable Cu in soil. The possibility of reduced Cu mobility in salinized soils and/or reduced plant uptake of Cu from a saline rhizosphere is also suggested by obtained results. Application of salts either lowered Cu solubility in soil or reduced plant uptake by excessive salts in the rhizosphere. Then again, plant adaptive mechanisms may modify Cu phytoavailability. Results also point to a possible malfunction of faba bean root plasma membrane under Cu toxicity conditions.

This study confirms that Cd is highly mobile between different soil fractions, depending on its total concentration and the presence of inorganic (chlorides) and organic (humics) ligands in surrounding media. Cd speciation was greatly affected by all investigated trial factors, i.e. soil

Cd contamination enhanced the proportion of the free  $\text{Cd}^{2+}$ , raised SOM content induced Cd-organo-complexation with DOC, and increased soil salinity promoted the formation of  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  complexes in soil solution, all of which consequently modified the mobility of Cd in soil. Soil Cd contamination led to an increased plant Cd uptake. The addition of SOM caused a decreased Cd availability to plants, possibly because of the redistribution of Cd to a less available organically-bound Cd fraction. However, bean plants have uptaken the highest amount of Cd in a non-saline environment, indicating that, if soil adsorption capacity for Cd has not been exceeded, increased Cd mobility in soil does not have to result in its increased phytoavailability, than only in Cd transfer between soil solid phases. Additionally, leaf photosynthetic parameters were not affected by soil Cu and Cd contamination, except for chlorophyll content index (CCI) which decreased with soil Cd contamination.

Results show that raised SOM can increase soil dehydrogenase activity (DHA), whilst increased soil salinity decreases DHA. Although soil Cd contamination did not significantly affect DHA at studied metal concentrations, the results suggested that  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  has a higher inhibitory effect on DHA than other Cd chemical species in soil solution. DHA decreased with soil Cu contamination, and was even reduced in half at the total soil concentration of  $500 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ . Results also suggest similar inhibitory effect of all Cu species in soil solution on DHA, but also the possibility that DHA may affect Cu soil availability by reducing the formation of metal-DOM complexes in the soil solution.

**Keywords:** sorption, complexation, Cu and Cd mobility, NaCl, soil dehydrogenase activity

## SADRŽAJ

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD.....                                                                           | 1  |
| 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja.....                                              | 3  |
| 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....                                              | 4  |
| 2.1. Biopristupačnost metala u tlu .....                                               | 4  |
| 2.2. Organska tvar u tlu.....                                                          | 5  |
| 2.2.1. Značajke i uloga organske tvari u tlu .....                                     | 5  |
| 2.2.2. Utjecaj organske tvari na biopristupačnost metala u tlu.....                    | 8  |
| 2.3. Salinitet tla .....                                                               | 13 |
| 2.3.1. Uzroci i posljedice zaslanjivanja tala .....                                    | 13 |
| 2.3.2. Posljedice zaslanjivanja tala na biljke.....                                    | 16 |
| 2.3.3. Utjecaj saliniteta tla na biopristupačnost metala u tlu .....                   | 18 |
| 2.4. Modeliranje kemijske specijacije metala u otopini tla.....                        | 20 |
| 2.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu .....                                        | 22 |
| 2.6. Bakar i kadmij u sustavu tlo - biljka .....                                       | 23 |
| 2.6.1. Primanje, translokacija i interakcije bakra s drugim elementima u biljci .....  | 23 |
| 2.6.2. Primanje, translokacija i interakcije kadmija s drugim elementima u biljci..... | 25 |
| 3. MATERIJAL I METODE RADA.....                                                        | 27 |
| 3.1. Postavljanje pokusa .....                                                         | 27 |
| 3.2. Primijenjeni tretmani i eksperimentalni dizajn .....                              | 29 |
| 3.3. Mjerenje fotosintetskih pokazatelja lista .....                                   | 32 |
| 3.4. Uzorkovanje tla .....                                                             | 33 |
| 3.5. Uzorkovanje biljnog materijala .....                                              | 33 |
| 3.6. Analize tla .....                                                                 | 33 |
| 3.7. Analize biljnog materijala .....                                                  | 34 |
| 3.8. Modeliranje kemijske specijacije bakra i kadmija u otopini tla.....               | 34 |
| 3.9. Statistička analiza podataka.....                                                 | 35 |
| 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....                                                        | 37 |
| 4.1. Fizikalno-kemijske značajke tala korištenih u pokusima .....                      | 37 |
| 4.2. Bakar .....                                                                       | 37 |
| 4.2.1. Elementarni sastav tla.....                                                     | 37 |
| 4.2.2. Ionski sastav saturacijskog vodnog ekstrakta tla.....                           | 40 |
| 4.2.3. Ekstrakcija bakra iz tla s 0,01 M CaCl <sub>2</sub> .....                       | 42 |
| 4.2.4. Modeliranje kemijske specijacije bakra u otopini tla .....                      | 43 |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu .....                                                                                        | 44  |
| 4.2.6. Fotosintetski pokazatelji lista boba.....                                                                                         | 46  |
| 4.2.7. Elementarni sastav lista boba .....                                                                                               | 49  |
| 4.2.8. Elementarni sastav mahune boba.....                                                                                               | 51  |
| 4.2.9. Elementarni sastav sjemena boba .....                                                                                             | 53  |
| 4.2.10. Korelacije između ukupne koncentracije Cu u tlu, koncentracije Cu u 0,01 M<br>CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla i tkivu boba ..... | 55  |
| 4.3. Kadmij.....                                                                                                                         | 56  |
| 4.3.1. Elementarni sastav tla.....                                                                                                       | 56  |
| 4.3.2. Ionski sastav saturacijskog vodnog ekstrakta tla.....                                                                             | 58  |
| 4.3.3. Ekstrakcija kadmija iz tla s 0,01 M CaCl <sub>2</sub> .....                                                                       | 60  |
| 4.3.4. Modeliranje kemijske specijacije kadmija u otopini tla .....                                                                      | 61  |
| 4.3.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu .....                                                                                        | 63  |
| 4.3.6. Fotosintetski pokazatelji lista boba.....                                                                                         | 65  |
| 4.3.7. Elementarni sastav lista boba .....                                                                                               | 68  |
| 4.3.8. Elementarni sastav mahune boba.....                                                                                               | 70  |
| 4.3.9. Elementarni sastav sjemena boba .....                                                                                             | 72  |
| 4.3.10. Korelacije između ukupne koncentracije Cd u tlu, koncentracije Cd u 0,01 M<br>CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla i tkivu boba ..... | 74  |
| 5. RASPRAVA.....                                                                                                                         | 75  |
| 5.1. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem organske<br>tvari i saliniteta tla .....     | 75  |
| 5.1.1. Biopristupačnost bakra biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) u tlu kontaminiranom bakrom..                                          | 75  |
| 5.1.2. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem<br>organske tvari u tlu .....              | 79  |
| 5.1.3. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem<br>saliniteta tla.....                     | 81  |
| 5.2. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem<br>organske tvari i saliniteta tla.....    | 85  |
| 5.2.1. Biopristupačnost kadmija biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) u tlu kontaminiranom<br>kadmijem .....                               | 85  |
| 5.2.2. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem<br>organske tvari u tlu .....            | 89  |
| 5.2.3. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba ( <i>Vicia faba</i> L.) pod utjecajem<br>saliniteta tla.....                   | 90  |
| 6. ZAKLJUČCI.....                                                                                                                        | 93  |
| 7. LITERATURA .....                                                                                                                      | 96  |
| ŽIVOTOPIS .....                                                                                                                          | 112 |

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

|             |                                                                             |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>ABA</b>  | Apscizinska kiselina (engl. Absciscic acid)                                 |
| <b>CCI</b>  | Indeks sadržaja klorofila (engl. Chlorophyll content Index)                 |
| <b>CEC</b>  | Kapacitet zamjene kationa (engl. Cation exchange capacity)                  |
| <b>DHA</b>  | Dehidrogenazna aktivnost (engl. Dehydrogenase activity)                     |
| <b>DOC</b>  | Otopljeni organski ugljik (engl. Dissolved organic carbon)                  |
| <b>DOM</b>  | Otopljena organska tvar (engl. Dissolved organic matter)                    |
| <b>ESP</b>  | Udio zamjenjivog natrija (engl. Exchangeable Sodium Percentage)             |
| <b>FA</b>   | Fulvo kiseline (engl. Fulvic acid)                                          |
| <b>HA</b>   | Huminske kiseline (engl. Humic acid)                                        |
| <b>HSAB</b> | Jaka-slaba kiselina-baza princip (engl. Hard-Soft Acid-Base)                |
| <b>NICA</b> | Ne-idealna kompetitivna adsorpcija (engl. Non-Ideal Competitive Adsorption) |
| <b>OMF</b>  | Organo-mineralna frakcija (engl. Organo-mineral fraction)                   |
| <b>OT</b>   | Organska tvar (engl. Organic matter)                                        |
| <b>PrGI</b> | Praškasto glinasta ilovača                                                  |
| <b>ROS</b>  | Slobodni radikali (engl. Reactive oxygen species)                           |
| <b>SAR</b>  | Udio adsorbiranog natrija (engl. Sodium adsorption ratio)                   |
| <b>TPF</b>  | Trifenilformazan                                                            |
| <b>TTC</b>  | Trifenil tetrazolijev klorid                                                |
| <b>OC</b>   | Organski ugljik (engl. Organic carbon)                                      |

## POPIS TABLICA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 1. Fizikalne, kemijske i biološke značajke tla na koje utječe organska tvar u tlu (prilagođeno prema Baldock i Nelson, 2000) .....                                                                                                                                                                                                                      | 7  |
| Tablica 2. Klase zaslanjenosti tla s obzirom na vrijednosti E.C. tla i mogućeg utjecaja na biljku (prilagođeno prema Richards, 1954) .....                                                                                                                                                                                                                      | 15 |
| Tablica 3. Značajke treseta korištenog u pokusu .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 28 |
| Tablica 4. Značajke gnojiva korištenog u pokusu .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 29 |
| Tablica 5. Ukupna koncentracija bakra i kadmija ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) u tlu pripremljenom za pokus ( $\text{OT}_1$ i $\text{OT}_2$ ), a prije kontaminacije. ....                                                                                                                                                                                             | 30 |
| Tablica 6. Ukupna koncentracija Cu i Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) nakon kontaminacije, a prije sadnje kulture .....                                                                                                                                                                                                                                               | 30 |
| Tablica 7. Sadržaj organskog ugljika ( $\text{C}_{\text{org}}$ ) te udio (%) humusa, udio kalcijeva karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) i granulometrijski sastav (%) tala korištenih u pokusima .....                                                                                                                                                                | 37 |
| Tablica 8. Utjecaj organske tvari u tlu ( $\text{OT}_1$ i $\text{OT}_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom ( $250$ i $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i njihovih interakcija na pH, E.C. i ukupne koncentracije elemenata tla .....                                                                                                                   | 39 |
| Tablica 9. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $\text{OT}_1$ i $\text{OT}_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom ( $250$ i $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i njihovih interakcija na koncentracije elemenata u saturacijskom vodnom ekstraktu tla .....                                                                                             | 41 |
| Tablica 10. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $\text{OT}_1$ i $\text{OT}_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM) i kontaminacije tla bakrom ( $250$ i $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na procjenu kemijske specijacije Cu u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan .....                                                                      | 43 |
| Tablica 11. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $\text{OT}_1$ i $\text{OT}_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom ( $250$ i $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i njihovih interakcija na DHA u tlu i koncentraciju kemijskih oblika Cu u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ ..... | 44 |
| Tablica 12. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cu u tlu, koncentraciju Cu u 0,01 M $\text{CaCl}_2$ ekstraktu tla, koncentraciju kemijskih oblika Cu u otopini tla                                                                                                                                                                     |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ i DHA u tlu .....                                                                                                                                                                                                                                | 45 |
| Tablica 13. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u listu boba .....                                                                                                                | 50 |
| Tablica 14. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u mahuni boba .....                                                                                                               | 52 |
| Tablica 15. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u sjemenu boba .....                                                                                                              | 54 |
| Tablica 16. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cu u tlu, koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentraciju Cu u listu, mahuni i sjemenu boba .....                                                                                                                                         | 55 |
| Tablica 17. Utjecaj organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na pH, E.C. i ukupne koncentracije elemenata tla .....                                                                                                                  | 57 |
| Tablica 18. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na koncentracije elemenata u saturacijskom vodnom ekstraktu tla .....                                                                                            | 59 |
| Tablica 19. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM) i kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) na procjenu kemijske specijacije Cd u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan .....                                                                      | 62 |
| Tablica 20. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na DHA u tlu i koncentraciju kemijskih oblika Cd u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ ..... | 63 |
| Tablica 21. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cd u tlu, koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla, koncentraciju kemijskih oblika Cd u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ i DHA u tlu .....                                  | 64 |

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 22. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u listu boba .....   | 69 |
| Tablica 23. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u mahuni boba .....  | 71 |
| Tablica 24. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u sjemenu boba ..... | 73 |
| Tablica 25. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cd u tlu, koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentraciju Cd u listu, mahuni i sjemenu boba .....                           | 74 |

## POPIS SLIKA

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Shematski prikaz organskih komponenti u tlu (prilagođeno prema Nieder i Benbi, 2008).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 6  |
| Slika 2. Shematski prikaz ovisnosti koncentracije većine slobodnih metalnih kationa ( $M^{2+}$ ) u otopini tla i metala kompleksiranog s organskom tvari ( $M_{org}$ ) o reakciji (pH) otopine tla pri povećanom udjelu organske tvari u tlu (prilagođeno prema Ondrašek, 2015) .....                                                                                               | 12 |
| Slika 3. Tla u svijetu zahvaćena problemom zaslanjivanja i/ili alkalizacije (prilagođeno prema Wicke i sur., 2011) .....                                                                                                                                                                                                                                                            | 14 |
| Slika 4. Simptomi stresa soli na listovima boba pri navodnjavanju zaslanjenom vodom (50 i 100 mM NaCl) (fotografija: Filipović, L.).....                                                                                                                                                                                                                                            | 16 |
| Slika 5. Glavni izbornik programa Visual MINTEQ (version 3.0) za određivanje kemijske ravnoteže .....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 21 |
| Slika 6. Poremećaji koje izaziva primanje povećanih koncentracija metala iz otopine tla u biljke (prilagođeno prema Luo i sur., 2014) .....                                                                                                                                                                                                                                         | 25 |
| Slika 7. Lokacija na području Donje Neretve s koje je uzeto tlo korišteno u pokusima (izvor karte: Romić i sur., 2010; fotografija: Filipović, L.) .....                                                                                                                                                                                                                            | 27 |
| Slika 8. Priprema za pokus i presađivanje presadnica boba (fotografija: Filipović, L.) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 28 |
| Slika 9. Shema postavljenih pokusa s glavnim faktorom udio organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), podfaktorom salinitet ( $NaCl_0$ , $NaCl_{50}$ i $NaCl_{100}$ ) i podpodfaktorom ukupna koncentracija Cu / Cd u tlu ( $Cu_0$ , $Cu_{250}$ i $Cu_{500}$ ; odnosno $Cd_0$ , $Cd_5$ i $Cd_{10}$ ). .....                                                                          | 31 |
| Slika 10. Faza nalijevanja mahuna u kojoj su mjereni fotosintetski pokazatelji lista boba (fotografija: Filipović, L.) .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 32 |
| Slika 11. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl <sub>2</sub> ekstraktu tla .....                                                                                                                                       | 42 |
| Slika 12. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$ i $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg <sup>-1</sup> ) i njihovih interakcija na fotosintetske pokazatelje lista boba: a) koncentraciju intercelularnog CO <sub>2</sub> lista ( $C_i$ , μmol mol <sup>-1</sup> ), b) provodljivost puči ( $g_s$ , mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> |    |

s<sup>-1</sup>), c) transpiraciju ( $E$ , mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), d) intenzitet fotosinteze ( $A$ , μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) i e) indeks sadržaja klorofila (CCI).....46, 47, 48

Slika 13. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla .....60

Slika 14. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na fotosintetske pokazatelje lista boba: a) koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista ( $C_i$ , μmol mol<sup>-1</sup>), b) provodljivost puči ( $g_s$ , mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), c) transpiraciju ( $E$ , mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), d) intenzitet fotosinteze ( $A$ , μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) i e) indeks sadržaja klorofila (CCI).....65, 66, 67

# 1. UVOD

Održivo gospodarenje tlima sve se češće suočava s antropogenom degradacijom kvalitete tala kao što je smanjenje udjela organske tvari u tlu, povećanje stupnja zasljenjenosti tala te onečišćenje tala teškim metalima na globalnoj razini. Međutim, iako onečišćenje tala teškim metalima predstavlja rastući problem u svijetu, zbog široke primjene u različitim ljudskim djelatnostima (industrija, poljoprivreda, rudarstvo) smanjenje njihove emisije u okoliš nije realno očekivati u skoroj budućnosti. Metali su prirodno prisutni u tlima i matičnom supstratu iz kojih nastaju, međutim antropogeni unos predstavlja dodatno opterećenje na tla zbog narušene bilance njihovog kruženja u okolišu. Problem toksičnosti metala izravno je povezan s njihovom koncentracijom, ali samo taj podatak još uvijek nije dovoljan za procjenu rizika od uključivanja metala u hranidbeni lanac (Reichman, 2002; Allen i Janssen, 2006; Maderova i sur., 2011). Pristupačna frakcija metala u tlu predstavlja udio u ukupnoj koncentraciji koji je dostupan ili relativno lako može postati dostupan organizmima. Biopristupačna frakcija metala u tlu predstavlja udio u pristupačnoj frakciji koji je uistinu u određenom trenutku dostupan za prelazak preko stanične membrane, odnosno primanje u neki organizam (Semple i sur., 2004) te isključuje onaj udio frakcije metala koji lako može postati dostupan (a obuhvaćen je pristupačnom frakcijom). Univerzalno kemijsko ekstrakcijsko sredstvo za određivanje biopristupačne frakcije metala u tlu još uvijek nije definirano u literaturi te se za takve procjene koristi multidisciplinarni pristup koji uključuje fizikalne, kemijske i biološke značajke tla, kemijske značajke metala, značajke organizma od interesa te njihove interakcije. Sustav tlo-biljka dinamičan je, međuovisan i podložan promjenama, gdje se utjecaj na jednu sastavnicu, kao što je npr. tlo, nužno reflektira na ostale komponente (biljka, mikroorganizmi). Za konačnu procjenu biopristupačnosti nužno je utvrditi i koncentracije metala koje se uistinu nalaze u organizmu od interesa.

Metali kojima dosada nije utvrđena esencijalnost, kao što su kadmij, olovo i živa, iznimno su toksični već pri niskim koncentracijama. Međutim, i esencijalni metali poput bakra i cinka mogu postati toksični pri povećanim koncentracijama svoje pristupačne forme. Bakar (Cu) je sastavni dio biljnih proteina, plastocijanina i enzima te sudjeluje u transportu elektrona u kloroplastima (Hochmuth i sur., 1991). Iako je kao mikrohranivo u nižim koncentracijama neophodan za normalan rast i razvoj biljaka, u visokim koncentracijama također može imati toksičan učinak na biljke. Povećane koncentracije Cu u tlima mogu biti geogenog, ali i antropogenog porijekla. Poljoprivreda ima znatnog udjela kao izvor onečišćenja tala Cu zbog učestale primjene fungicida na bazi Cu, mineralnih i organskih gnojiva te otpadnih muljeva.

Za razliku od Cu, kadmij (Cd) zasad nema poznatu fitofiziološku ulogu te se kao takav smatra toksičnim čak i u niskim koncentracijama. Povećane koncentracije Cd u okolišu posljedica su sve intenzivnije antropogene emisije koja je započela industrijalizacijom (Alloway, 1990) te se nastavila procesima urbanizacije i agrarizacije (fosfatna gnojiva).

Metali u tlima mogu biti vezani na čvrstu tvar, precipitirati u obliku soli, ili se mogu nalaziti u otopini tla. U kojem će se obliku metal nalaziti u tlu ovisi, osim o ukupnoj koncentraciji metala, i o značajkama tla (pH, udio organske tvari i gline, prisutnost drugih iona-anorganskih liganada) te uvjetima okoliša (temperatura, vlaga u tlu). Kemijska specijacija metala kojom se utvrđuje kemijski oblik u kojemu se metal zapravo nalazi u otopini tla važan je u istraživanju pristupačnosti metala, jer će upravo kemijski oblik metala odrediti njegovu mobilnost u tlu, a time i potencijalnu biopristupačnost (Adriano i sur., 2004). Među brojnim fizikalno-kemijskim čimbenicima koji utječu na pristupačnosti metala u tlu, posebnu ulogu imaju organska tvar (OT) i salinitet tla. Organska tvar u tlu ima dvojaku ulogu u pristupačnosti metala: (i) čvrsta OT u tlu veže metale tvoreći metal-OT komplekse i na taj način potencijalno smanjuje njihovu pristupačnost te (ii) otopljena OT stvara komplekse s metalima i povećava njihovu mobilnost jer su u takvom obliku metali slabije vezani na čestice tla i lakše se otpuštaju u otopinu tla (Kirchmann i Eriksson, 2011). Procesima sorpcije i kompleksacije s OT mobilnost Cu u tlu može se značajno smanjiti, čime se reducira i njegova potencijalna toksičnost za organizme. Cu stvara vrlo stabilne organske komplekse u tlu (Liao 2000; Romić, 2012), što smanjuje njegovo otpuštanje u otopinu tla, a time i pristupačnost organizmima. I mobilnost Cd u tlu također može biti reducirana procesima sorpcije i kompleksacije s OT. Uz navedeno, stvaranjem Cd-organskih kompleksa s otopljenom OT smanjuje se koncentracija  $Cd^{2+}$  u otopini tla koji se smatra najpristupačnijim oblikom za primanje u biljku (Ghallab i Usman, 2007). Međutim, poznato je da je salinitet tla jedan od važnijih čimbenika koji mogu utjecati na pristupačnost Cd u tlu (McLaughlin i sur., 1994; Smolders i sur., 1998; Weggler i sur., 2004). Sekundarno zaslanjivanje tala koje se javlja kao posljedica neodgovarajućeg navodnjavanja i/ili navodnjavanja vodom lošije kvalitete, jedan je od najvažnijih okolišnih faktora koji limitiraju poljoprivrednu proizvodnju (Romić i sur., 2008). Procjenjuje se da je čak do 50% navodnjavanih poljoprivrednih površina u svijetu zahvaćeno određenim stupnjem salinizacije (Pitman i Laüchli, 2002), uz vrlo izglednu tendenciju rasta u budućnosti (Tejera i sur., 2005). Osim izravnog štetnog utjecaja na kvalitetu tla, povećanje stupnja zaslanjenosti tala utječe i na pristupačnost metala u tlu, a poglavito Cd, jer prisutnost određenih anorganskih liganada kao što su kloridi, favorizira topljivost i mobilnost Cd u tlu (Ondrašek i sur., 2009).

Bob (*Vicia faba* L.) je poljoprivredna kultura koja je relativno tolerantna na povećanu zaslanjenost tla (Matijević i sur., 2012), zbog čega je i odabrana kao prikladna testna kultura

u ovome istraživanju. Nadalje, brojne studije su također koristile bob kao testnu kulturu u istraživanjima toksičnog utjecaja Cu i Cd (Probst i sur., 2009; Foltête i sur., 2012) te će ova disertacija nastojati proširiti prethodne spoznaje o fitotoksičnosti metala s mehanizmima i procesima u tlu koji su uvjetovali njihovo primanje u biljku.

Osim biljaka, za procjenu toksičnosti metala u tlu mogu se koristiti i drugi biološki pokazatelji, kao što je primjerice enzimatska aktivnost u tlu (Chaperon i Sauvé, 2008). Enzimi su vrlo osjetljivi na promjene u okolišu te stoga promjene u enzimatskoj aktivnosti u tlu mogu brzo reflektirati negativne utjecaje na okoliš, kao što je kontaminacija tla metalima. S obzirom na to da su dehidrogenaze enzimi koji se ne akumuliraju u tlu izvanstanično, dehidrogenazna aktivnost (engl. Dehydrogenase Activity - DHA) često služi kao indikator ukupne mikrobiološke aktivnosti u tlu, odnosno kao mjerilo opće plodnosti tla. Dosadašnja su istraživanja pokazala da Cu i Cd mogu utjecati na aktivnost dehidrogenaza u tlu, međutim kakav će taj utjecaj biti uvelike ovisi o koncentraciji, kao i o ionskoj vrsti metala (Chaperon i Sauvé, 2008), što će se također testirati u ovoj studiji.

## 1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

**Hipoteze** istraživanja su:

Da će povećani udio organske tvari u tlu i povećan stupanj zasljenjenosti tla značajno utjecati na mobilnost bakra i kadmija u tlu te pristupačnost bakra i kadmija biljci.

**Ciljevi** istraživanja su utvrditi utjecaj organske tvari u tlu, stupnja zasljenjenosti tla i kontaminacije tla bakrom i kadmijem na:

1. Ukupnu koncentraciju metala u tlu, koncentraciju pristupačnog metala u tlu, specijaciju metala u otopini tla te enzimatsku (dehidrogenaznu) aktivnost u tlu;
2. Primanje bakra i kadmija u biljku (*Vicia faba* L.) te njihovu akumulaciju u nadzemnim biljnim organima.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Biopristupačnost metala u tlu

Kada govorimo o biopristupačnoj frakciji metala u poljoprivrednim tlima, logično je za pretpostaviti da će značajni organizmi od interesa biti poljoprivredne kulture uzgojene na poljoprivrednim tlima kontaminiranim metalima. Konzumacija biljaka koje rastu na metalima kontaminiranim tlima jedan je od važnijih načina povećanja koncentracije metala u životinjskom i ljudskom organizmu (Romić, 2012) te je stoga primanje metala u biljku zapravo granica ulaska metala iz terestričkog okoliša u hranidbeni lanac (Ehlken i Kirchner 2002). Smatra se da relativno slabija ekstrakcijska sredstva poput 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  daju najbolje rezultate za procjenu transfera metala iz tla u biljke (Brun i sur., 1998; Romić i sur., 2004) jer osim vodotopljive frakcije metala, ekstrahiraju i frakciju metala koja je slabo vezana u tlu, ali se ipak smatra dostupnom biljkama (Ivezić i sur., i navedene reference, 2013). Međutim, kod procjene fitopristupačnosti metala potrebno je uzeti u obzir da različite biljne vrste mogu imati različite mehanizme adaptacije na povećane koncentracije metala u tlu (Reichman, 2002) te da podatak o koncentraciji metala u biljnom tkivu može biti nešto modificiran odgovorom biljke na toksične koncentracije metala u tlu. Naime, nerijetko se metali u pojedinim biljnim organima mogu akumulirati u relativno visokim koncentracijama, a bez vidljivih simptoma fitotoksičnosti (Wagner, 1993). Nadalje, logično je za pretpostaviti da ovisno o ostalim uvjetima u okolišu, biljnoj vrsti i kultivaru, ali i fiziološkom stadiju razvoja biljke (vegetativni, generativni) pa čak i biljnom organu, odgovor biljke na povećane koncentracije metala u tlu može biti različit. Isto tako, već je prepoznata i mogućnost da više od jednog mehanizma može biti uključeno u adaptaciju biljke na kontaminaciju tla metalima, kao i da jedan mehanizam može djelovati na više okolišnih stresora (kontaminacija tla metalima, povećan stupanj zaslanjenosti tala, izlaganje suši) (Reichman, 2002). Općenito bi se moglo reći da što je biljka bolje prilagođena na jedan okolišni stresor (npr. povećan stupanj zaslanjenosti tala), može se očekivati i bolja adaptacija na neki drugi okolišni stresor (npr. povećane koncentracije metala u tlu), što je i sugerirano u već postojećim istraživanjima (Chiu i sur., 1995; Lefèvre i sur., 2008).

S obzirom na to da biljke primaju hraniva iz otopine tla, najvažniji kemijski procesi koji utječu na pristupačnost metala u tlima su oni koji se odnose na adsorpciju metala iz otopine tla na čvrstu fazu tla. Navedeni procesi kontroliraju koncentracije metalnih iona i njihovih

kompleksa u otopini tla te zbog navedenog imaju veliki utjecaj na njihovo primanje u korijen. Tlo, zahvaljujući svojoj izuzetnoj mogućnosti da zadrži metalne ione kroz razne mehanizme sorpcije, može djelovati kao filter između izvora onečišćenja i organizama u tlu, odnosno smanjiti njihovu pristupačnost, no izmjena uvjeta u tlu može vrlo brzo rezultirati otpuštanjem metala u otopinu tla, uzrokujući njihovo povećano primanje u organizme (Bakić, 2014). Nekoliko različitih mehanizama može biti uključeno u adsorpciju metalnih iona, uključujući kationsku zamjenu (nespecifičnu adsorpciju), specifičnu adsorpciju, organsku kompleksaciju i koprecipitaciju (Alloway, 1990). Međutim, ako uzmemo u obzir da su čvrsta faza tla, otopina tla i korijen biljke u neprestanoj interakciji koja rezultira izmjenom procesa koji se međusobno uvjetuju i/ili nadovezuju, često je teško biti precizan koji je točno proces (samostalno) odgovoran za pristupačnost nekog metala u određenom tlu, odnosno statičkom reakcijom u određenom trenutku opisati navedeni izrazito dinamičan sustav tlo - biljka.

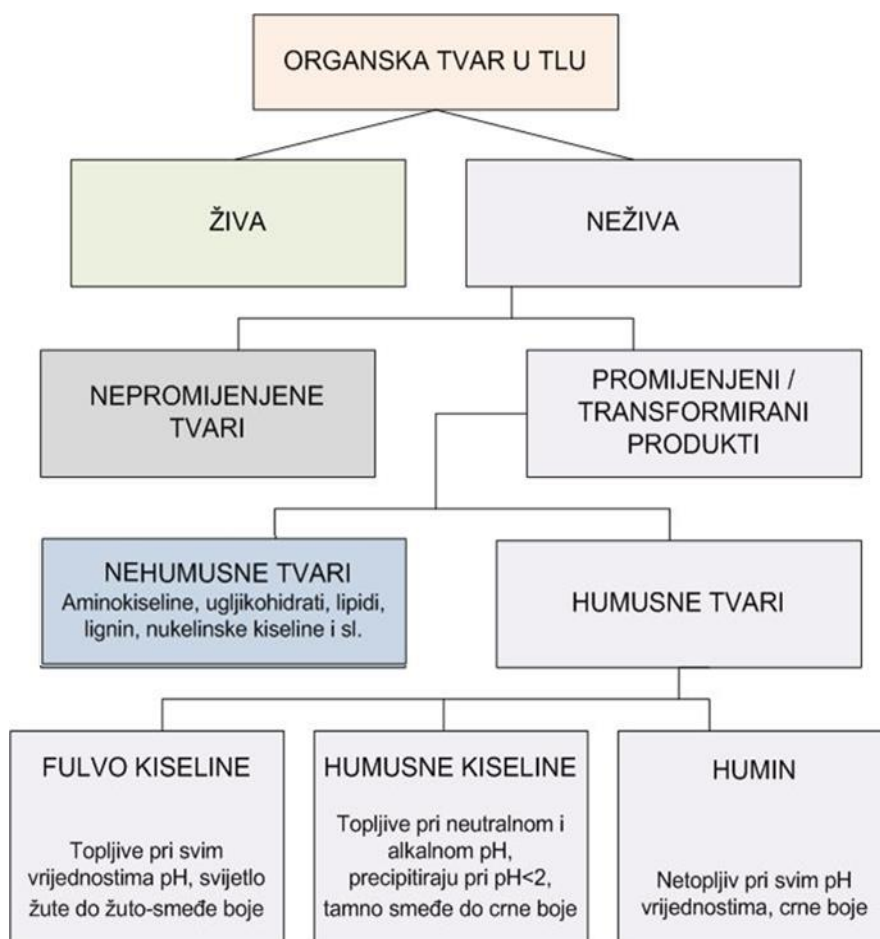
## **2.2. Organska tvar u tlu**

### **2.2.1. Značajke i uloga organske tvari u tlu**

Glavna značajka koja razlikuje tlo od regolita prisutnost je organizama, organskih ostataka i humusa (Alloway, 1990). Sva tla sadrže određeni udio organske tvari (OT), no što se točno podrazumijeva pod nazivom „organska tvar u tlu“ može varirati, ovisno o literaturi. Naime, u rječniku Američkog društva znanosti o tlu (engl. Soil Science Society of America - SSSA; 1997) pod terminom „organska tvar u tlu“ podrazumijeva se organska frakcija tla koja ne uključuje nerazgrađene biljne i životinjske ostatke te se smatra sinonimom s humusom. Međutim, primjerice Schnitzer (2000) OT definira kao sumu svih supstanci u tlu koje sadrže ugljik organskog porijekla, a sastoji se od mješavine biljnih i životinjskih ostataka različitog stupnja razgradnje, tvari koje su sintetizirali mikroorganizmi u tlu i/ili produkata razgradnje koji su nastali kemijskim procesima te živih i mrtvih stanica mikroorganizama i njihovih produkata razgradnje. Iz navedenog proizlazi da se OT u tlu može podijeliti na: (i) živu OT, koja se sastoji od korijenja biljaka, faune tla i mikrobne biomase; i (ii) neživu OT, koja nastaje kemijskom i biološkom razgradnjom organskih ostataka u tlu.

Koloidalna (neživa) OT je jedan od najvažnijih faktora koji utječe na kemijske značajke tla, a može se podijeliti na nehumusne i humusne tvari (Alloway, 1990):

- (i) Nehumusne tvari sastoje se od nepromijenjenih biokemikalija kao što su aminokiseline, ugljikohidrati, organske kiseline, masti i vosak koji nisu promijenili oblik u odnosu na onaj u kojemu su ih organizmi sintetizirali.
- (ii) Humusne tvari sastoje se od niza kiselih, žuto do crno obojenih polielektrolita koji imaju relativno veliku molekularnu masu. Nastaju reakcijama sekundarne sinteze koje uključuju mikroorganizme i imaju karakteristike koje su različite od tvari koje se nalaze u živim organizmima. Humusne tvari mogu imati veliki broj različitih funkcionalnih skupina, kao što su karboksilna, fenolna, karbonilna, esterska i druge skupine. Elementarni sastav humusa je tipično: 44 - 53 % C, 3.6 - 5.4 % H, 1.8 - 3.6 % N i 40.2 - 47 % O. Također, humus se može razdvojiti na tri frakcije: humin (netopljiv u lužini), huminske kiseline (engl. Humic Acid - HA) (topljive u lužini, a netopljive u kiselini) i fulvo kiseline (engl. Fulvic Acid - FA) (topljive i u lužini i u kiselini) (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz organskih komponenti u tlu (prilagođeno prema Nieder i Benbi, 2008).

Ipak, navedene se frakcije ne mogu smatrati različitim tvarima, nego se samo razlikuju u molekularnoj masi, sadržaju C, sadržaju O, kiselosti i kapacitetu zamjene kationa (CEC), i to prema redoslijedu: humin > huminske kiseline > fulvo kiseline, sa sadržajem N koji se smanjuje prema istom redoslijedu (Nieder i Benbi, 2008). Manje od polovice C u huminskim je kiselinama aromatično, dok se ostatak javlja kao nesaturirani alifatski lanci s karboksilnim skupinama koje doprinose većini aciditeta. Huminske kiseline imaju molekularnu masu u rasponu od 20.000 - 100.000, a frakcija fulvo kiselina općenito se sastoji od komponenti niske molekularne mase. Osim što sadrže do 10 % polisaharida, sastav fulvo kiselina sličan je sastavu huminskih kiselina. Frakcija fulvo kiselina može sadržavati prekursore i produkte razgradnje frakcije huminskih kiselina. Humini se smatraju komponentama koje su u tipu huminskih kiselina, adsorbirani na minerale (Alloway, 1990). Udio i svojstva OT utječu na fizikalne, kemijske i biološke značajke tla (tablica 1).

Tablica 1. Fizikalne, kemijske i biološke značajke tla na koje utječe organska tvar u tlu (prilagođeno prema Baldock i Nelson, 2000).

| <i>Značajke tla</i>                        | <i>Funkcija / proces</i>                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>FIZIKALNE</b>                           |                                                                                                                                                           |
| Stabilnost agregata                        | Agregacija čestica tla formiranjem veza s reaktivnim površinama mineralnih čestica u tlu                                                                  |
| Zadržavanje vode                           | Povećanje kapaciteta tla za vodu povećanjem apsorpcije vode i modifikacijom distribucije veličine pora u tlu                                              |
| Boja tla                                   | Promjene u toplinskom režimu tla zbog tamnije boje                                                                                                        |
| <b>KEMIJSKE</b>                            |                                                                                                                                                           |
| Kapacitet zamjene kationa (CEC)            | Adsorpcija kationa i aniona iz otopine tla                                                                                                                |
| Interakcija s metalima u tlu               | Vezanje ili mobilizacija (helatizacijom) metala u tlu                                                                                                     |
| Interakcija s organskim komponentama u tlu | Promjene u biorazgradivosti, aktivnosti i perzistentnosti organskih komponenti dodanih u tlo (agrokemikalija)                                             |
| Pufarni kapacitet tla                      | Protonski pufer u slablo kiselim do alkalnim tlima                                                                                                        |
| <b>BIOLOŠKE I BIOKEMIJSKE</b>              |                                                                                                                                                           |
| Izvor energije                             | Supstrat za stvaranje metaboličke energije u biološkim procesima                                                                                          |
| Spremnik hraniva                           | Oslobađanje hraniva mineralizacijom organske tvari (N, P i S)                                                                                             |
| Mikrobiološka biomasa i aktivnost          | Stimulacija ili inhibicija mikrobiološke biomase i aktivnosti                                                                                             |
| Enzimatska aktivnost                       | Indikacija oksidativne aktivnosti u tlu                                                                                                                   |
| Stabilnost ekosustava                      | Značajan udio organske tvari u tlu i s njom povezanih hraniva može povećati sposobnost ekosustava da se oporavi nakon prirodnih ili antropogenih nepogoda |

### 2.2.2. Utjecaj organske tvari na biopristupačnost metala u tlu

Među brojnim fizikalno-kemijskim čimbenicima pristupačnosti metala u tlu, OT ima iznimno značajnu ulogu. Moglo bi se reći da OT ima dvojaku ulogu u pristupačnosti metala u tlu:

- (i) čvrsta OT u tlu veže metale tvoreći metal-OT komplekse i na taj način smanjuje njihovu pristupačnost te
- (ii) otopljena OT stvara komplekse s metalima i povećava njihovu mobilnost jer su u takvom obliku metali slabije vezani na čestice tla i lakše se otpuštaju u otopinu tla (Kirchmann i Eriksson, 2011).

Procesima sorpcije i kompleksacije s OT mobilnost metala u tlu može se značajno smanjiti, čime se reducira i njihova potencijalna toksičnost za organizme. Međutim, kompleksacija metala s OT u tlu, iako može učinkovito smanjiti njihovu pristupačnost organizmima, navedeni učinak nije dugoročan s obzirom na to da OT u tlu podliježe procesima mikrobiološke razgradnje, čime se potencijalno metali mogu ponovno osloboditi. Cu stvara vrlo stabilne organske komplekse u tlu (Liao 2000; Romić, 2012), što smanjuje otpuštanje u otopinu tla, a time i pristupačnost Cu. Mobilnost Cd u tlu također može biti reducirana procesima sorpcije i kompleksacije s OT (Ondrašek i sur., 2009). Isto tako, stvaranjem Cd-organskih kompleksa s otopljenom OT smanjuje se koncentracija  $Cd^{2+}$  u otopini tla, koji se smatra najpristupačnijim oblikom za primanje u biljku (Ghallab i Usman, 2007). Većina se metala (s iznimkama kao što su metaloidi As, Sb, i Se te metali Mo i V) u otopini tla nalaze uglavnom u kationskom obliku te njihova adsorpcija ovisi o gustoći negativnog naboja na površinama koloida tla. Kako bi se održala elektroneutralnost, površinski negativni naboj izbalansiran je jednakom količinom suprotno nabijenih iona. Ionska zamjena odnosi se na zamjenu između suprotno nabijenih iona koji održavaju ravnotežu površinskog naboja na koloidima i iona u otopini tla. Ionska zamjena reverzibilan je proces kontroliran difuzijom te u većini slučajeva postoji određena selektivnost odnosno sklonost adsorbenta za određeni ion u odnosu na ostale. Navedena selektivnost uzrokuje određeni poredak zamjene među kationima, a koji je određen njihovom valencijom i stupnjem hidratacije. Što je veća valencija iona, veća je njegova sposobnost zamjene drugih iona ( $H^+$  ponašaju se kao polivalentni ioni), a što je veći stupanj hidratacije iona njegova sposobnost zamjene drugih iona je manja, ukoliko su ostali parametri podjednaki. Adsorpcija koja nastaje kationskom zamjenom također se može opisati kao stvaranje vanjsko-sfernih kompleksa s funkcionalnim grupama na površini za koje se vežu elektrostatički (Alloway, 1990).

Kapacitet zamjene kationa (engl. Cation Exchange Capacity - CEC) tala mnogo je veći od kapaciteta zamjene aniona što omogućava veći broj negativnih naboja na koloidnim površinama. Postoje dva tipa negativnih naboja (Alloway, 1990):

- (i) stalni naboj koji nastaje kao rezultat izomorfne supstitucije glavnih elemenata unutar 2:1 minerala gline i rubnog efekta na mineralima gline (neovisan o pH);
- (ii) pH-ovisni naboji na humusnim polimerima i hidriranim oksidima koji nastaju zbog disocijacije protona s karboksilnih i fenolnih hidroksilnih skupina na humusnim polimerima te O i OH skupina na površini hidriranih oksida i rubovima kristala kaolinita.

Osim što je uključena u reakcije zamjene kationa, OT može utjecati na pristupačnost metala u tlu formiranjem helatnih kompleksa s metalima. Poznato je da stvaranje metal-helatnih kompleksa može povećati mobilnost metala u tlu (Grčman i sur., 2001). Organski ligandi niske molekularne mase, koji porijeklom ne moraju nužno biti od humusa, mogu stvarati topljive komplekse s metalima i na taj način spriječiti njihovu adsorpciju ili precipitaciju. Humusne komponente s prikladnim reaktivnim skupinama, kao što su hidroksilna, fenolna i karboksilna, stvaraju komplekse s metalnim ionima. Konstante stabilnosti helata s metalima najčešće se smanjuju prema poretku:  $\text{Cu} > \text{Fe} = \text{Al} > \text{Mn} = \text{Co} > \text{Zn}$ . Karboksilne skupine imaju dominantnu ulogu u vezanju metala kod huminskih i fulvo kiselina, a maksimalna količina metala koja može biti vezana na njih približno je jednaka broju karboksilnih skupina (Alloway, 1990). Ukupni aciditet humusnih i fulvo kiselina označava sumu karboksilnih i fenolnih-OH skupina te indicira kapacitet zamjene kationa i kompleksirajuću sposobnost OT. Što je vrijednost ukupnog aciditeta huminskih i fulvo kiselina veća, smatra se da imaju veći kapacitet zamjene kationa, kao i veću sposobnost kompleksacije metala u tlu. Iako huminske i fulvo kiseline sadrže značajnu koncentraciju OH, C=O i  $\text{OCH}_3$  skupina, fulvo kiseline sadrže više funkcionalnih skupina kisele prirode, a osobito COOH. Iz navedenog proizlazi da je ukupni aciditet fulvo kiselina značajno veći od ukupnog aciditeta huminskih kiselina te potencijalno imaju veću sposobnost kompleksacije metala u tlu (Nieder i Benbi, 2008). Naime, pri višem pH tla dolazi do disocijacije molekule vode i vezivanja s metalnim kationima iz otopine tla pri čemu nastaju hidroksi-kompleksi. Metalni ioni i hidroksi-oksidi reagiraju s jednom kiselom COOH i jednom fenolnom OH skupinom, ili dvije kisele COOH skupine (Van Dijk, 1971). Nastale organo-metalne strukture i pH tla utječu na stabilnost metal-humusnih kompleksa. Kompleksi nastali s fulvo kiselinama smatraju se topljivijima i podložni su primanju u korijen, dok za razliku od njih netopljive huminske kiseline mogu zadržavati značajne koncentracije metala od primanja u korijen.

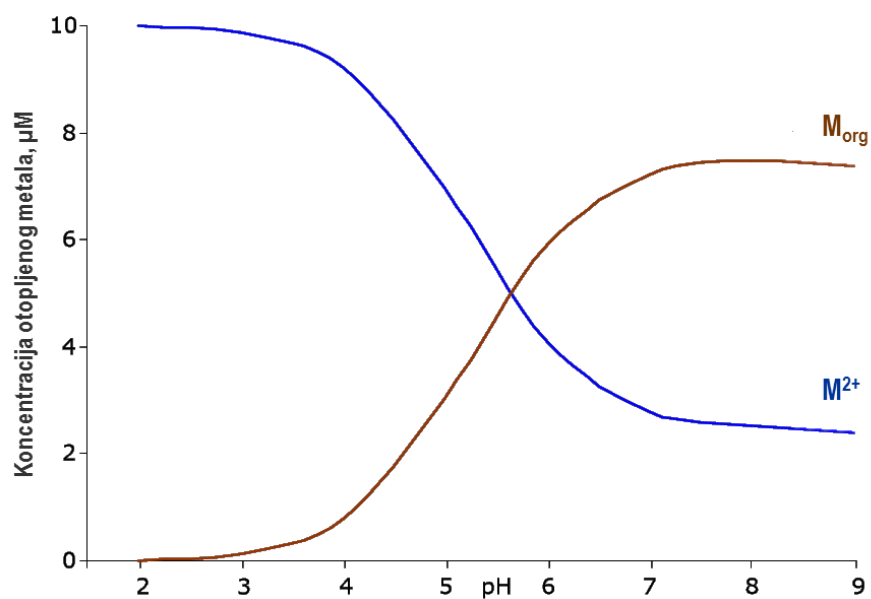
Sposito i Page (1984) predložili su alternativni pristup prema kojemu se adsorpcijske reakcije smatraju reakcijama kompleksacije s funkcionalnim skupinama na čvrstim površinama pri čemu nastaju površinske metalne kemijske vrste analogne glavnim tekućim kemijskim vrstama koje se nalaze u otopini tla. Površinske funkcionalne skupine, uključujući hidroksilne skupine na rubovima glina i hidrirane okside, ditrigonalne šupljine u bazalnom dijelu glina i karboksilne, amino i fenolne skupine na površinama OT, reagiraju s ionima pri čemu nastaju površinski kompleksi. Postoje dva tipa površinskih kompleksa (Alloway, 1990):

- (i) unutarsferni kompleksi, u kojima se ne nalazi niti jedna molekula otapala (vode) između površinskih skupina i iona ili molekule koju vezuje, a predstavljaju ekvivalent specifično adsorbiranim i organski helatiranim metalnim ionima;
- (ii) vanjskosferni kompleksi, u kojima se nalazi najmanje jedna molekula otapala između funkcionalne skupine i iona. Obično su elektrostatički vezani i predstavljaju ekvivalent reakciji zamjene kationa. Manje su stabilni od unutar-sfernih kompleksa.

Međutim, OT je često usko povezana s mineralnom frakcijom u tlu, osobito s česticama gline i praha. Utjecaj minerala gline na kemijske značajke tla rezultat je njihovih relativno velikih površina i stalnog negativnog površinskog naboja. Frakcija gline sastoji se od raspršenih minerala čiji je promjer manji od 2  $\mu\text{m}$ . Minerale gline čine listići silikatnih struktura koji obično nastaju kombinacijom Al-OH oktaedra i Si-O tetraedra. U svim mineralima (osim kaolinita), izomorfna supstitucija unutar kristalne rešetke dovodi do povećanja ukupnog negativnog naboja na površini minerala, jer trovalentni Al zamjenjuje četverovalentni Si, i divalentni Mg zamjenjuje Al (Alloway, 1990). Prisutnost pH ovisnog (varijabilnog) naboja na huminskim kiselinama omogućava stvaranje kemijskih kompleksa ili helata s metalima u tlu te interakciju s mineralnim česticama u tlu i formiranje organo-mineralnog kompleksa (Nieder i Benbi, 2008). Kombinirani organo-mineralni koloidalni kompleks (organo-mineralna frakcija - OMF) ima vrlo važnu ulogu u kontroli koncentracije, kako metalnih, tako i ostalih iona u otopini tla. Primjerice, u čvrstoj fazi tla vezanje Cd odvija se površinskom kompleksacijom karakterističnom za vezivanje Cd s OT pri nižim pH vrijednostima, odnosno s anorganskom frakcijom poput troslojnih minerala gline (2:1) gdje zamjenjuje ion Ca, a kada cijela površina minerala gline izreagira na ovaj način, preostali  $\text{Cd}^{2+}$  precipitira u otopini kao  $\text{CdCO}_3$  (Langmuir, 1997). Pri višim pH vrijednostima tla dominantna je kompleksacija Cd preko OH-skupina s hidroksidima i mineralima gline (McBride, 1994). Dodatno,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  spadaju u slabe Lewisove kiseline, dok je voda vrlo jaka baza. Minerali gline ponašaju se kao slabe baze, a Fe-oksidi kao jake baze. Posljedično, minerali gline pokazuju jači afinitet za Cd, u odnosu na Zn ili Ni, koji su slično „jaki“ i preferencijalno adsorbirani na Fe-okside, koji su „jače“ baze (Alloway, 1990).

Otopljeni organska tvar (engl. Dissolved Organic Matter - DOM) uključuje otopljene organske oblike sačinjene uglavnom od ugljika i dušika koje mogu proći kroz pore filtera veličine 0,45 µm te predstavlja najreaktivnije i najmobilnije oblike OT u tlu sa značajnom ulogom u biogeokemijskim procesima tla (Zsolnay, 2003). Otopljeni organski ugljik (engl. Dissolved Organic Carbon - DOC), kao sastavni dio DOM podrazumijeva otopljene organske oblike ugljika (C) te se smatra labilnom frakcijom OC (engl. Organic Carbon - OC) u tlu (Bi i sur., 2013). DOC u otopini tla sastoji se od niskomolekularnih alifatskih karboksilnih kiselina i makromolekularnih fulvo i huminskih kiselina (Strobel i sur., 2001). Organska kompleksacija metala s visoko- i niskomolekularnim organskim molekulama bogatim ugljikovim radikalima ima važnu ulogu u biogeokemizmu metala u tlu (Ondrašek, 2015). Naime, za razliku od slobodnih kemijskih oblika metala i anorganski kompleksiranih oblika metala u otopini tla, organski kompleksiran metal smatra se slabije biopristupačnim te stoga i potencijalno manje toksičnim. Primjerice, smanjeno primanje i akumulacija Cu i Cd u prisutnosti povećane koncentracije otopljenog organskog ugljika u tlu (DOC) utvrđene su kod raznih poljoprivrednih kultura, a objašnjavaju se redistribucijom Cu i Cd iz vodotopljive i lako zamjenjive frakcije u organski vezane i manje pristupačne frakcije Cu i Cd (Ondrašek i Rengel, 2012; Matijević i sur., 2014).

Neizravan utjecaj OT na mobilnost metala u tlu događa se preko utjecaja OT na pH tla. Naime, smatra se da povećanje udjela OT snižava pH tla uslijed razgradnje OT i oslobađanja vodikovih iona, što ovisi o početnom pH tla, kao i o svojstvima OT (ukupni aciditet). pH tla jedan je od najvažnijih faktora koji kontrolira kemijsko ponašanje metala, kao i mnoge druge važne procese u tlu. pH tla odnosi se na koncentraciju  $H^+$  u otopini tla koja se nalazi u porama tla, a koja je u dinamičkoj ravnoteži s pretežno negativno nabijenim površinama čestica tla. Vodikovi ioni imaju jaki afinitet za površinske negativne naboje te mogu zamijeniti većinu drugih kationa na adsorpcijskom kompleksu tla (Alloway, 1990). Reducirajući uvjeti u tlu općenito uzrokuju povećanje pH, a oksidacija dovodi do smanjenja pH. Postoji nekoliko mehanizama koji služe kao pufer u tlu, uključujući hidroksi-Al ione,  $CO_2$ , karbonate i reakcije zamjene kationa (Alloway, 1990). U tlima obično dolazi do varijacija oksidacijsko-redukcijskog (redoks) stanja, što može utjecati na (bio)pristupačnost metala u tlu, poglavito redoks aktivnih metala (Cu). Općenito, metalni su kationi ( $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) najmobilniji u kiselim uvjetima te se povećanjem pH (primjerice kalcifikacijom) može smanjiti njihova mobilnost u tlu zbog procesa kompleksiranja s OT (Cu, Cd) ili koprecipitacije s karbonatnim ionima u otopini tla (Ni) (slika 2).



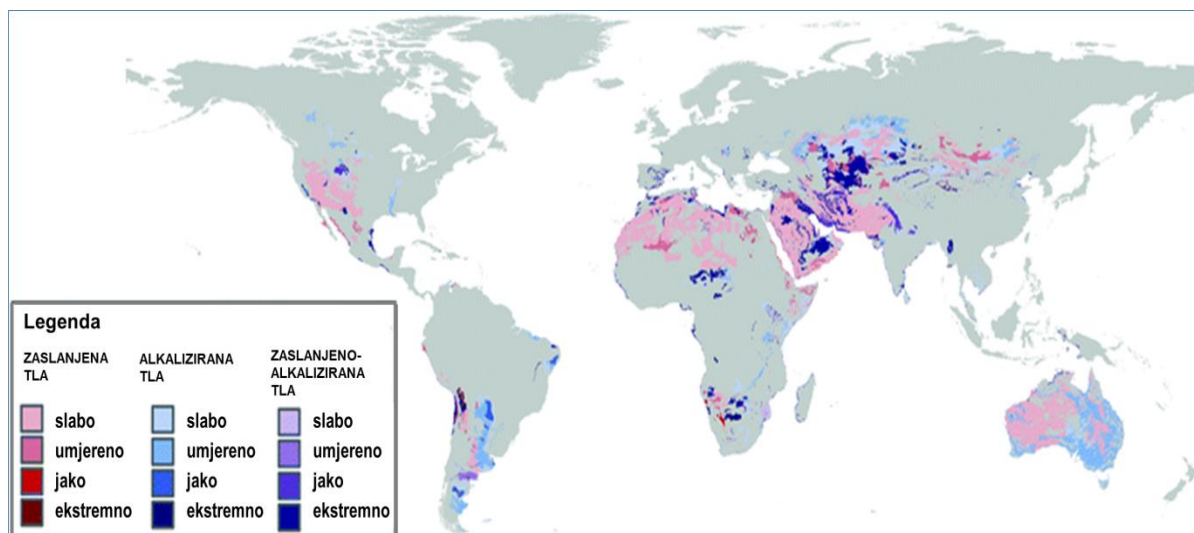
Slika 2. Shematski prikaz ovisnosti koncentracije većine slobodnih metalnih kationa ( $M^{2+}$ ) u otopini tla i metala kompleksiranog s organskom tvari ( $M_{org}$ ) o reakciji (pH) otopine tla pri povećanom udjelu organske tvari u tlu (prilagođeno prema Ondrašek, 2015).

## 2.3. Salinitet tla

### 2.3.1. Uzroci i posljedice zaslanjivanja tala

Povećani stupanj zaslanjenosti poljoprivrednih tala smatra se jednim od najvažnijih limitirajućih faktora u poljoprivrednoj proizvodnji u aridnim i semiaridnim klimatskim zonama (Rengasamy, 2006) te u obalnim područjima svih klimatskih zona (Zhao i sur., 2007). Prema FAO (2002), više od 6% tala u svijetu zahvaćeno je problemom zaslanjivanja ili alkalizacije, što čini više od 800 milijuna hektara (slika 3), dok se površine zaslanjenih tala u obalnim područjima procjenjuju na oko 230 milijuna ha (Cao i sur., 2013). Nastojanja da se postigne visoka produktivnost kultura i smanjenje kvalitete raspoložive vode za navodnjavanje razlozi su primjene neodgovarajućeg navodnjavanja u poljoprivrednoj proizvodnji. Poznato je da poljoprivredna proizvodnja ovisi o kvaliteti tala i vode te upotreba vode za navodnjavanje lošije kvalitete može dovesti do akumulacije topljivih soli u zoni korijena biljke, odnosno stresa soli kod biljaka (Romić i sur., 2008). Procijenjeno je da je 20-50% navodnjavanih poljoprivrednih površina u svijetu zahvaćeno salinizacijom (Pitman i Laüchli, 2002) te se očekuje da će se problem povećati u budućnosti (Tejera i sur., 2005), smanjujući prinose usjeva. Iako je cilj navodnjavanja u poljoprivrednoj proizvodnji povećanje prinosa uzgajanih kultura, navodnjavanje vodom lošije kvalitete može se odraziti na smanjenje prinosa kultura, a dugoročno može uzrokovati smanjenje kvalitete navodnjavanih tala (plodnosti). Salinizacija tala prisutna je i u Hrvatskoj, u priobalju Jadrana (delta Neretve, Vransko jezero), na prostorima koji nacionalno pripadaju najintenzivnijim hortikulturnim regijama (Romić, 2003; Ondrašek, 2015).

Općenito, povećani stupanj zaslanjenosti tala nastaje kao rezultat akumulacije različitih vodotopljivih soli u profilu tla te se može reći da su zaslanjena ona poljoprivredna tla u kojima su koncentracije otopljenih soli tolike da mogu uzrokovati ograničenja u rastu, razvoju i/ili produktivnosti uzgajanih poljoprivrednih kultura. Međutim, kako će stres soli utjecati na određenu poljoprivrednu kulturu ovisi o vrsti, sorti i fazi razvoja kulture (vegetativna, generativna), kao i o ostalim uvjetima u okolišu (vlaga, temperatura) te o ionima ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i dr.) koje se u tlu nalaze u povećanim koncentracijama (Yadav i sur., 2011).



Slika 3. Tla u svijetu zahvaćena problemom zaslanjivanja i/ili alkalizacije (prilagođeno prema Wicke i sur., 2011).

Prema porijeklu, zaslanjivanje tala može biti prirodno (primarno) ili antropogeno (sekundarno). U aridnim i semiaridnim klimatskim zonama te u obalnim područjima prirodno se javljaju visoke koncentracije soli u tlima, dok su količine oborina nedovoljne za ispiranje soli u dublje horizonte tla (Zhao i sur., 2007). Kod primarnog zaslanjivanja, soli mogu dospjeti kapilarnim usponom zaslanjene podzemne vode do same površine tla, gdje se procesima evaporacije i/ili evapotranspiracije soli akumuliraju. Također, u obalnom se području vjetrom nošene soli mogu akumulirati u površinskom horizontu tla i na pojedinim lokalitetima višestruko povećati koncentraciju otopljenih soli, čineći ih nepogodnima za rast biljaka. Primarna zaslanjenost tala može biti i posljedica prodora morskog vodenog klina uzvodno kroz ušća rijeka i obalne vodonosnike kroz podzemlje te prodora soli kroz površinske vodotoke, rijeke i kanale.

Kod sekundarnog zaslanjivanja soli se u tlu akumuliraju antropogenom djelatnošću, primjerice izgradnjom hidrotehničkih objekata gdje dolazi do podizanja razine podzemne vode te navodnjavanjem zaslanjenom vodom. Promjene razine podzemne vode zbog sve većeg crpljenja podzemnih izvora vode, klimatske promjene te povećana primjena vode lošije kvalitete za navodnjavanje usko su povezani s porastom sekundarnog zaslanjivanja tla u svijetu. Prema procjenama FAO-a (2002) svake godine 0,25-0,50 milijuna hektara poljoprivrednog zemljišta u svijetu postaje nepogodno za poljoprivrednu proizvodnju zbog sekundarnog zaslanjivanja tla izazvanog navodnjavanjem.

Uobičajeni kationi koji se povezuju sa zaslanjenim tlima su  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , dok su uobičajeni anioni  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  i  $\text{HCO}_3^-$ , a natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) predstavlja dominantnu akumuliranu sol u zaslanjenim poljoprivrednim tlima (Abdelhamid i sur., 2010). Tla se prema ukupnoj koncentraciji soli u tlu i prema udjelu  $\text{Na}^+$  u odnosu na  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  mogu klasificirati kao zaslanjena, alkalizirana i zaslanjeno-alkalizirana tla (Dudley, 1994). Stupanj zaslanjenosti tala prema FAO-voj (1988) klasifikaciji procjenjuje se na temelju električne vodljivosti (E.C.) saturacijskog vodnog ekstrakta tla i izražava se u (deci)Simensima po metru ( $\text{dS m}^{-1}$ ). Prema Richardsu (1954), klasifikacija zaslanjenih tala prema vrijednosti E.C. ( $\text{dS m}^{-1}$ ) tla kreće se od nezaslanjenih tala, preko slabo i umjereno zaslanjenih tala, do jako i vrlo zaslanjenih tala (tablica 2).

Tablica 2. Klase zaslanjenosti tla s obzirom na vrijednosti E.C. tla i mogućeg utjecaja na biljku (prilagođeno prema Richards, 1954).

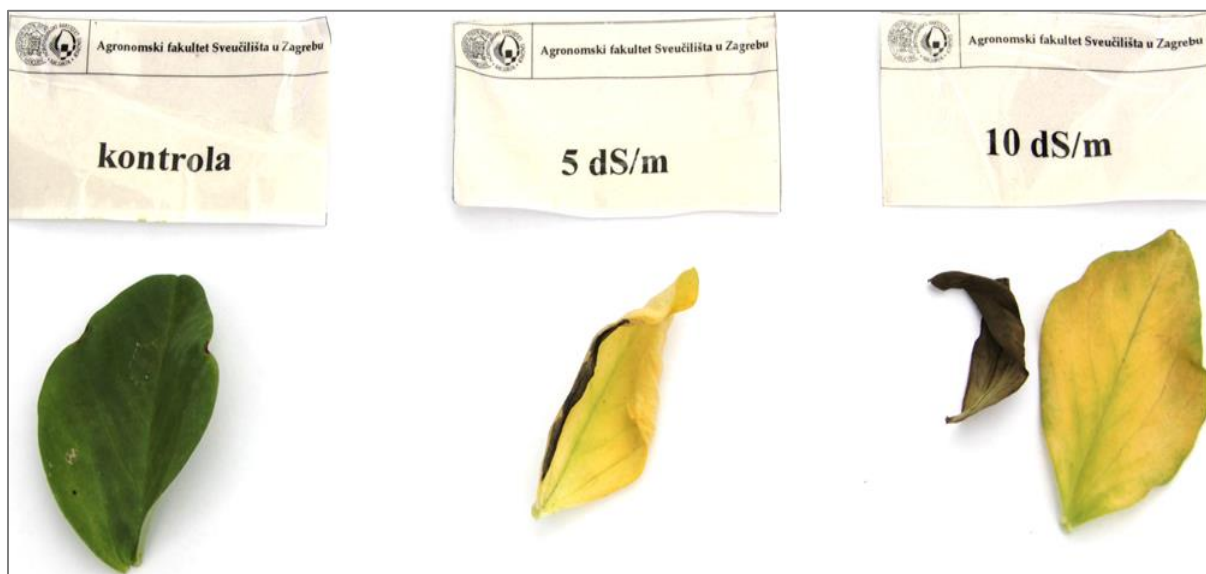
| KLASE ZASLANJENOSTI  | $\text{EC}_e (\text{dS m}^{-1})$ | MOGUĆI UTJECAJ NA BILJKU                                     |
|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Nezaslanjeno         | 0 - 2                            | Učinci zaslanjenosti uglavnom zanemarivi                     |
| Slabo zaslanjeno     | 2 - 4                            | Prinos osjetljivih kultura može biti smanjen                 |
| Umjereno zaslanjeno  | 4 - 8                            | Prinos većine kultura je smanjen                             |
| Jako zaslanjeno      | 8 - 16                           | Samo otporne kulture daju zadovoljavajuće prinose            |
| Vrlo jako zaslanjeno | > 16                             | Samo jedan dio otpornih kultura daje zadovoljavajuće prinose |

Povećanjem koncentracije soli u tlu dolazi do povećanja osmotskog potencijala tla i/ili alkalizacije tla. Do povećanja osmotskog potencijala tla dolazi pri povećanoj koncentraciji ukupnih soli u tlu, dok do alkalizacije tla dolazi zbog povećanja koncentracije natrija u tlu. Suvišak natrija u zaslanjenim tlima odražava se na fizikalno-kemijska svojstva matriksa tla bubrenjem gline i disperzijom čestica tla, uzrokujući degradaciju strukture tla i smanjenja infiltracijske sposobnosti i propusnosti tla za vodu (Zovko, 2015). Stabilnost koaguliranih koloidnih čestica ovisi o tome da li su dominantne disperzivne ili privlačne sile. Do disperzije čestica dolazi uslijed distorzije dvostrukog difuznog sloja između susjednih koloidnih čestica zbog koje dolazi do povećanja elektrostatskog odbijanja (Sumner, 1992). Veliki kationi u dvostrukom difuznom sloju djeluju kao antikoagulansi za čestice gline u mineralnoj frakciji tla

(Shainberg, 1992) te se zamjenom dvovalentnih kationa ( $\text{Ca}^{2+}$ ) s jednovalentnim kationima ( $\text{Na}^+$ ) povećava debljina dvostrukog difuznog sloja (Brady, 1990), pri čemu dolazi do disperzije koaguliranih čestica gline. Stupanj zasićenosti tla  $\text{Na}^+$  najčešće se izražava kao vrijednost udjela zamjenjivog  $\text{Na}^+$  u ukupnom kapacitetu zamjene kationa (engl. Exchangeable Sodium Percentage - ESP vrijednost) ili kao vrijednost udjela adsorbiranog natrija (engl. Sodium Adsorption Ratio - SAR vrijednost). U tlima u kojima je ESP vrijednost  $>6\%$  mogu se očekivati promjene u stabilnosti strukture tla kao posljedica disperzije čestica gline (FAO, 1988).

### 2.3.2. Posljedice zaslanjivanja tala na biljke

U poljoprivrednoj proizvodnji značajne posljedice zaslanjivanja tala na uzgajane kulture moguće su u obliku stresa soli. Stres soli predstavlja stanje biljke u kojemu prekomjerne soli u otopini tla uzrokuju smetnje u rastu i razvoju biljaka, inhibiciju fizioloških procesa, smanjenje produktivnosti te naposljetku uvenuće biljke (Zhu, 2007). Stres soli najčešće uzrokuje nepovratne promjene vidljive već u kratkom vremenskom razdoblju te može uzrokovati smanjenje prinosa usjeva do čak  $50\%$  (Romić i sur., 2010). Simptomi stresa soli na biljkama su žućenje (kloroza) najprije starih (bazalnih) listova, nakon čega slijedi prvo rubna, a kasnije i potpuna nekroza te otpadanje listova u uznapredovalim stadijima stresa soli (Parida i Das, 2005) (slika 4).



Slika 4. Simptomi stresa soli na listovima boba pri navodnjavanju zaslanjenom vodom (50 i 100 mM NaCl) (fotografija: Filipović, L.).

Stres soli zapravo se sastoji od ionskog i osmotskog stresa te niza sekundarnih stresova kao što je oksidativni stres (Zhu, 2002). Ionski stres nastaje zbog neravnoteže u dostupnosti hranivih elemenata zbog povećanih koncentracija soli u zoni rizosfere, što uzrokuje poremećaje u ishrani bilja. Za umjerene do visoke koncentracije  $\text{Na}^+$  u okolnom mediju, elektrokemijski gradijent za transport  $\text{Na}^+$  u biljci staničnom membranom favorizira pasivni  $\text{Na}^+$  transport. Prema Ondrašek i sur. (2009) uobičajeni pokazatelji NaCl stresa su povećana koncentracija natrija i klorida u biljnom tkivu uz pad koncentracije kalija. Primjerice, uslijed povećane koncentracije NaCl, primanje visokih koncentracija Na i Cl otežava primanje ostalih hraniva (npr. K, Ca, Mg, P), što rezultira neravnotežom u primanju i/ili akumulaciji hraniva u biljnom tkivu, a posljedično i smanjenjem količine i/ili kvalitete prinosa (Grattan i Grieve, 1999). Također, povećane koncentracije soli u tlu mogu utjecati i na primanje/akumulaciju mikrohraniva u biljnom tkivu, no utjecaj može biti stimulativan ili inhibitoran, ovisno o ispitivanoj kulturi kao i o pojedinom mikrohranivu (Izzo i sur., 1991; Rahman i sur., 1993; Grattan i Grieve, 1999; Yadav i sur., 2011). Kod osmotskog stresa dolazi do ometanja korijena biljke u apsorpciji vode iz tla zbog smanjenog osmotskog potencijala u otopini tla (Sumner, 1992; Zhu, 2007). Naime, u zaslanjenim uvjetima dolazi do povećanja propusnosti  $\text{Cl}^-$  u membranskim vezikulama te do snažne depolarizacije stanica kako se koncentracija  $\text{Cl}^-$  u citoplazmi povećava (Tyerman i Skerrett, 1999). Suvišak klora dovodi do porasta turgora stanica i smanjenja transpiracije, uz pojavu sitnih i deformiranih listova. Oksidativni stres karakterizira povećanje koncentracije slobodnih radikala u biljnim stanicama koji uzrokuju različita oštećenja na staničnoj razini (npr. nukleinskih kiselina).

Stres soli utječe na sve važne procese u biljci: fotosintezu, sintezu proteina i metabolizam lipida, a kako biljka reagira na više koncentracije soli razlikuje se ovisno o fazi rasta i razvoja biljke te duljini izloženosti povećanom stupnju zaslanjenosti (Munns i Tester, 2008). U istraživanjima gdje su tretmani saliniteta bili jednakog trajanja tijekom različitih stadija rasta, utvrđeno je da su biljke bile više osjetljive na zaslanjenost tijekom vegetativne faze i ranih reproduktivnih faza nego u kasnijim fazama rasta (Maas, 1993). Prema Parida i Das (2005) kod biljaka izloženih zaslanjivanju, posebno NaCl-u, dolazi do smanjenog intenziteta fotosinteze, a time i rasta lisne površine i brojnosti listova. U brojnim istraživanjima dokazano je smanjenje intenziteta fotosinteze uzrokovano povećanim koncentracijama soli (Abdul Qados, 2011). Naime, povećan stupanj zaslanjenosti tla može značajno reducirati proces fotosinteze putem smanjenja lisne površine i sadržaja klorofila te provodljivosti puči, kao i smanjenjem učinkovitosti fotosustava II (Chinnusamy i sur., 2006). Općenito se negativan učinak povećane zaslanjenosti na proces fotosinteze može podijeliti na stomatalne i nestomatalne učinke (Debez i sur., 2006). Stres soli uzrokuje ograničenja u transportu produkata u primarnim reakcijama fotosinteze, što u konačnici može rezultirati inhibicijom

transporta elektrona, povećanjem fluorescencije klorofila, kao i produkcijom slobodnih radikala (Koyro i sur., 2010). Sekundarni negativni učinci povećane zaslanjenosti na fotosintezu odnose se na stomatalne učinke, odnosno rezultiraju zatvaranjem puči (Carillo i sur., 2011), što je većinom inducirano djelovanjem apscizinske kiseline (ABA) koja se oslobađa iz korijena biljke, a posljedično se odražava na inhibiciju izmjene plinova ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) (Koyro i sur., 2010). Drugim riječima, kao odgovor na osmotski stres, koji je sastavni dio stresa soli, biljke pokušavaju zadržati vodu zatvaranjem puči i smanjenjem transpiracije, što se posljedično odražava na intenzitet fotosinteze. Adaptacija biljaka na stres soli, osim prethodno navedenog, uključuje i sintezu osmotski aktivnih tvari (Stoddard i sur., 2006). Isto tako, manja gustoća puči na listu biljke također se povezuje s boljim biljnim mehanizmima zadržavanja vode, a time i boljim adaptacijskim sposobnostima na stres soli (Khan i sur., 2010). Također, smatra se da stres soli može uzrokovati inhibiciju sinteze molekula klorofila, kao i povećanje njihove degradacije djelovanjem enzima klorofilaze, što može dovesti do smanjenja sadržaja klorofila u listovima biljaka izloženima stresu soli (Azooz i sur., 2013). Povećan stupanj zaslanjenosti tla ima negativne učinke na razvoj biljne biomase, odnosno na morfološke pokazatelje kao što su visina biljke, broj listova, duljina korijena biljke te odnos nadzemnih dijelova i korijena biljke (Ashraf i Bashir, 2003; Jamil i sur., 2006; Ondrašek i sur., 2006; Gama i sur., 2007; Abdul Qados, 2011; Turhan i Seniz, 2012). Povećana zaslanjenost okolnog medija, osim posredno putem negativnog utjecaja na proces fotosinteze, uzrokuje dehidraciju biljnih stanica što se također može negativno odraziti na rast biljke te može izazvati i uvenuće biljke. Smanjenje rasta javlja se kod svih biljnih vrsta, ali razina tolerantnosti i stopa smanjenja rasta pri toksičnim koncentracijama soli varira između različitih biljnih vrsta. Učinci povećanog stupnja zaslanjenosti poljoprivrednih tala na kvalitetu komercijalnih proizvoda dobivenih od kultura uzgojenima na takvim tlima, manje su poznati od učinaka koje zaslanjenost ima na prinose uzgajanih kultura. Primjerice, navodnjavanje zaslanjenom vodom može značajno povećati sadržaj šećera i organskih kiselina kod cherry rajčice (De Pascale i sur., 2007) te poboljšati okus prerađenih rajčica (Mitchell i sur., 1991).

### **2.3.3. Utjecaj saliniteta tla na biopristupačnost metala u tlu**

Osim izravnog štetnog utjecaja na kvalitetu tla, povećanje stupnja zaslanjenosti tla jedan je od važnijih čimbenika koji mogu utjecati na pristupačnosti metala u tlu, a poglavito Cd (McLaughlin i sur., 1994; Smolders i sur., 1998; Weggler i sur., 2004). Naime, povećane koncentracije soli u tlu mogu utjecati na stupanj adsorpcije određenog metala jer adsorbenti imaju različit afinitet za različite metale. Relativna selektivnost za metalne katione može se u velikoj mjeri objasniti pomoću Lewisova jaka-slabo kiselina-baza principa (engl.

Hard-Soft Acid-Base - HSAB). Termin „jaka“ odnosi se na veliku elektronegativnost, nisku mogućnost polarizacije i mali ionski promjer, a termin „slaba“ se odnosi na suprotno od navedenog.  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  spadaju u slabe Lewisove kiseline. Povećane koncentracije soli u tlu mogu utjecati na HSAB princip jer kompleksirajući ligandi mogu onemogućiti primjenu HSAB principa, kao što je slučaj s  $\text{Cl}^-$  koji reagira s  $\text{Cd}^{2+}$  i smanjuje koncentraciju adsorbiranog Cd u tlu (Alloway, 1990). Stoga se smatra da prisutnost anorganskih liganada kao što su kloridi, favorizira topljivost i mobilnost Cd u tlu (Ondrašek i sur., 2009).

Formiranjem Cd-Cl kompleksa, kloridi smanjuju adsorpciju Cd na čestice tla te na taj način povećavaju njegovu koncentraciju i mobilnost u otopini tla (McLaughlin i sur., 1997; Smolders i sur., 1998; Ondrašek i sur., 2009), što također može utjecati na biopristupačnost Cd te povećati njegovo primanje i fitoakumulaciju (McLaughlin i Singh, 1999). Uz navedeno Cd-Cl kompleksi se smatraju fitopristupačnim. Kadmij iz  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa može biti primljen u korijen izravno kao klorokompleks i/ili disocirajući s klorokompleksa pri kontaktu sa stanicama korijena i ulazeći u stanice kao  $\text{Cd}^{2+}$  (Crea i sur., 2013). Stoga, navedene činjenice upućuju na potencijalnu opasnost od povećane fitoakumulacije mobilnijih i biopristupačnijih oblika Cd u poljoprivrednim kulturama koje se uzgajaju na zaslanjenim tlima kontaminiranim Cd (Ondrašek, 2015). Ipak, slobodni metalni ion ( $\text{Cd}^{2+}$ ) smatra se najpristupačnijim oblikom za primanje u korijen (Ghallab i Usman, 2007), dok se primanje  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa odvija sporije u odnosu na primanje  $\text{Cd}^{2+}$  iz otopine tla (Crea i sur., 2013) te se stvaranjem Cd-klorokompleksa zapravo smanjuje aktivnost slobodnog iona u otopini tla, što bi moglo smanjiti fitopristupačnost Cd ili barem usporiti njegovo primanje u korijen.

Stvaranje kompleksa s kloridima smatra se manje značajnim procesom za mobilizaciju Cu i Zn u tlu jer se njihovi klorokompleksi smatraju manje stabilnima od Cd-Cl kompleksa (Acosta i sur., 2011). Ipak, povišene koncentracije natrija u tlu mogu inducirati procese ionske zamjene na adsorpcijskom kompleksu tla te tako utjecati na pristupačnost svih metalnih kationa ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ). Naime, iako je u istraživanjima dokazano da jednovalentni ioni ( $\text{Na}^+$ ) ni u velikim koncentracijama ne mogu utjecati na oslobađanje Cd s izmjenjivog kompleksa (Norvell i sur., 2000; Smolders i sur., 1998), ukoliko su u otopini tla prisutni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  u većim koncentracijama (što je obično slučaj u zaslanjenim tlima), zbog kompeticije za mjesta na adsorpcijskom kompleksu tla, ipak može doći do oslobađanja metalnih iona ( $\text{Cd}^{2+}$ ) (Paalman i sur., 1994). Tako prema rezultatima McLaughlin i sur. (1994) visoka koncentracija  $\text{Na}^+$  u otopini tla također može utjecati na povećanu topljivost Cd.

## 2.4. Modeliranje kemijske specijacije metala u otopini tla

Biopristupačnost metala u tlu uvjetovana je kemijskim oblikom (engl. speciesom) metala u otopini tla (Shahid i sur., 2012), a na što utječe ukupna koncentracija i kemijske značajke metala, značajke tla (pH, udio OT i gline, prisutnost drugih iona-anorganskih liganada) te razni drugi uvjeti okoliša (temperatura, vlaga u tlu). Poznato je da određeni kemijski oblici metala u otopini tla mogu biti značajno mobilniji od drugih kemijskih oblika, a time i pristupačniji organizmima za primanje (Ondrašek, 2015). Stoga je određivanje oblika metala u otopini tla važan alat u istraživanjima biopristupačnosti metala (Adriano i sur., 2004).

Kemijska specijacija metala u otopini tla predstavlja sumu pojedinih koncentracija različitih kemijskih oblika metala, a koji zajedno čine njegovu ukupnu koncentraciju u otopini tla (Florence, 1982). Za potrebe procjene kemijske specijacije metala koriste se razni računalni programi (Shahid i sur., 2011), koji na temelju kemijskih (aciditet, aktivitet, pojedinačne koncentracije) i fizikalnih (temperatura, parcijalni tlak) parametara, po termodinamičkom konceptu, procjenjuju ponašanje metala tijekom geokemijskih reakcija u otopinama, suspenzijama i/ili čvrstom (an)organskom mediju. Programi se međusobno razlikuju po broju i vrsti simulacija koje mogu izvesti, odnosno koje modele adsorpcije/kompleksacije i matematičke funkcije koriste (Ondrašek, 2015).

Program Visual MINTEQ je besplatni specijacijski softver s mogućnošću predikcije površinske (anorganske) adsorpcije s pomoću pet modela (Diffuse Layer, Constant Capacitance, Triple Layer, Basic Stern i Three Plane model) te organokompleksacije metala s pomoću tri modela (Gaussian DOM, Stockholm Humic Model i NICA-Donnan Model) (Gustafsson, 2006) (slika 5).

Model Non-Ideal Competitive Adsorption (NICA) - Donnan (Kinniburgh i sur., 1999) smatra se jednim od naprednijih modela za kompetitivno kompleksiranje metala s DOC kompleksima (Weng i sur., 2002), što je od osobitog značaja za modeliranje kemijskih oblika metala u otopini rizosfernog tla.



Slika 5. Glavni izbornik programa Visual MINTEQ (version 3.0) za određivanje kemijske ravnoteže.

Naime, u otopini rizosfernog tla najčešće su disperzirani:

1. složeni, visokomolekularni koloidi (huminske tvari) nastali rizodepozicijom, oksidacijom OT te mikrobiološkom aktivnošću,
2. organski, niskomolekularni ligandi (citrati, acetati, oksalati)
3. anorganski koloidi (hidroksipolimeri Fe, Al, Mn)
4. jednostavni ligandi (karbonati, fosfati, sulfati, kloridi) (Ondrašek, 2015).

Iz navedenog proizlazi da je otopina rizosfernog tla kemijski vrlo složen i dinamičan medij gdje je kompleksiranje metala s otopljenim ugljikovim spojevima od iznimnog značaja za njihovu mobilnost i fitopristupačnost. Cd je u svom slobodnom ionskom obliku ( $\text{Cd}^{2+}$ ) u navedenim uvjetima rizosfere vrlo podložan kemijskim reakcijama te je uglavnom kompleksiran s različitim otopljenim anorganskim i/ili organskim ligandima (Ondrašek, 2015). Cu se pak u otopini rizosfernog tla u najčešće može naći kao Cu-organski kompleks, dok je udio slobodnog ionskog oblika ( $\text{Cu}^{2+}$ ) malen do zanemariv (Matijević i sur., 2014).

## 2.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu

Mikrobiološka aktivnost se smatra važnim faktorom plodnosti tla budući da se transformacije OT i hraniva pretežno odvijaju pod utjecajem mikroorganizama i njihovih enzima (Sikora i sur., 2010). Također, poznato je da se antropogeni utjecaj na kvalitetu tala može reflektirati i na enzimatsku aktivnost u tlu, što se posebice odnosi površinski horizont poljoprivrednih tala u kojemu se dominantno primjenjuju osnovni agrotehnički zahvati (Redžepović i sur., 2012). Enzimi su vrlo osjetljivi na promjene u okolišu te promjene u enzimatskoj aktivnosti u tlu mogu brzo reflektirati negativne utjecaje na okoliš, kao što je primjerice kontaminacija tla metalima. Zbog navedenog, kao biološki pokazatelji toksičnog učinka metala u tlu koriste se i enzimatske aktivnosti u tlu (Chaperon i Sauv  , 2008).

Dehidrogenaze su unutarstanični enzimi iz skupine oksidoreduktaza koji se nalaze u svim živućim mikrobnim stanicama (Alrumman i sur., 2015). S obzirom na to da su dehidrogenaze isključivo unutarstanični enzimi koji se ne akumuliraju u tlu izvanstanično, dehidrogenazna aktivnost (engl. Dehydrogenase Activity - DHA)  esto služi kao indikator ukupne mikrobiološke aktivnosti u tlu, odnosno kao mjera opće plodnosti tla. Dehidrogenaze sudjeluju u biološkoj oksidaciji OT tako što prenose elektrone i protone s organskih supstanci na anorganske akceptore (Woli nska i St pniewska, 2012).

Enzimatska aktivnost u tlu često je usko povezana s udjelom OT u tlu (Das i Varma, 2011), odnosno povećanje udjela OT u tlu može povećati enzimatsku aktivnost u tlu. Povećanje dehidrogenazne aktivnosti u tlu s dodatkom OT može biti rezultat izravnog i neizravnog utjecaja OT. Naime, povećanjem OT u tlu osiguravaju se povoljniji uvjeti za rast mikrobnih populacija s obzirom na to da se na taj način pobol avaju vodozračni uvjeti u tlu te se hraniva vezana na OT zadržavaju u tlu u biopristupa nom obliku, a ipak je otežano (spriječeno) njihovo ispiranje u dublje horizonte tla. Također, s obzirom na to da dehidrogenaze imaju ulogu u oksidaciji OT, povećanje udjela OT u tlu predstavlja dodatni izvor supstrata za rad enzima, odnosno mogući izravan utjecaj povećanja udjela OT na povećanje DHA u tlu.

Poznato je da prisutnost visokih koncentracija soli u tlu smanjuje enzimatsku aktivnost u tlu zbog osmotskog i ionskog stresa kojemu su izložene mikrobne populacije u zaslanjenim tlima (Rao i Pathak, 1996). Smanjenje DHA s porastom stupnja zaslanjenosti tla također je potvrđeno (Malik i sur., 1995). Visoke koncentracije soli u tlu mogu uzrokovati značajne promjene u vodnom potencijalu tla, što se može negativno odraziti na staničnu aktivnost mikrobnih populacija te mogu uzrokovati smetnje u kompetitivnom primanju hraniva iz tla i/ili

njihovoj raspodjeli unutar mikrobnih stanica, uzrokujući u konačnici retardaciju rasta mikrobnih stanica i/ili staničnu smrt. Osim navedenog, stres soli može inducirati oksidativni stres u mikrobnim stanicama, koji je karakteriziran povećanim stvaranjem slobodnih radikala (engl. Reactive Oxygen Species - ROS), koji uzrokuju nespecifične oksidacije proteina i membranskih lipida u stanicama te oštećenja nukleinskih kiselina (Schützendübel i Polle, 2002).

Kontaminacija tla Cu može smanjiti DHA neizravno - smanjenjem mikrobne biomase, ili izravno - stvarajući smetnje u procesu sinteze enzima u mikrobnim stanicama, utječući na enzim-supstrat kompleks, denaturirajući protein enzima ili interferirajući s funkcionalnim skupinama na proteinu enzima (Pan i Yu, 2011). Wyszowska i sur. (2009) također su u svojim istraživanjima potvrdili da povećane koncentracije Cu u tlu značajno inhibiraju DHA. Međutim, rezultati istraživanja utjecaja povećane koncentracije Cd u tlu na DHA u tlu nisu tako jasni kao što je to slučaj sa Cu. Naime, Wolińska i Stępniewska (2012) utvrdile su da je koncentracija Cd od 2 mg kg<sup>-1</sup> imala stimulativan učinak na DHA u tlu, dok je koncentracija Cd od 20 mg kg<sup>-1</sup> imala jak inhibitoran učinak na DHA. Ipak, rezultati prethodno navedenih istraživanja jasno pokazuju da kontaminacija tla Cu i Cd može utjecati na DHA u tlu, a što uvelike ovisi o koncentraciji metala i njegovom kemijskom obliku u tlu (Chaperon i Sauv  , 2008), ali vrlo vjerojatno i o ostalim uvjetima u okolišu (temperatura, vlaga u tlu, i sl.).

## **2.6. Bakar i kadmij u sustavu tlo - biljka**

### **2.6.1. Primanje, translokacija i interakcije bakra s drugim elementima u biljci**

Bakar je esencijalni mikroelement potreban biljkama u niskim koncentracijama jer je sastavni dio proteina i enzima koji su uključeni u proces fotosinteze i respiracije (Ait Ali i sur, 2002). Bakar se u biljci pojavljuje u dva oksidacijska stanja (Cu<sup>2+</sup> i Cu<sup>+</sup>) djelujući kao kofaktor u biljnim enzimima (Cu/Zn superoksid dismutaza, citokrom c oksidaza, aminooksidaze i dr.) te u transportu elektrona i redoks reakcijama u mitohondrijima, kloroplastima, staničnoj stjenci i citoplazmi biljne stanice (Marschner, 1995; Welch, 1995; Liao, 2000; Farga  ov  , 2004). Na staničnoj razini Cu ima važnu ulogu u signalizaciji transkripcije u oksidativnoj fosforilaciji i imobilizaciji željeza (Yruela, 2005). Optimalna koncentracija Cu u biljkama iznosi 5-20 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari (Kabata-Pendias, 2011). Uslijed nedostatka Cu biljke razvijaju specifične simptome, većinom na mladim listovima i reproduktivnim organima (Yruela, 2005), dok kod većih koncentracija dolazi do pojave toksičnosti (Kabata-Pendias, 2011), koja se očituje u

obliku kloroze, sporijeg rasta te oštećenja permeabilnosti stanične membrane (Marschner, 1995).

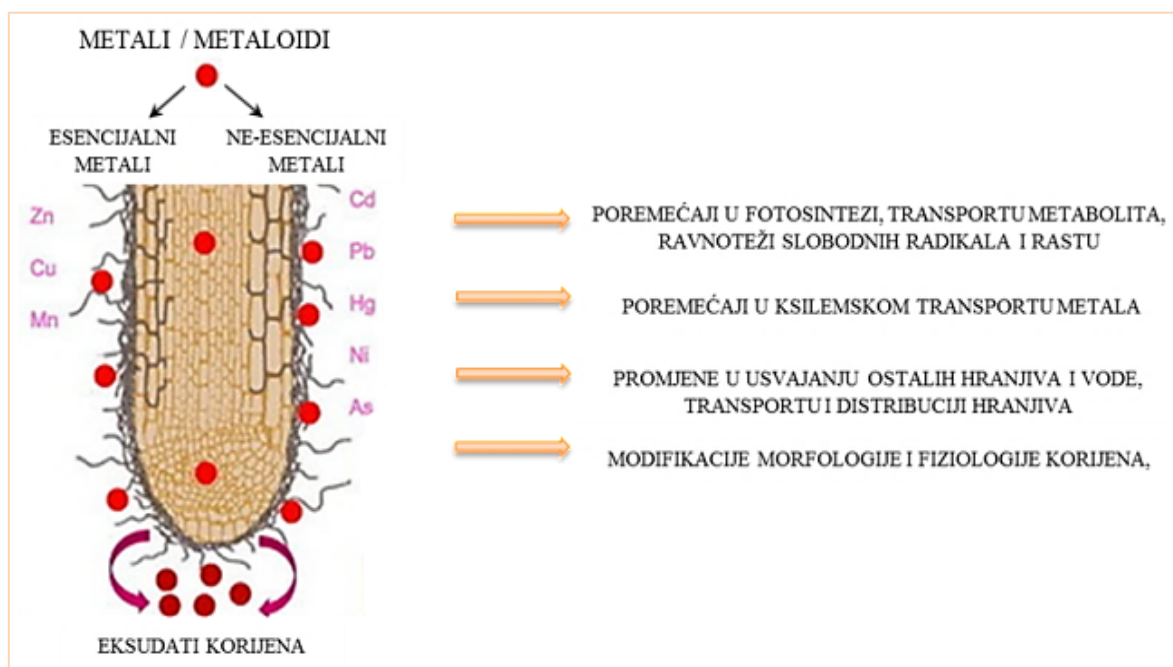
Prosječna koncentracija Cu u tlu obično iznosi između 2-250  $\mu\text{g g}^{-1}$ , dok biljke (prosječno) mogu primiti oko 20-30  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Azzoz i sur, 2015). Jedan od važnijih faktora koji utječu na pristupačnost Cu u tlu je pH tla te se fitotoksičnost Cu javlja na kiselim tlima ili kod dugogodišnje primjene sredstava za zaštitu bilja na bazi Cu (voćnjaci i vinogradi). Primanje Cu iz otopine tla u biljku regulirano je specifičnim proteinskim transporterima koji se nalaze na plazmatskoj membrani korijena. Biljke Cu primaju iz otopine tla najčešće kao  $\text{Cu}^{2+}$  (Maksymiec, 1997) te je primanje Cu u biljku (i njegova fitotoksičnost) usko povezano s koncentracijom  $\text{Cu}^{2+}$  u otopini tla, duljinom izloženosti biljke povišenim koncentracijama Cu te s genotipom biljke (Nicholls i Mal, 2003; Emamverdian i sur, 2015).

Smatra se da Cu nije naročito mobilan unutar biljke, odnosno da njegova distribucija u određene biljne organe ovisi o opskrbljenosti biljke Cu (Hochmuth i sur., 1991). Redoks svojstva, koja čine Cu esencijalnim elementom, također doprinose njegovom toksičnom učinku na biljne stanice. Naime, redoks kruženje između  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{+}$  može katalizirati proizvodnju slobodnih radikala koji oštećuju nukleinske kiseline, lipide, proteine i ostale makromolekule (Lombardi i Sebastiani, 2005; Doncheva i Stoyanova, 2007). Na staničnoj razini toksičnost može biti i rezultat vezanja Cu na sulfhidrilne skupine proteina, inhibirajući na taj način enzimatsku aktivnost ili funkciju proteina (van Assche i Clijsters, 1990) ili vezanje Cu sa sulfhidrilnim grupama na staničnoj membrani što može inducirati peroksidaciju lipida, tj. oštećenje što rezultira oštećenje biomembrane (Chen i sur, 2000; Emamverdian i sur, 2015).

Antagonizam između primanja Cu i Zn te Mn u korijen također se sugerira u istraživanjima Xiong i sur. (2002). Bowen (1969) navedeni antagonizam objašnjava istim membranskim transporterima za  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  u stanicama korijena. Ait Ali i sur. (2002) su u svojim istraživanjima s povećanjem koncentracije Cu u tlu dobili smanjenje koncentracije Mn u biljnom tkivu. Također, s povećanim primanjem Cu u biljku sugerira se mogućnost narušavanja homeostaze  $\text{Ca}^{2+}$  unutar biljnih stanica (Alaoui-Sossé i sur., 2004); Rengel, 1992). Isto tako, Cu može interferirati s transportom drugih elemenata u biljci stvaranjem visoko stabilnih kompleksa s aminokiselinama u ksilemu biljke (Liao, 2000).

## 2.6.2. Primanje, translokacija i interakcije kadmija s drugim elementima u biljci

Primanje Cd kroz plazmatsku membranu još uvijek nije potpuno razjašnjeno kod viših biljaka. S obzirom na to da za Cd još uvijek nije dokazana biološka uloga (esencijalnost) kod većine živih bića, tada vjerojatno u biljnom organizmu ne postoje specifični mehanizmi za njegovo primanje i transport, već se primanje Cd putem korijena odvija sustavima koja prvenstveno služe za primanje sličnih hraniva (Clemens, 2006). Činjenica je međutim, da su biljke sposobne primiti i akumulirati Cd (i ostale toksične elemente) u pojedinim organima i u relativno visokim koncentracijama bez vidljivih simptoma fitotoksičnosti (Wagner, 1993). Cd biljke akumuliraju prvenstveno u podzemnim organima, zatim u stabljici i listovima, a najmanje u plodovima (Zhang i sur., 2006). Primanje Cd iz tla kod biljaka može izazvati smetnje u primanju i akumuliranju esencijalnih elemenata, a samim time i u fiziološkim procesima u kojima oni sudjeluju (slika 6).



Slika 6. Poremećaji koje izaziva primanje povećanih koncentracija metala iz otopine tla u biljke (prilagođeno prema Luo i sur., 2014).

Primjerice, kontaminacija tla Cd može uzrokovati smanjenje koncentracije Zn u biljnom tkivu, što se obično objašnjava nespecifičnom propusnosti stanica korijena koja dovodi do inhibicije primanja Zn u prisutnosti povećanih koncentracija Cd u tlu. Cu-Zn antagonizam vjerojatno se javlja zbog njihove kompeticije za proteinske transportere na plazmatskoj membrani korijena, ili zbog interferencije Cd s ekspresijom gena koji su zaduženi za regulaciju proteinskih transportera (Andersen i Küpper, 2013).

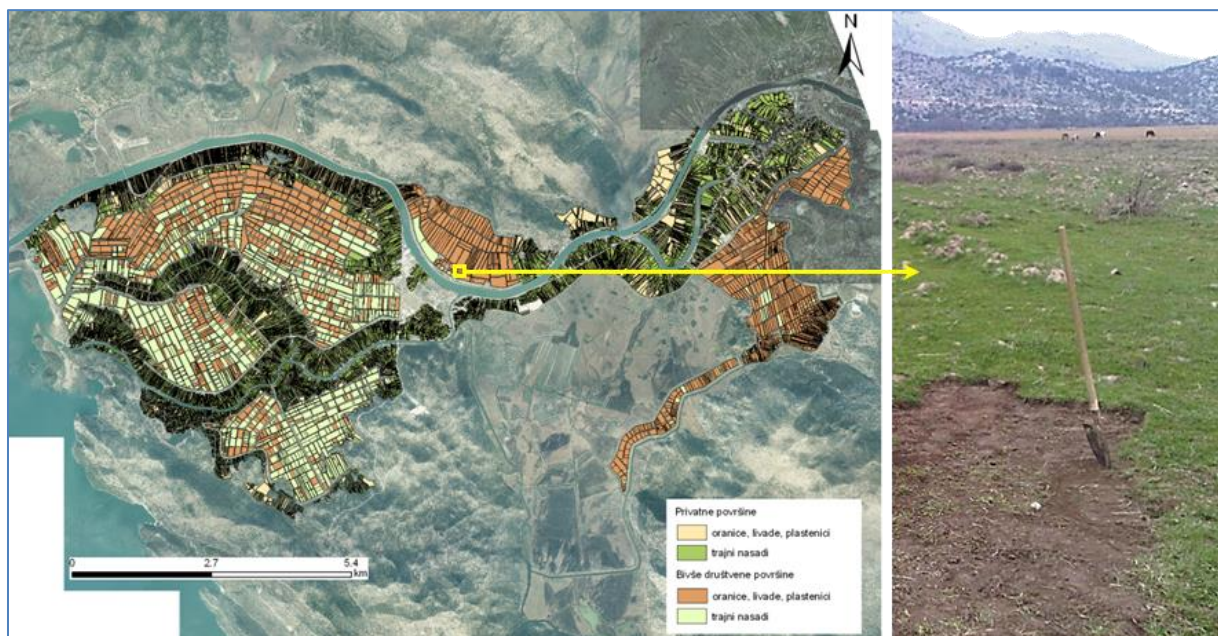
Također, povećane koncentracije Cd u tlu mogu uzrokovati smanjenje koncentracije Ca u biljkama što upućuje na Ca-Cd kompeticiju za transportne kanale kod ulaska hraniva u ksilem biljke (Vondráčková i sur., 2014). Isto tako, poznato je da Cd ima veliki afinitet prema tiolnim skupinama (SH) u biljnim enzimima i drugim proteinima te postoji mogućnost da obrambeni mehanizam biljke protiv toksičnog učinka povećane koncentracije Cd u okolnom mediju uključuje i povećano primanje S iz otopine tla (Gill i Tuteja, 2011; Andersen i Küpper, 2013). Također, kontaminacija tla Cd kod biljaka može uzrokovati simptome toksičnosti, kao što su smanjenje rasta, a osobito rasta korijena, poremećaje u metabolizmu ugljikohidrata (Moya i sur., 1993), a time i na produkciju biomase. Redukcija biomase može biti izravan rezultat inhibicije sinteze klorofila i posljedičnog smanjenja intenziteta fotosinteze. Poznato je i da povećane koncentracije Cd u biljnom tkivu mogu smanjiti aktivnost fotosintetskih enzima te smetnje u fotosintetskom transportnom lancu elektrona, rezultirajući smanjenom sintezom molekula klorofila u listu, a time i smanjenim indeksom sadržaja klorofila (CCI). Primjerice, Dong i sur. (2005) u istraživanjima su utvrdili smanjenje intenziteta fotosinteze kod biljaka rajčice izloženih Cd stresu te sugerirali da bi dobiveni rezultat mogao biti posljedica smanjenja sadržaja klorofila koje je također potvrđeno kod rajčice s povećanjem koncentracije Cd. Isto tako, Cd može zamijeniti esencijalni  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ , prisutne u reakcijskom centru fotosustava II (*Photosystem* - PS II) (Hossain i sur., 2014), onemogućavajući na taj način njegovo funkcioniranje i smanjujući posljedično intenzitet fotosinteze.

### 3. MATERIJAL I METODE RADA

#### 3.1. Postavljanje pokusa

U kontroliranim uvjetima plastenika na eksperimentalnoj postaji Maksimir, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet (45°50' N, 16°02' E, 128 m.n.m.), u razdoblju od 02. 04. - 15. 06. 2012., postavljena su dva pokusa u loncima, jedan za istraživanje mobilnosti i biopristupačnosti Cu u tlu (pokus 1), a drugi za istraživanje mobilnosti i biopristupačnosti Cd u tlu (pokus 2). Plastenik je bio opremljen automatiziranim sustavom za grijanje (podno radijacijsko grijanje), ventilacijskim sustavom (krovnja i bočna ventilacija) te automatskim sustavom za navodnjavanje kapanjem.

U oba pokusa korišteno je tlo iz poljoprivrednog površinskog sloja (5-25 cm) s područja Donje Neretve (slika 7). Navedeno područje karakterizira povećana opasnost od degradacije uslijed procesa zaslanjivanja, ali i mogućnosti povećane akumulacije teških metala u tlu (Zovko, 2015). Tlo je prilikom uzorkovanja ručno očišćeno od biljnih ostataka i vidljivih nečistoća, usitnjeno i prosijano kroz sito promjera mreže 1×1 cm.



Slika 7. Lokacija na području Donje Neretve s koje je uzeto tlo korišteno u pokusima (izvor karte: Romić i sur., 2010; fotografija: Filipović, L.).

U oba pokusa kao test kultura koristio se bob (*Vicia faba* L. cv. Aguadulce), tako što su 20 dana stare presadnice boba uzgojene u plastičnim čašicama napunjenim tresetom (Potgrond P, Klasmann; tablica 3), a zatim su odabrane ujednačene biljke za presađivanje u lonce volumena 3 L (slika 8).

Tablica 3. Značajke treseta korištenog u pokusu.

|                   |                               |
|-------------------|-------------------------------|
| Naziv             | Potgrond P                    |
| Proizvođač        | Klasmann                      |
| Upotreba          | mlade povrtno kulture         |
| Treset            | smrznuti crni sphagnum treset |
| Struktura         | fina (0 - 5 mm)               |
| pH <sub>H2O</sub> | 6,0                           |



Slika 8. Priprema za pokus i presađivanje presadnica boba (fotografija: Filipović, L.).

Tijekom cijelog trajanja pokusa, biljke su navodnjavane pomoću automatskog sustava za navodnjavanje kapanjem, kroz koji je i primjenjivana gnojidba vodotopljivim gnojivom (Poly-Feed Drip 20-20-20, Haifa) u koncentraciji od 2 g L<sup>-1</sup> (tablica 4). Intenzitet navodnjavanja bio je isti za sve biljke u pokusu, prilagođen fiziološkom stadiju razvoja biljaka, kao i temperaturi zraka u plasteniku.

Tablica 4. Značajke gnojiva korištenog u pokusu.

|                                             |                                             |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Naziv                                       | Poly-Feed Drip 20-20-20 s mikrohranivima    |
| Proizvođač                                  | Haifa                                       |
| Vrsta gnojiva                               | Vodotopljivo NPK gnojivo                    |
| Upotreba                                    | Gnojivo za fertigaciju i folijarnu prihranu |
| <b>Sastav gnojiva</b>                       |                                             |
| Ukupni dušik (kao N)                        | 20 %                                        |
| Nitratni dušik (N-NO <sub>3</sub> )         | 6 %                                         |
| Amonijačni dušik (N-NH <sub>4</sub> )       | 4 %                                         |
| Dušik iz uree (N-NH <sub>2</sub> )          | 10 %                                        |
| Fosfor (kao P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | 20 %                                        |
| Kalij (kao K <sub>2</sub> O)                | 20 %                                        |
| Željezo (Fe)*                               | 500 mg L <sup>-1</sup>                      |
| Mangan (Mn)*                                | 250 mg L <sup>-1</sup>                      |
| Bor (B)                                     | 100 mg L <sup>-1</sup>                      |
| Cink (Zn)*                                  | 75 mg L <sup>-1</sup>                       |
| Bakar (Cu)*                                 | 55 mg L <sup>-1</sup>                       |
| Molibden (Mo)                               | 35 mg L <sup>-1</sup>                       |
| * kao EDTA-helati                           |                                             |

### 3.2. Primijenjeni tretmani i eksperimentalni dizajn

Za oba pokusa korišten je split-split-plot eksperimentalni dizajn u tri ponavljanja (slika 9).

Glavni faktor (OT) - udio organske tvari primijenjen je u 2 varijante:

OT<sub>1</sub> = nepromijenjeni (prirodni) udio OT u tlu uzorkovanom na području Donje Neretve, i

OT<sub>2</sub> = povećani udio OT (OT<sub>1</sub> + treset).

Treset korišten kako bi se povećao udio OT komercijalni je treset koji se koristi u uzgoju mladih povrtnih kultura (Potgrond P, Klasman; tablica 3), u omjeru tlo:treset = 4:1 (v/v). Miješanje tla s tresetom učinjeno je kroz period od tjedan dana uz svakodnevno miješanje kako bi se postigla što bolja homogenizacija.

Podfaktor - NaCl salinitet primijenjen je u 3 varijante:

NaCl<sub>0</sub> = kontrola (bez dodatka NaCl),

NaCl<sub>50</sub> = 50 mM NaCl i

NaCl<sub>100</sub> = 100 mM NaCl.

Dva tjedna nakon presađivanja boba, kroz automatski sustav za navodnjavanje kapanjem u oba pokusa primijenjene su i dvije (iste) koncentracije natrijeva klorida (NaCl) te se koristila i kontrolna otopina (bez dodatka NaCl).

Podpodfaktor - koncentracija metala primijenjen je u 3 varijante:

Pokus 1:  $Cu_0$  = kontrola (bez kontaminacije),  
 $Cu_{250}$  = 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> i  
 $Cu_{500}$  = 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>;

Pokus 2:  $Cd_0$  = kontrola (bez kontaminacije),  
 $Cd_5$  = 5 mg Cd kg<sup>-1</sup> i  
 $Cd_{10}$  = 10 mg Cd kg<sup>-1</sup>.

Prije početka pokusa, određena je početna ukupna koncentracija Cu i Cd u tlu pripremljenom za pokus (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>) (tablica 5).

Tablica 5. Ukupna koncentracija Cu i Cd (mg kg<sup>-1</sup>) u tlu pripremljenom za pokus (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), a prije kontaminacije.

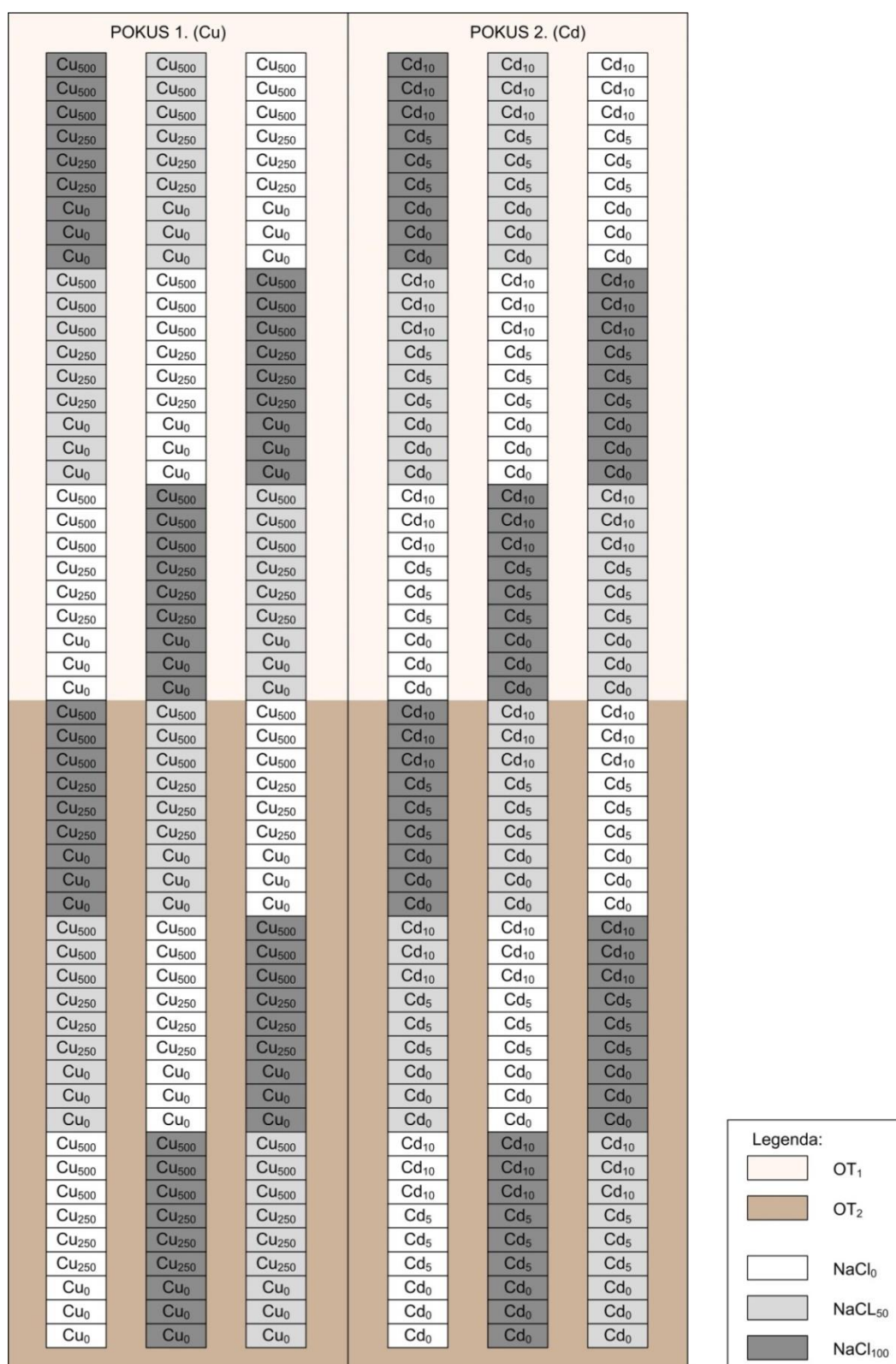
|                       | <b>Cu</b>           | <b>Cd</b> |
|-----------------------|---------------------|-----------|
|                       | mg kg <sup>-1</sup> |           |
| <b>OT<sub>1</sub></b> | 41,6                | 0,45      |
| <b>OT<sub>2</sub></b> | 39,5                | 0,46      |

Kontaminacija se provela postupnim dodavanjem metala (engl. spiking) kako bi se omogućila što bolja homogenizacija i raspodjela metala u tlu. Za kontaminaciju tla Cu koristila se otopina bakar nitrata ( $Cu(NO_3)_2 \times 3 H_2O$ ), a za kontaminaciju tla Cd otopina kadmij nitrata ( $Cd(NO_3)_2 \times 4 H_2O$ ). Kontaminirao se volumen od 5L tla te je nekontaminirano tlo dodavano postupno tijekom 30 dana, u volumenima potrebnim za postizanje ciljnih ukupnih koncentracija Cu i Cd.

Po završenoj kontaminaciji tla (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>) od svake varijante pokusa uzet je uzorak u triplicatu te su određene ukupne koncentracije Cu i Cd kako bi se provjerila ujednačenost kontaminacije (tablica 6).

Tablica 6. Ukupna koncentracija Cu i Cd (mg kg<sup>-1</sup>) nakon kontaminacije, a prije sadnje kulture.

|                       | <b>Cu<sub>250</sub></b> | <b>Cu<sub>500</sub></b> | <b>Cd<sub>5</sub></b> | <b>Cd<sub>10</sub></b> |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
|                       | mg kg <sup>-1</sup>     |                         | mg kg <sup>-1</sup>   |                        |
| <b>OT<sub>1</sub></b> | 277,8                   | 435,7                   | 4,4                   | 11,1                   |
| <b>OT<sub>2</sub></b> | 229,8                   | 466,7                   | 4,5                   | 10,7                   |



Slika 9. Shema postavljenih pokusa s glavnim faktorom udio organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), podfaktorom salinitet (NaCl<sub>0</sub>, NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) i podpodfaktorom ukupna koncentracija Cu / Cd u tlu (Cu<sub>0</sub>, Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>; odnosno Cd<sub>0</sub>, Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>).

### 3.3. Mjerenje fotosintetskih pokazatelja lista

Četiri tjedna nakon početka primjene NaCl tretmana, u fazi nalijevanja mahuna, mjereni su fotosintetski pokazatelji lista boba (slika 10):

- koncentracija intercelularnog  $\text{CO}_2$  lista ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ );
- provodljivost puči ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );
- transpiracija ( $E$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );
- intenzitet fotosinteze ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Svi navedeni pokazatelji mjereni su u triplicatu, na najmlađem fiziološki zreloom listu, na tri biljke unutar repeticije iste varijante pokusa. Mjerenja su učinjena prenosivim sustavom za mjerenje fotosinteze (LCpro+ Portable Photosynthesis System, ADC BioScientific Ltd., Great Britain). U isto vrijeme, na istom listu, mjeren je i relativni sadržaj ukupnih klorofila u mezofilu lista izražen kao indeks sadržaja klorofila (Chlorophyll Content Index - CCI) pomoću klorofilmetra (CCM-200 plus Chlorophyll Content Meter, ADC BioScientific Ltd., Great Britain).



Slika 10. Faza nalijevanja mahuna u kojoj su mjereni fotosintetski pokazatelji lista boba (fotografija: Filipović, L.).

### 3.4. Uzorkovanje tla

Pet tjedana nakon početka primjene NaCl tretmana, nakon dozrijevanja mahuna boba uzeti su uzorci tla, tako da je sa svake varijante pokusa tlo pomiješano i ručno homogenizirano u jedan prosječan reprezentativni uzorak za utvrđivanje kemijskih analiza. Zasebno su na isti način i u isto vrijeme uzeti uzorci za analizu dehidrogenazne aktivnosti u tlu te su odmah po uzimanju spremjeni na -18°C do provođenja analiza.

### 3.5. Uzorkovanje biljnog materijala

Istovremeno sa uzorkovanjem tla i na isti način uzeti su i uzorci biljnog materijala: posebno listovi, mahune i sjeme boba. Uzorak lista sastojao se od fiziološki zrelih listova uz mahunu, s tri biljke koje čine istu varijantu pokusa. Uzorak mahune sastojao se od svih mahuna, odvojenih od sjemena, s tri biljke iste varijante, a uzorak sjemena činilo je sjeme iste varijante pokusa.

### 3.6. Analize tla

Priprema uzoraka za analizu napravljena je prema standardiziranom postupku za fizikalne i kemijske analize (HRN ISO 11464:2004). Ukratko, uzorci tla osušeni su na zraku, usitnjeni i prosijani kroz sito promjera mreže 0,5 mm. pH i električna vodljivost (E.C.) tla izmjereni su u suspenziji u vodi u omjeru tlo/voda 1:5 (HRN ISO 10390:2005; HRN ISO 11265:2004) (MettlerToledo pH-metar i EC-metar MPC 227). Organski ugljik ( $C_{org}$ ) određen je sulfokromnom oksidacijom (HRN ISO 14235:1998), udio karbonata ( $CaCO_3$ ) volumetrijski pomoću Scheiblerovog kalcimetra (HRN ISO 10693:2004) te granulometrijski sastav prema standardnoj normi i proceduri (HRN ISO 11277:2004).

Za određivanje ukupne koncentracije elemenata uzorci tla raščinjeni su u zlatotopci primjenom mikrovalne tehnike u MARSXpress sustavu (CEM) (HRN ISO 11466:2004), a koncentracije Cd, Cu, Ca, Mg, P, S, Fe, Mo, Mn i Zn određene su optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, Vista MPX, Varian). Ukupne koncentracije Na i K određene su u istom ekstraktu atomskom emisijskom spektroskopijom (Atomic Absorption Spectrometer 3110, Perkin Elmer). Sve koncentracije izračunate su na bazi suhe odvage uzoraka (105 °C, 24 h). Kontrola kvalitete provedena je tako da su nasumični uzorci sprovedeni kroz analize u duplikatu te su korišteni referentni uzorci tla (sličnog matriksa) dobiveni iz međulaboratorijskih usporednih postupaka (Houba i sur., 1996). Maksimalna dopuštena relativna standardna devijacija (RSD) između duplikata uzoraka bila je 10%.

U saturacijskom vodnom ekstraktu tla utvrđene su koncentracije Na i K atomskom emisijskom spektroskopijom (Atomic Absorption Spectrometer 3110, PerkinElmer),  $\text{Cl}^-$ , P,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  i  $\text{SO}_4^{2-}$  spektrofotometrijski metodom segmentiranog protoka na ionskom analizatoru vode i ekstrakta tla (San++ Continuous Flow Analyzer, Skalar) te  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{HCO}_3^-$  kompleksometrijski titracijom.

Za određivanje pristupačne frakcije Cu i Cd korištena je ekstrakcija 0,01 M kalcijevim kloridom ( $\text{CaCl}_2$ ) (Houba i sur., 1999) jer se smatra da slaba ekstrakcijska sredstva kao što je 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  daju najbolje rezultate za procjenu transfera metala iz tla u biljke (Brun i sur., 1998; Romić i sur., 2004). Ekstrakcija s kalcijevim kloridom provodi se tako da se 5 g tla ekstrahira s 50 ml 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  tijekom 2 h pri 20 °C uz mućkanje, nakon čega slijedi filtracija i određivanje koncentracije metala u dobivenom ekstraktu optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, Vista MPX, Varian).

Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u uzorcima tla određena je 2, 3, 5 - trifenil tetrazolijev klorid (TTC) metodom (ISO 23753-1:2005(E)). TTC se dodaje u 5 g tla i mješavina se inkubira 16 h pri 25 °C. Nastali se trifenilformazan (TPF) ekstrahira pomoću acetona i određuje spektrofotometrijski pri 485 nm (UV-Vis Spectrometer Lambda 12, Perkin Elmer).

### **3.7. Analize biljnog materijala**

Uzorci biljnog materijala (list, mahuna, sjeme) osušeni su (24 h pri 60 °C), samljeveni i raščinjani u smjesi  $\text{HNO}_3\text{:H}_2\text{O}_2$  (10:1, v/v) primjenom mikrovalne tehnike u MARSXpress sustavu (CEM). Koncentracije Cd, Cu, Ca, Mg, P, S, Fe, Mo, Mn i Zn određene su optičkom emisijskom spektroskopijom induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, Vista MPX, Varian), a Na i K atomskom emisijskom spektroskopijom (Atomic Absorption Spectrometer 3110, PerkinElmer). Koncentracija klorida u biljnom tkivu mjerena je spektrofotometrijski u vodenom ekstraktu metodom segmentiranog protoka na ionskom analizatoru vode i ekstrakta tla (San++ Continuous Flow Analyzer, Skalar). Kontrola kvalitete provedena je tako da su nasumični uzorci sprovedeni kroz analize u duplikatu te su korišteni referentni uzorci biljnog materijala (sličnog matriksa) dobiveni iz međulaboratorijskih usporednih postupaka (Houba i sur., 1996). Maksimalna dopuštena relativna standardna devijacija (RSD) između duplikata uzoraka bila je 10%.

### **3.8. Modeliranje kemijske specijacije bakra i kadmija u otopini tla**

Udio (%) različitih kemijskih oblika Cu i Cd u otopini tla procijenjen je primjenom programa Visual MINTEQ (version 3.0) za određivanje kemijske ravnoteže (Gustafsson, 2006), koji se u literaturi često koristi za izračune distribucije različitih kemijskih oblika metala (Shahid i

sur., 2011). Za procjenu je korišten model Non Ideal Competitive Adsorption (NICA)-Donnan za adsorpciju kationa na otopljenu organsku tvar (DOC) uz standardnu baza podataka konstanti (Kinniburgh i sur., 1996).

Koncentracije Cu i Cd koje su korištene za procjenu distribucije njihovih vrsta u otopini tla, koncentracije su dobivene ekstrakcijom s 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ) jer se smatra da slaba ekstrakcijska sredstva kao što je 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  ekstrahiraju osim vodotopive frakcije metala i frakciju metala koji su slabo vezani u tlu, ali ipak dostupni biljkama za primanje (Ivezić i sur., i navedene reference, 2013). Također su upotrijebljeni i podaci o pH i koncentracijama elemenata dobiveni analizama saturacijskog vodnog ekstrakta tla ( $\text{mg L}^{-1}$ ) za svaku varijantu pokusa zasebno. Ionska jakost izračunata je programom za svaku varijantu pokusa zasebno pri temperaturi od 25 °C.

Koncentracije DOC-a dodijeljene su varijantama s različitim udjelom OT u tlu, i to 10  $\text{mg L}^{-1}$  za varijantu OT<sub>1</sub> i 20  $\text{mg L}^{-1}$  za varijantu OT<sub>2</sub> na temelju sljedećih kriterija: (i) pedomorfologiji tla (reljef, živi i mrtvi pokrov, dubina/boja/tekstura tla, načinu korištenja tla u trenutku uzorkovanja), (ii) koncentracijama DOC-a navedenim u literaturi za tla sličnih karakteristika (You i sur., 1999; Römkens i sur., 1999; Neff i Asner, 2001; Chantigny, 2003; Glatzel i sur., 2003; Kalbitz i sur., 2003; Ondrašek i Rengel, 2012) te (iii) činjenici da su koncentracije DOC-a u rizosfernom tlu obično nešto više nego u okolnom (engl. bulk) tlu (Cattani i sur., 2006). Udio aktivne otopljene organske tvari (engl. Dissolved Organic Matter - DOM) u odnosu na DOC je postavljen na 1,4 (Shitza i sur., 2008; Ondrašek i sur., 2009), a humusne kiseline su odabrane kao dominantne u odnosu na fulvo kiseline (You i sur., 1999). Ostali parametri u modelu nisu modificirani.

### 3.9. Statistička analiza podataka

Statistička analiza svih dobivenih podataka provedena je primjenom statističkog programa SAS (Statistical Analysis Software, SAS Institute, 2001). Analiza varijance učinjena je primjenom MIXED modela, a značajnost razlike između srednjih vrijednosti Tukeyevim testom pri  $P < 0,05$ . MIXED model generalni je linearni model koji uključuje fiksne i slučajne utjecaje na testirani parametar te omogućava praćenje utjecaja više faktora. Rezultati dobiveni pomoću MIXED modela izraženi su kao srednje vrijednosti testiranog parametra u odnosu na svaki faktor pojedinačno. Ukoliko su srednje vrijednosti testiranog parametra različite, ali ne i statistički različite u odnosu na promatrani faktor, rezultati upućuju na to da je izvor varijacije u vrijednostima testiranog parametra rezultat utjecaja nekog drugog (netestiranog) faktora. Također model kombinira utjecaj više faktora (interakcije) te rezultat prikazuje kao značajnost (svih mogućih) interakcija za vrijednost testiranog parametra pri

odabranoj granici značajnosti (npr.  $P < 0,05$ ). Tukeyev HSD (engl. Honest Significant Difference - HSD; uistinu značajna razlika) test primjenjuje se za precizniju identifikaciju statistički značajnog utjecaja određenog faktora na vrijednost testiranog parametra. Točnije, ukoliko je potvrđen statistički značajan utjecaj određenog faktora na vrijednost testiranog parametra, Tukeyev test omogućava identifikaciju (testirane) razine faktora koja je uistinu uzrokovala značajnu promjenu u vrijednosti testiranog parametra.

## 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Fizikalno-kemijske značajke tala korištenih u pokusima

Tlo korišteno u pokusu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>) prema teksturnoj podjeli praškasto je glinasta ilovača (PrGI) koja s osrednjim sadržajem karbonata pripada umjereno karbonatnim tlima (FAO, 2006) (tablica 7). Na osnovi podjele tala prema udjelu humusa prema Gračaninu (1951) tlo OT<sub>1</sub> pripada kategoriji dosta humoznih (3-5 % humusa), a tlo OT<sub>2</sub> jako humoznih tala (5-10 % humusa) (tablica 7).

Tablica 7. Sadržaj organskog ugljika (C<sub>org</sub>) te udio (%) humusa, udio kalcijeva karbonata (CaCO<sub>3</sub>) i granulometrijski sastav (%) tala korištenih u pokusima.

|                 | C <sub>org</sub>   | Humus | CaCO <sub>3</sub> | Pijesak<br>0,02-2 mm | Prah<br>0,002-0,02<br>mm | Glina<br><0,002 mm |
|-----------------|--------------------|-------|-------------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
|                 | g kg <sup>-1</sup> | %     | %                 |                      | %                        |                    |
| OT <sub>1</sub> | 26,8               | 4,6   | 12,5              | 13                   | 54                       | 33                 |
| OT <sub>2</sub> | 56,7               | 9,8   | 10,8              | 17                   | 52                       | 31                 |

### 4.2. Bakar

#### 4.2.1. Elementarni sastav tla

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> uzrokovao je statistički značajno smanjenje pH i ukupnih koncentracija Ca, Mg, Fe, Mn i Zn te povećanje ukupnih koncentracija Cu, S i Mo (tablica 8).

Navodnjavanje NaCl zaslanjenom vodom statistički je značajno povećalo pH tla u odnosu na kontrolnu varijantu, ali bez razlike između zaslanjenih varijanti (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) (tablica 8). Povećanje stupnja zaslanjenosti tla očekivano je povećalo E.C. i ukupnu koncentraciju Na u tlu, proporcionalno tretmanima zaslanjivanja. Utvrđena je i povećana ukupna koncentracija P u tlu s povećanjem stupnja zaslanjenosti, ali bez razlike između NaCl tretmana. Navodnjavanje NaCl zaslanjenom vodom također je uzrokovalo smanjenje ukupne koncentracije K, Mg i Fe u tlu u odnosu na kontrolnu varijantu (bez NaCl tretmana), ali bez očitog trenda smanjenja koncentracije u odnosu na NaCl tretmane (tablica 8).

Kontaminacija tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) uzrokovala je statistički značajno povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu, proporcionalno tretmanima kontaminacije. Isto tako, utvrđeno je

smanjenje E.C. i povećanje ukupne koncentracije P i Zn s porastom ukupne koncentracije Cu u tlu (tablica 8).

Dodatno, interakcija OT\*Cu statistički je visoko značajno ( $P < 0,01$ ) utjecala na ukupnu koncentraciju Cu u tlu, dok je interakcija OT\*NaCl značajno ( $P < 0,05$ ) utjecala na ukupnu koncentraciju K u tlu, a interakcija NaCl\*Cu ( $P < 0,05$ ) na E.C. tla (tablica 8).

Tablica 8. Utjecaj organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na pH, E.C. i ukupne koncentracije elemenata tla.

| Tretman             | pH               | E.C.               | Cu                  | Na                 | K      | Ca   | Mg    | P    | Fe   | S                   | Cd   | Mo   | Mn   | Zn   |
|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------|------|-------|------|------|---------------------|------|------|------|------|
|                     | H <sub>2</sub> O | dS m <sup>-1</sup> | mg kg <sup>-1</sup> | g kg <sup>-1</sup> |        |      |       |      |      | mg kg <sup>-1</sup> |      |      |      |      |
| OT <sub>1</sub>     | 7,7a             | 2a                 | 252b                | 2a                 | 6a     | 70a  | 13,8a | 1a   | 31a  | 774b                | 0,6a | 1,1b | 719a | 85a  |
| OT <sub>2</sub>     | 7,5b             | 2a                 | 264a                | 2a                 | 6a     | 66b  | 13b   | 1a   | 29b  | 924a                | 0,5a | 1,5a | 660b | 82b  |
| NaCl <sub>0</sub>   | 7,5b             | 1c                 | 253a                | 0,4c               | 7a     | 68a  | 13,7a | 1,2b | 31a  | 856a                | 0,6a | 1a   | 696a | 85a  |
| NaCl <sub>50</sub>  | 7,6a             | 2,2b               | 259a                | 2b                 | 5c     | 69a  | 13,2b | 1,3a | 30b  | 848a                | 0,5a | 1a   | 689a | 83a  |
| NaCl <sub>100</sub> | 7,6a             | 3a                 | 262a                | 3a                 | 6b     | 68a  | 13,2b | 1,3a | 30b  | 842a                | 0,5a | 1a   | 683a | 83a  |
| Cu <sub>0</sub>     | 7,6a             | 2,2a               | 40c                 | 2a                 | 6a     | 68a  | 13a   | 1,2b | 30a  | 837a                | 0,6a | 1a   | 692a | 82b  |
| Cu <sub>250</sub>   | 7,6a             | 2b                 | 227b                | 2a                 | 6a     | 69a  | 14a   | 1,3a | 30a  | 853a                | 0,5a | 1a   | 693a | 84a  |
| Cu <sub>500</sub>   | 7,6a             | 2b                 | 506a                | 2a                 | 6a     | 68a  | 13a   | 1,3a | 30a  | 856a                | 0,5a | 1a   | 682a | 85a  |
| <i>Interakcije</i>  |                  |                    |                     |                    |        |      |       |      |      |                     |      |      |      |      |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.             | n.s.               | n.s.                | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.             | n.s.               | n.s.                | n.s.               | P<0,05 | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*Cu               | n.s.             | n.s.               | P<0,01              | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| NaCl*Cu             | n.s.             | P<0,05             | n.s.                | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

#### 4.2.2. Ionski sastav saturacijskog vodnog ekstrakta tla

Povećanje udjela OT u tlu kod varijante OT<sub>2</sub> statistički je značajno povećalo koncentracije K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i ukupnog P u saturacijskom vodnom ekstraktu tla (tablica 9).

Povećanje stupnja zaslanjenosti tla (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) također je utjecalo na koncentracije elemenata u saturacijskom vodnom ekstraktu tla, i to povećavajući koncentracije Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> i Cl<sup>-</sup> proporcionalno tretmanima zaslanjivanja, kao i koncentraciju ukupnog P, ali samo pri najvećem tretmanu zaslanjivanja (tablica 9). Također je s primjenom NaCl utvrđeno i statistički značajno, tretmanima proporcionalno, smanjenje koncentracije NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla.

Kontaminacija tla Cu smanjila je koncentracije Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> proporcionalno tretmanima (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) te koncentracije K<sup>+</sup> i ukupnog P, ali bez razlike između tretmana (tablica 9). Isto tako, utvrđeno je i povećanje koncentracije NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla pri najvećem tretmanu kontaminacije tla Cu (Cu<sub>500</sub>).

Također, interakcija NaCl\*Cu značajno je (P<0,05) utjecala na koncentraciju Na<sup>+</sup>, a visoko značajno (P<0,01) na koncentracije K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla. Interakcija OT\*NaCl bila je značajna (P<0,05) za koncentraciju Ca<sup>2+</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla (tablica 9).

Tablica 9. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na koncentracije elemenata u saturacijskom vodnom ekstraktu tla.

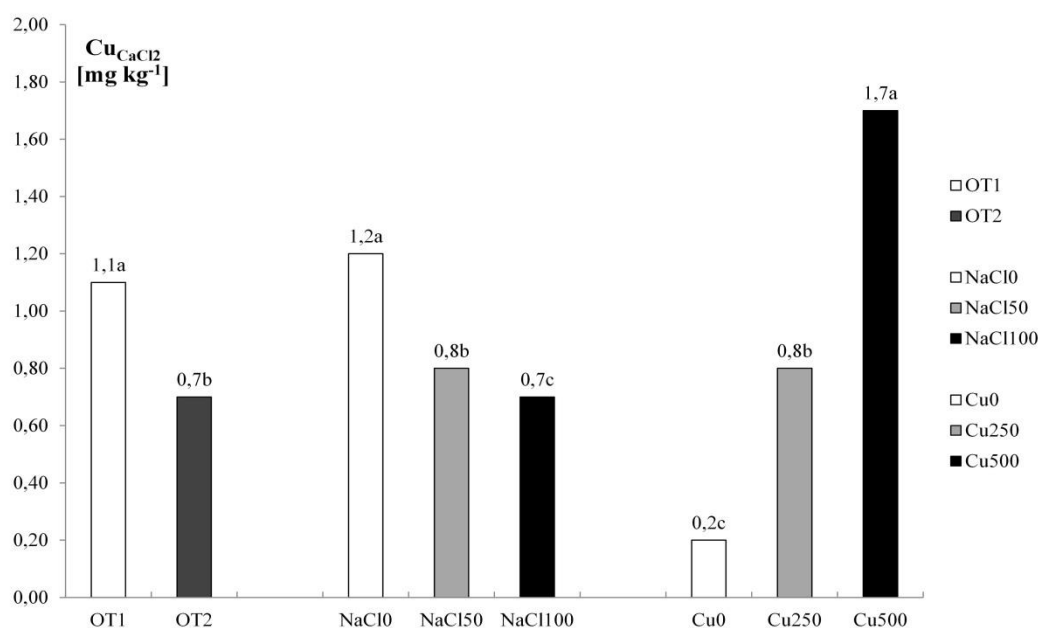
| Tretman             | Na <sup>+</sup>   | K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Cl <sup>-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | P    |
|---------------------|-------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------|
|                     | g L <sup>-1</sup> |                |                  |                  |                               |                 |                              | mg L <sup>-1</sup>           |                               |      |
| OT <sub>1</sub>     | 1a                | 0,15b          | 1a               | 0,2a             | 0,25b                         | 2a              | 3a                           | 5a                           | 58b                           | 0,6b |
| OT <sub>2</sub>     | 1a                | 0,17a          | 1a               | 0,2a             | 0,3a                          | 3a              | 3a                           | 5a                           | 117a                          | 0,8a |
| NaCl <sub>0</sub>   | 0,1c              | 0,12c          | 1c               | 0,2a             | 0,3a                          | 0,2c            | 3,4a                         | 4a                           | 109a                          | 0,6b |
| NaCl <sub>50</sub>  | 2b                | 0,17b          | 1,4b             | 0,2a             | 0,3a                          | 3b              | 2,9b                         | 5a                           | 87b                           | 0,6b |
| NaCl <sub>100</sub> | 3a                | 0,19a          | 1,5a             | 0,2a             | 0,3a                          | 5a              | 2,7c                         | 6a                           | 67c                           | 0,8a |
| Cu <sub>0</sub>     | 1,6a              | 0,17a          | 1a               | 0,2a             | 0,3a                          | 3,1a            | 2,9b                         | 6a                           | 94a                           | 0,8a |
| Cu <sub>250</sub>   | 1,4b              | 0,15b          | 1a               | 0,2a             | 0,3a                          | 2,7b            | 2,8b                         | 5a                           | 84a                           | 0,6b |
| Cu <sub>500</sub>   | 1,3c              | 0,15b          | 1a               | 0,2a             | 0,3a                          | 2,5c            | 3,2a                         | 5a                           | 85a                           | 0,6b |
| <i>Interakcije</i>  |                   |                |                  |                  |                               |                 |                              |                              |                               |      |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.              | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.              | n.s.           | P<0,05           | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| OT*Cu               | n.s.              | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| NaCl*Cu             | P<0,05            | P<0,01         | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | P<0,01          | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

#### 4.2.3. Ekstrakcija bakra iz tla s 0,01 M CaCl<sub>2</sub>

Statistički značajne razlike utvrđene su za koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla s obzirom na sve tretmane primijenjene u pokusu (slika 11). Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub>, kao i primjena NaCl, značajno je smanjila koncentraciju Cu, dok je kontaminacija tla (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) značajno povećala koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla.

Interakcije OT\*NaCl, OT\*Cu i NaCl\*Cu utjecale su visoko značajno (P<0,01) na koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla (slika 11).



| Interakcije | Cu <sub>CaCl2</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ] |
|-------------|--------------------------------------------|
| OT*NaCl*Cu  | n.s.                                       |
| OT*NaCl     | P<0,01                                     |
| OT*Cu       | P<0,01                                     |
| NaCl*Cu     | P<0,01                                     |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,01;  
n.s.: nije značajna („non-significant“) interakcija.

Slika 11. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla.

#### 4.2.4. Modeliranje kemijske specijacije bakra u otopini tla

Modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cu u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan jasno upućuje na dominaciju Cu-kompleksa s huminskim kiselinama u otopini tla, neovisno o tretmanima pokusa (tablica 10). Ipak, primjetno je manje povećanje udjela kemijskog oblika  $\text{CuCO}_3$  u otopini tla (%) s porastom kontaminacije tla Cu ( $\text{Cu}_{250}$  i  $\text{Cu}_{500}$ ) kod tretmana u kojima nije povećan udio OT ( $\text{OT}_1$ ) (tablica 10).

Tablica 10. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $\text{OT}_1$  i  $\text{OT}_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM) i kontaminacije tla bakrom (250 i 500  $\text{mg kg}^{-1}$ ) na procjenu kemijske specijacije Cu u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan.

| Tretman             | Kemijski oblik <sup>1,2</sup> | $\text{OT}_1$                    |                   |                   | $\text{OT}_2$                    |                   |                   |
|---------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
|                     |                               | $\text{Cu}_0$                    | $\text{Cu}_{250}$ | $\text{Cu}_{500}$ | $\text{Cu}_0$                    | $\text{Cu}_{250}$ | $\text{Cu}_{500}$ |
|                     |                               | Udio u ukupnoj koncentraciji (%) |                   |                   | Udio u ukupnoj koncentraciji (%) |                   |                   |
| $\text{NaCl}_0$     | $\text{CuCO}_3$ (aq)          | 0                                | 1                 | 4                 | 0                                | 0                 | 0                 |
|                     | HA1-Cu(6)(aq)                 | 1                                | 4                 | 7                 | 1                                | 2                 | 4                 |
|                     | HA2-Cu(6)(aq)                 | 99                               | 95                | 89                | 99                               | 98                | 96                |
| $\text{NaCl}_{50}$  | $\text{CuCO}_3$ (aq)          | 0                                | 1                 | 4                 | 0                                | 0                 | 0                 |
|                     | HA1-Cu(6)(aq)                 | 1                                | 3                 | 6                 | 1                                | 2                 | 4                 |
|                     | HA2-Cu(6)(aq)                 | 99                               | 96                | 90                | 99                               | 98                | 96                |
| $\text{NaCl}_{100}$ | $\text{CuCO}_3$ (aq)          | 0                                | 1                 | 4                 | 0                                | 0                 | 0                 |
|                     | HA1-Cu(6)(aq)                 | 1                                | 3                 | 6                 | 1                                | 2                 | 4                 |
|                     | HA2-Cu(6)(aq)                 | 99                               | 96                | 90                | 99                               | 98                | 96                |

<sup>1</sup>Kemijski oblici čiji je udio u ukupnoj koncentraciji <0,5 % nisu prikazane.

<sup>2</sup>HA-Cu: Cu kompleksiran s humusnim kiselinama (engl. Humic Acids - HA) preko 1-karboksilnih i 2-fenolnih funkcionalnih skupina.

#### 4.2.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu

Povećanje udjela OT tla kod varijante OT<sub>2</sub> statistički je značajno povećalo DHA u tlu (tablica 11).

Povećanje stupnja zaslanjenosti tla primjenom NaCl, kao i povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) značajno su smanjili aktivnost enzima dehidrogenaza u tlu, dok interakcije između varijanti pokusa nisu bile značajne za DHA u tlu (tablica 11).

Tablica 11. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na DHA u tlu i koncentraciju kemijskih oblika Cu u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ.

| Tretman             | TLO                                             | KEMIJSKI OBLIK Cu U OTOPINI TLA <sup>1,2</sup> |                   |
|---------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|
|                     | DHA                                             | CuCO <sub>3</sub>                              | Cu <sub>org</sub> |
|                     | μg TPF g <sup>-1</sup> suho tlo h <sup>-1</sup> | mg L <sup>-1</sup>                             |                   |
| OT <sub>1</sub>     | 2,3b                                            | 0,0044a                                        | 0,11a             |
| OT <sub>2</sub>     | 3,8a                                            | 0,0002b                                        | 0,07b             |
| NaCl <sub>0</sub>   | 3,6a                                            | 0,004a                                         | 0,12a             |
| NaCl <sub>50</sub>  | 2,8b                                            | 0,002b                                         | 0,08b             |
| NaCl <sub>100</sub> | 2,6c                                            | 0,001c                                         | 0,07c             |
| Cu <sub>0</sub>     | 4a                                              | 0,000c                                         | 0,02c             |
| Cu <sub>250</sub>   | 3b                                              | 0,001b                                         | 0,08b             |
| Cu <sub>500</sub>   | 2c                                              | 0,005a                                         | 0,16a             |
| <i>Interakcije</i>  |                                                 |                                                |                   |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.                                            | P<0,01                                         | n.s.              |
| OT*NaCl             | n.s.                                            | P<0,01                                         | P<0,05            |
| OT*Cu               | n.s.                                            | P<0,01                                         | P<0,01            |
| NaCl*Cu             | n.s.                                            | P<0,01                                         | P<0,01            |

<sup>1</sup>Kemijski oblici čiji je udio u ukupnoj koncentraciji <0,5 % nisu prikazane

<sup>2</sup>Cu<sub>org</sub>: Cu kompleksiran s humusnim kiselinama

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05;

n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija

Nadalje, na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ izračunate su realne koncentracije najznačajnijih kemijskih oblika Cu prisutnih u otopini tla kako bi se dobio utjecaj na DHA (tablica 11).

Korelacijskom matricom (gornji trokut) prikazane su korelacije između ukupne koncentracije Cu u tlu, koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla, koncentracija najznačajnijih

kemijskih oblika Cu u otopini tla ( $\text{CuCO}_3$  i  $\text{Cu}_{\text{org}}$ -Cu kompleksiran s humusnim kiselinama) i DHA u tlu (tablica 12).

DHA u tlu značajno je ( $P < 0,01$ ) negativno korelirala s ukupnom koncentracijom Cu u tlu ( $r = -0,576$ ), kao i koncentracijom Cu u  $0,01 \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla ( $r = -0,586$ ). Također je utvrđena i negativna korelacija ( $P < 0,01$ ) između aktivnosti dehidrogenaza u tlu i izračunatih koncentracija  $\text{CuCO}_3$  i  $\text{Cu}_{\text{org}}$  u otopini tla, s većim korelacijskim koeficijentom između DHA u tlu i koncentracije  $\text{Cu}_{\text{org}}$  ( $r = -0,589$ ) (tablica 12).

Tablica 12. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cu u tlu, koncentraciju Cu u  $0,01 \text{ M}$   $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla, koncentraciju kemijskih oblika Cu u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ i DHA u tlu.

|                             | $\text{Cu}_{\text{ukupni}}$ | $\text{Cu}_{\text{CaCl}_2}$ | Kemijski oblik Cu u otopini tla <sup>1</sup> |                          | DHA     |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|---------|
|                             |                             |                             | $\text{CuCO}_3$                              | $\text{Cu}_{\text{org}}$ |         |
| $\text{Cu}_{\text{ukupni}}$ | 1                           | 0,791*                      | 0,438*                                       | 0,804*                   | -0,576* |
| $\text{Cu}_{\text{CaCl}_2}$ |                             | 1                           | 0,825*                                       | 0,998*                   | -0,586* |
| $\text{CuCO}_3$             |                             |                             | 1                                            | 0,798*                   | -0,412* |
| $\text{Cu}_{\text{org}}$    |                             |                             |                                              | 1                        | -0,589* |
| DHA                         |                             |                             |                                              |                          | 1       |

<sup>1</sup> $\text{Cu}_{\text{org}}$ : Cu kompleksiran s humusnim kiselinama

\*korelacija značajna pri  $P < 0,01$

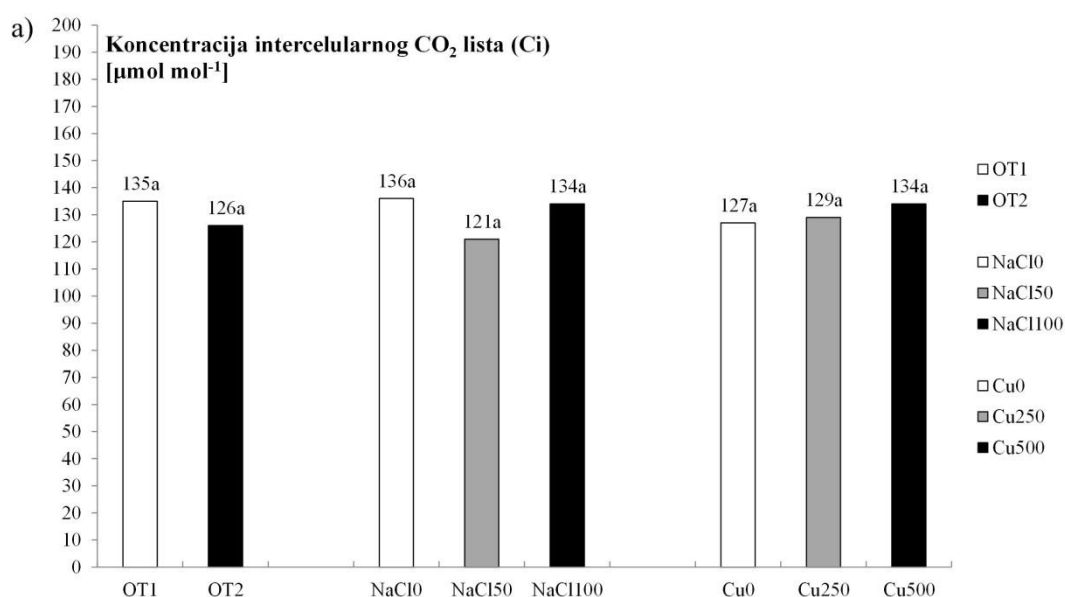
#### 4.2.6. Fotosintetski pokazatelji lista boba

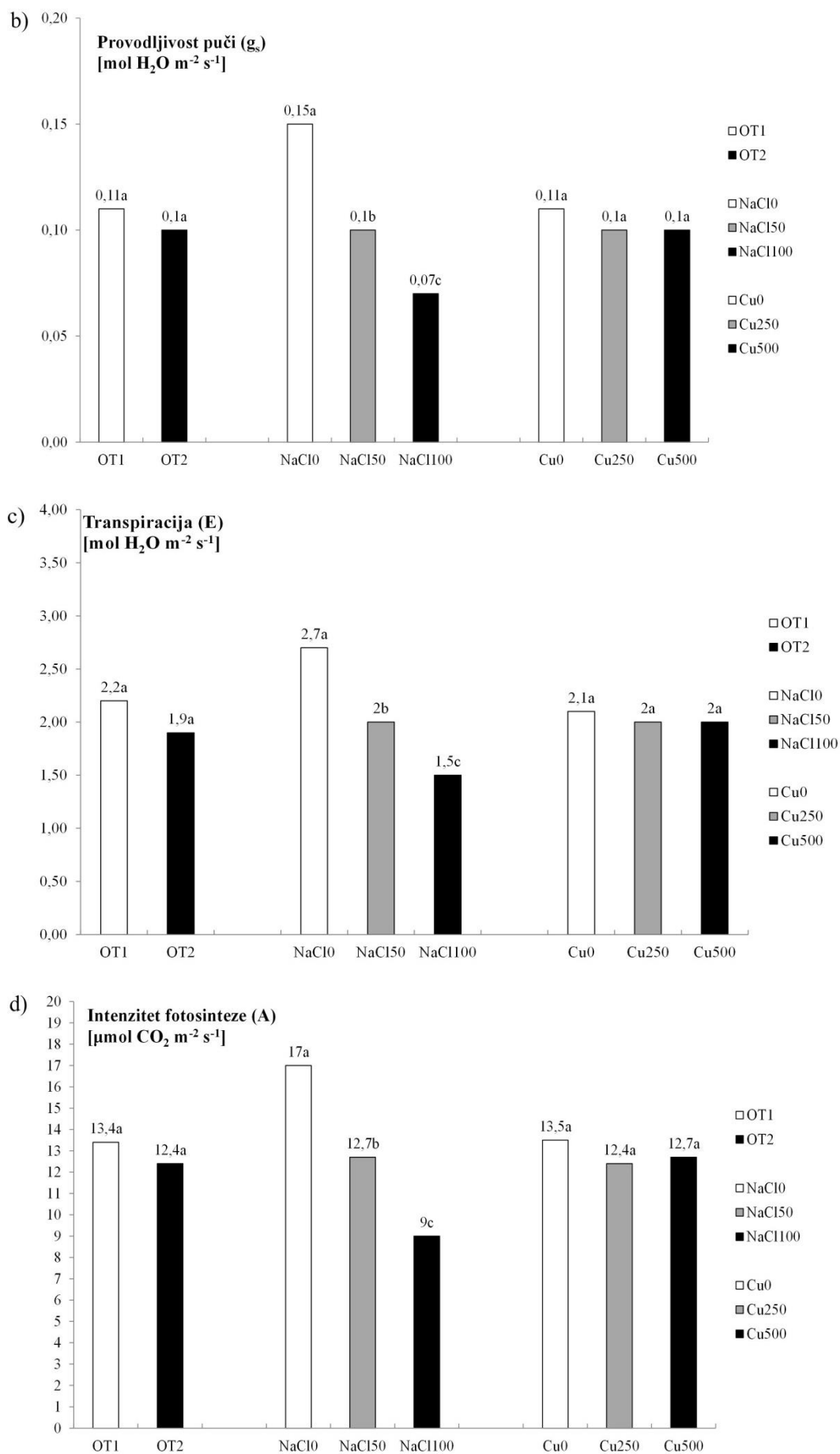
Povećanje udjela OT u tlu kod OT<sub>2</sub> tretmana nije značajno utjecalo ni na jedan od mjerenih fotosintetskih pokazatelja lista boba: koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista (Ci), provodljivost puči (g<sub>s</sub>), transpiraciju (E), intenzitet fotosinteze (A), niti na indeks sadržaja klorofila (CCI) (slika 12 a, b, c, d, e).

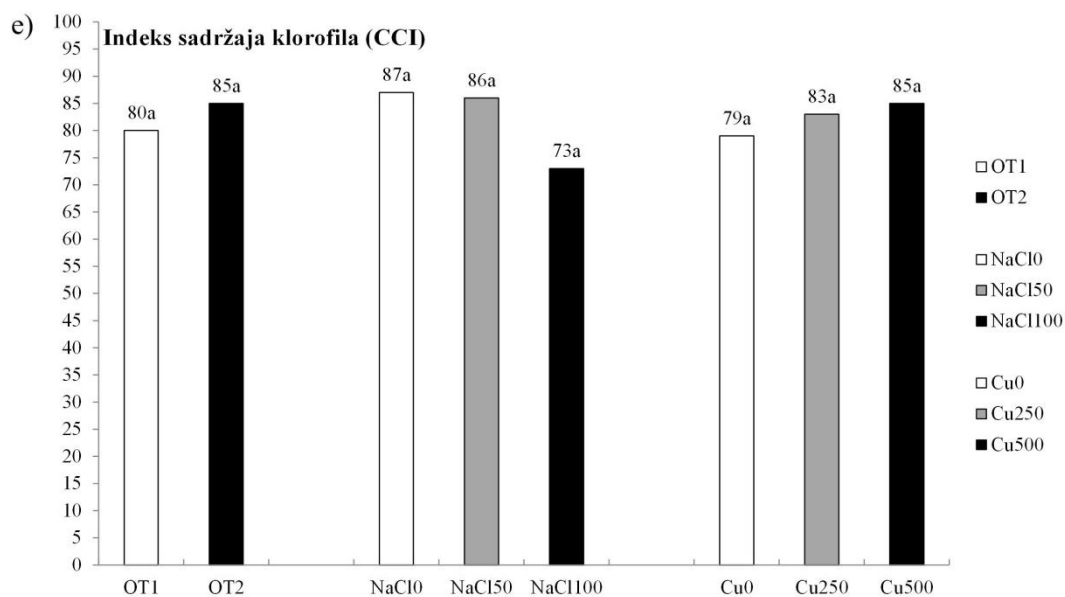
Međutim, povećanje stupnja NaCl zaslanjenosti uzrokovalo je značajno smanjenje provodljivosti puči lista boba (g<sub>s</sub>), što se negativno odrazilo na transpiraciju (E) i intenzitet fotosinteze (A) (slika 12 b, c, d). NaCl nije značajno utjecao na koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista (Ci), niti na indeks sadržaja klorofila (CCI) (slika 12 a, e).

Kontaminacija tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) nije utjecala na mjerene fotosintetske pokazatelje lista boba (slika 12 a, b, c, d, e).

Ipak, interakcija OT\*NaCl\*Cu značajno je utjecala (P=0,05) na provodljivosti puči lista boba (slika 12).







| Interakcije | Koncentracija                                                        |                                                                           |                                                                                              |                                                                                    |                                 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|             | intercelularnog CO <sub>2</sub> lista (Ci)<br>μmol mol <sup>-1</sup> | Transpiracija (E)<br>mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Provodljivost puči (g <sub>s</sub> )<br>mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Intenzitet fotosinteze (A)<br>μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Indeks sadržaja klorofila (CCI) |
| OT*NaCl*Cu  | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | P=0,05                                                                                       | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| OT*NaCl     | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| OT*Cu       | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| NaCl*Cu     | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri  $P < 0,05$ ; n.s.: nije značajna („non-significant“) interakcija.

Slika 12. Utjecaj udjela organske tvari u tlu ( $OT_1$  i  $OT_2$ ), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na fotosintetske pokazatelje lista boba: a) koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista (Ci, μmol mol<sup>-1</sup>), b) provodljivost puči ( $g_s$ , mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), c) transpiraciju (E, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), d) intenzitet fotosinteze (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) i e) indeks sadržaja klorofila (CCI).

#### 4.2.7. Elementarni sastav lista boba

Povećanje udjela OT ( $OT_2$ ) statistički je značajno povećalo koncentracije Mg i Mo u listu boba (tablica 13).

Navodnjavanje NaCl zaslanjenom vodom uzrokovalo je značajno povećanje koncentracija Na i Cl u listu boba, čak na  $64 \text{ g Na kg}^{-1}$  i  $96 \text{ g Cl kg}^{-1}$  pri najvećem tretmanu zaslanjivanja ( $NaCl_{100}$ ) (tablica 13). Također je, proporcionalno tretmanima zaslanjivanja, utvrđeno i značajno smanjenje suhe tvari i koncentracija K i P, ali i smanjenje koncentracija Ca, Mg, S i Mn, no bez značajne razlike između primijenjenih tretmana ( $NaCl_{50}$  i  $NaCl_{100}$ ).

Kontaminacija tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ) značajno je povećala koncentracije Cu i Na u listu boba (tablica 13). Koncentracija Mg u listu boba značajno je smanjena povećanjem ukupne koncentracije Cu u tlu, ali bez razlike između primijenjenih tretmana ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ). Koncentracije Ca i Mn u listu boba također su smanjene, ali bez vidljivog trenda smanjenja u odnosu na tretmane kontaminacije tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ). Naime, iako su najviše koncentracije Ca i Mn utvrđene u listu kontrolnih biljaka, najniže koncentracije utvrđene su pri srednjem tretmanu kontaminacije tla Cu ( $Cu_{250}$ ) (tablica 13).

Dodatno, interakcija NaCl\*Cu bila je značajna ( $P < 0,05$ ) za koncentraciju Mg u listu boba (tablica 13).

Tablica 13. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u listu boba.

| Tretman             | Cu<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na   | K    | Ca   | Mg<br>g kg <sup>-1</sup> | Cl   | P    | S    | Cd<br>mg kg <sup>-1</sup> | Fe    | Zn   | Mn   | Mo   |
|---------------------|---------------------------|-------------------|------|------|------|--------------------------|------|------|------|---------------------------|-------|------|------|------|
| OT <sub>1</sub>     | 13a                       | 12a               | 39a  | 18a  | 31a  | 2,9b                     | 59a  | 3a   | 3a   | <0,15a*                   | 759a  | 13a  | 79a  | 1b   |
| OT <sub>2</sub>     | 11a                       | 13a               | 36a  | 17a  | 30a  | 3,4a                     | 54a  | 3a   | 3a   | <0,15a*                   | 885a  | 14a  | 78a  | 4a   |
| NaCl <sub>0</sub>   | 12a                       | 15a               | 3c   | 37a  | 38a  | 4a                       | 10c  | 3,3a | 2,8a | <0,15a*                   | 416a  | 14a  | 91a  | 2a   |
| NaCl <sub>50</sub>  | 13a                       | 12b               | 45b  | 11b  | 26b  | 3b                       | 62b  | 2,5b | 2,4b | <0,15a*                   | 1012a | 13a  | 72b  | 2a   |
| NaCl <sub>100</sub> | 12a                       | 11c               | 64a  | 6c   | 28b  | 3b                       | 96a  | 2,1c | 2,4b | <0,15a*                   | 1040a | 13a  | 72b  | 2a   |
| Cu <sub>0</sub>     | 9c                        | 13a               | 33c  | 19a  | 33a  | 4a                       | 52a  | 3a   | 3a   | <0,15a*                   | 795a  | 14a  | 83a  | 3a   |
| Cu <sub>250</sub>   | 12b                       | 12a               | 38b  | 19a  | 28b  | 3b                       | 56a  | 3a   | 3a   | <0,15a*                   | 763a  | 14a  | 73b  | 2a   |
| Cu <sub>500</sub>   | 16a                       | 12a               | 40a  | 16a  | 31ba | 3b                       | 60a  | 3a   | 3a   | <0,15a*                   | 909a  | 13a  | 79ba | 2a   |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |      |      |      |                          |      |      |      |                           |       |      |      |      |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                      | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                      | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*Cu               | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                      | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| NaCl*Cu             | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,05                   | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                      | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*granica detekcije instrumenta

#### 4.2.8. Elementarni sastav mahune boba

Povećanje udjela OT ( $OT_2$ ) statistički je značajno smanjilo koncentraciju Cu u mahuni boba (tablica 14). Također je s navedenim tretmanom ( $OT_2$ ) utvrđeno i povećanje koncentracije Mo u tkivu mahune.

Primjena NaCl uzrokovala je značajno povećanje koncentracija Na i Cl te Mo u mahuni boba, proporcionalno tretmanima zaslanjivanja (tablica 14). Utvrđeno je i značajno, tretmanima zaslanjivanja proporcionalno, smanjenje koncentracije Mg u mahuni boba, kao i smanjenje koncentracija Ca i S, ali bez značajne razlike između primijenjenih tretmana zaslanjivanja ( $NaCl_{50}$  i  $NaCl_{100}$ ).

Kontaminacija tla Cu značajno je, proporcionalno tretmanima ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ), povećala koncentraciju Cu u mahuni boba (tablica 14). Utvrđeno je i povećanje koncentracije Mn, ali samo kod najvećeg tretmana kontaminacije tla Cu ( $Cu_{500}$ ). Također, kontaminacija tla Cu značajno je smanjila koncentraciju Zn u mahuni boba, proporcionalno tretmanima ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ).

Interakcija  $OT \cdot NaCl$  bila je značajna ( $P < 0,05$ ) za koncentraciju Cu, a visoko značajna ( $P < 0,01$ ) za koncentraciju Mo u mahuni boba (tablica 14). Interakcija  $OT \cdot Cu$  značajno je ( $P < 0,05$ ) utjecala na koncentraciju Mg, a interakcija  $NaCl \cdot Cu$  ( $P < 0,05$ ) na koncentraciju Cu u mahuni boba.

Tablica 14. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u mahuni boba.

| Tretman             | Cu<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na   | K    | Ca   | Mg<br>g kg <sup>-1</sup> | Cl   | P    | S    | Cd      | Fe   | Zn   | Mn   | Mo     |
|---------------------|---------------------------|-------------------|------|------|------|--------------------------|------|------|------|---------|------|------|------|--------|
|                     |                           |                   |      |      |      |                          |      |      |      |         |      |      |      |        |
| OT <sub>1</sub>     | 8a                        | 14a               | 5a   | 18a  | 2a   | 1a                       | 6a   | 3a   | 1a   | <0,15a* | 34a  | 10a  | 12a  | 3b     |
| OT <sub>2</sub>     | 7b                        | 14a               | 5a   | 18a  | 2a   | 1a                       | 7a   | 3a   | 1a   | <0,15a* | 41a  | 11a  | 13a  | 10a    |
| NaCl <sub>0</sub>   | 8a                        | 14a               | 0,3c | 18a  | 2,4a | 1,4a                     | 1c   | 3a   | 0,9a | <0,15a* | 40a  | 10a  | 13a  | 5c     |
| NaCl <sub>50</sub>  | 7a                        | 14a               | 6b   | 18a  | 1,7b | 1,2b                     | 7b   | 3a   | 0,8b | <0,15a* | 42a  | 11a  | 12a  | 7b     |
| NaCl <sub>100</sub> | 7a                        | 14a               | 10a  | 18a  | 1,8b | 1,1c                     | 12a  | 3a   | 0,8b | <0,15a* | 32a  | 10a  | 12a  | 8a     |
| Cu <sub>0</sub>     | 5c                        | 14a               | 5a   | 18a  | 2a   | 1a                       | 6a   | 3a   | 1a   | <0,15a* | 32a  | 12a  | 12b  | 7a     |
| Cu <sub>250</sub>   | 8b                        | 14a               | 5a   | 18a  | 2a   | 1a                       | 7a   | 3a   | 1a   | <0,15a* | 48a  | 10b  | 12b  | 7a     |
| Cu <sub>500</sub>   | 9a                        | 14a               | 6a   | 18a  | 2a   | 1a                       | 7a   | 3a   | 1a   | <0,15a* | 33a  | 9c   | 14a  | 6a     |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |      |      |      |                          |      |      |      |         |      |      |      |        |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.    | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| OT*NaCl             | P<0,05                    | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.    | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,01 |
| OT*Cu               | n.s.                      | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,05                   | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.    | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| NaCl*Cu             | P<0,05                    | n.s.              | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                     | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.    | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*granica detekcije instrumenta

#### **4.2.9. Elementarni sastav sjemena boba**

Povećanje udjela OT ( $OT_2$ ) statistički je značajno povećalo koncentraciju Zn i Mo, a smanjilo koncentraciju Mn u sjemenu boba (tablica 15).

Povećanje stupnja zaslanjenosti tla primjenom NaCl značajno je povećalo koncentracije Na, Cl i Mo u sjemenu boba (tablica 15). Utvrđeno je i značajno smanjenje koncentracija Cu, Zn i P u sjemenu boba, proporcionalno tretmanima NaCl zaslanjivanja, ali i smanjenje koncentracija Ca i S, međutim bez značajne razlike između NaCl tretmana ( $NaCl_{50}$  i  $NaCl_{100}$ ).

Kontaminacija tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ) značajno je povećala koncentracije Cu i Mn u sjemenu boba (tablica 15). Koncentracija Mg u listu boba značajno je smanjena povećanjem ukupne koncentracije Cu u tlu, ali bez razlike između primijenjenih tretmana ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ). Koncentracije Zn i Mo u sjemenu boba također su značajno smanjene, ali bez razlike između tretmana kontaminacije tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ) za koncentraciju Mo (tablica 15).

Nadalje, interakcija  $OT \times Cu$  bila je značajna ( $P < 0,05$ ) za koncentraciju P i Mo u sjemenu boba (tablica 15).

Tablica 15. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla bakrom (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u sjemenu boba.

| Tretman             | Cu<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na                 | K    | Ca   | Mg   | Cl   | P      | S    | Cd                  | Fe   | Zn   | Mn   | Mo     |
|---------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|------|------|------|------|--------|------|---------------------|------|------|------|--------|
|                     |                           |                   | g kg <sup>-1</sup> |      |      |      |      |        |      | mg kg <sup>-1</sup> |      |      |      |        |
| OT <sub>1</sub>     | 14a                       | 21a               | 0,3a               | 17a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a     | 1,5a | <0,15a**            | 46a  | 20b  | 11a  | 7b     |
| OT <sub>2</sub>     | 14a                       | 21a               | 0,4a               | 17a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a     | 1,5a | <0,15a**            | 52a  | 24a  | 10b  | 19a    |
| NaCl <sub>0</sub>   | 15a*                      | 20a               | 0,05c              | 18a  | 1a   | 1a   | 0,8c | 6,4a   | 1,6a | <0,15a**            | 57a  | 24a  | 10a  | 11c    |
| NaCl <sub>50</sub>  | 14b*                      | 21a               | 0,4b               | 18a  | 0,7b | 1a   | 1,2b | 6b     | 1,4b | <0,15a**            | 45a  | 22b  | 10a  | 13b    |
| NaCl <sub>100</sub> | 12c*                      | 22a               | 0,6a               | 17a  | 0,7b | 1a   | 1,3a | 5,7c   | 1,4b | <0,15a**            | 44a  | 21c  | 10a  | 14a    |
| Cu <sub>0</sub>     | 11c                       | 21a               | 0,3a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a     | 1,5a | <0,15a**            | 53a  | 27a  | 9c   | 14a    |
| Cu <sub>250</sub>   | 14b                       | 20a               | 0,4a               | 17a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a     | 1,5a | <0,15a**            | 42a  | 21b  | 10b  | 12b    |
| Cu <sub>500</sub>   | 16a                       | 21a               | 0,3a               | 17a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a     | 1,5a | <0,15a**            | 52a  | 19c  | 11a  | 12b    |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |                    |      |      |      |      |        |      |                     |      |      |      |        |
| OT*NaCl*Cu          | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| OT*NaCl             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| OT*Cu               | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,05 | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,05 |
| NaCl*Cu             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*P=0,05; \*\*granica detekcije instrumenta

#### 4.2.10. Korelacije između ukupne koncentracije Cu u tlu, koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i tkivu boba

Korelacije između ukupnih koncentracija Cu u tlu, zatim 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla te u tkivu boba (list, mahuna, sjeme) prikazane su u korelacijskoj matrici (gornji trokut) (tablica 16), iz koje je vidljivo da je svaka korelacija između navedenih parametara bila visoko značajna ( $P < 0,01$ ). Korelacijski koeficijent bio je visok ( $r = 0,800$ ) za korelaciju između ukupne koncentracije Cu u tlu i koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla. Također je utvrđen visok korelacijski koeficijent ( $r = 0,803$ ) između koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracije Cu u mahuni boba. Koncentracije Cu u tkivu boba (list, mahuna, sjeme) međusobno su značajno korelirale, s korelacijskim koeficijentima u rasponu od  $r = 0,408$  -  $0,469$  (tablica 16).

Tablica 16. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cu u tlu, koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentraciju Cu u listu, mahuni i sjemenu boba.

|                                | Cu <sub>ukupni</sub> | Cu <sub>CaCl<sub>2</sub></sub> | Cu <sub>list</sub> | Cu <sub>mahuna</sub> | Cu <sub>sjeme</sub> |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| Cu <sub>ukupni</sub>           | 1                    | 0,800*                         | 0,491*             | 0,683*               | 0,514*              |
| Cu <sub>CaCl<sub>2</sub></sub> |                      | 1                              | 0,529*             | 0,803*               | 0,589*              |
| Cu <sub>list</sub>             |                      |                                | 1                  | 0,408*               | 0,417*              |
| Cu <sub>mahuna</sub>           |                      |                                |                    | 1                    | 0,469*              |
| Cu <sub>sjeme</sub>            |                      |                                |                    |                      | 1                   |

\*korelacija značajna pri  $P < 0,01$

## 4.3. Kadmij

### 4.3.1. Elementarni sastav tla

Povećanje udjela OT u varijanti OT<sub>2</sub> uzrokovalo statistički je značajno smanjenje pH i ukupnih koncentracija Ca, Fe, Mn i Zn u tlu te povećanje ukupnih koncentracija S, Mo i Na (tablica 17).

Navodnjavanje NaCl zaslanjenom vodom statistički je značajno povećalo pH, E.C. i ukupne koncentracije Na i P u tlu, proporcionalno tretmanima zaslanjivanja (tablica 17). Utvrđen je i statistički značajan utjecaj na ukupnu koncentraciju Cd u tlu, ali bez očitog trenda u odnosu na NaCl tretmane jer je najniža koncentracija Cd utvrđena u kontrolnom tlu (bez zaslanjivanja), dok je najviša utvrđena pri NaCl<sub>50</sub> tretmanu. Primjena NaCl smanjila je ukupnu koncentraciju P u tlu, međutim bez značajne razlike između tretmana zaslanjivanja (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) (tablica 17).

Kontaminacija tla Cd (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) povećala je ukupnu koncentraciju Cd u tlu, proporcionalno tretmanima kontaminacije (tablica 17). S porastom ukupne koncentracije Cd u tlu utvrđeno je smanjenje E.C. i ukupnih koncentracija Na i Mn, ali bez značajne razlike između tretmana (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>).

Dodatno, interakcija OT\*NaCl\*Cu statistički je značajno ( $P < 0,05$ ) utjecala na ukupnu koncentraciju Na u tlu, interakcija OT\*Cd visoko značajno ( $P < 0,01$ ) na ukupnu koncentraciju Na u tlu i značajno ( $P < 0,05$ ) na ukupnu koncentraciju Mo u tlu, a interakcija NaCl\*Cd visoko značajno ( $P < 0,01$ ) na E.C. tla (tablica 17).

Tablica 17. Utjecaj organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na pH, E.C. i ukupne koncentracije elemenata tla.

| Tretman             | pH               | E.C.               | Cd                  | Na                 | K    | Ca   | Mg   | P     | Fe   | S                   | Cu   | Mo     | Mn   | Zn   |
|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------|------|------|-------|------|---------------------|------|--------|------|------|
|                     | H <sub>2</sub> O | dS m <sup>-1</sup> | mg kg <sup>-1</sup> | g kg <sup>-1</sup> |      |      |      |       |      | mg kg <sup>-1</sup> |      |        |      |      |
| OT <sub>1</sub>     | 7,7a             | 2a                 | 4,8a                | 1,5b               | 5a   | 77a  | 14a  | 1a    | 31a  | 708b                | 40a  | 0,9b   | 764a | 83a  |
| OT <sub>2</sub>     | 7,6b             | 2a                 | 4,6a                | 1,8a               | 6a   | 73b  | 14a  | 1a    | 29b  | 837a                | 40a  | 1,2a   | 711b | 79b  |
| NaCl <sub>0</sub>   | 7,6c             | 1c                 | 4,5c                | 0,4c               | 6a   | 74a  | 14a  | 1,15c | 30a  | 792a                | 40a  | 1a     | 733a | 82a  |
| NaCl <sub>50</sub>  | 7,65b            | 2b                 | 4,9a                | 1,6b               | 5a   | 75a  | 14a  | 1,2b  | 30a  | 765b                | 40a  | 1a     | 741a | 81a  |
| NaCl <sub>100</sub> | 7,68a            | 2,6a               | 4,7b                | 3a                 | 6a   | 75a  | 14a  | 1,24a | 30a  | 761b                | 40a  | 1a     | 737a | 81a  |
| Cd <sub>0</sub>     | 7,6a             | 2a                 | 0,6c                | 1,9a               | 6a   | 76a  | 14a  | 1a    | 31a  | 760a                | 40a  | 1a     | 752a | 81a  |
| Cd <sub>5</sub>     | 7,6a             | 1,7b               | 3,8b                | 1,5b               | 5a   | 74a  | 14a  | 1a    | 30a  | 771a                | 40a  | 1a     | 730b | 81a  |
| Cd <sub>10</sub>    | 7,6a             | 1,7b               | 9,7a                | 1,6b               | 6a   | 74a  | 14a  | 1a    | 30a  | 788a                | 40a  | 1a     | 730b | 82a  |
| <i>Interakcije</i>  |                  |                    |                     |                    |      |      |      |       |      |                     |      |        |      |      |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.             | n.s.               | n.s.                | P<0,05             | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.             | n.s.               | n.s.                | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s. |
| OT*Cd               | n.s.             | n.s.               | n.s.                | P<0,01             | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s.                | n.s. | P<0,05 | n.s. | n.s. |
| NaCl*Cd             | n.s.             | P<0,01             | n.s.                | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.  | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s.   | n.s. | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

#### 4.3.2. Ionski sastav saturacijskog vodnog ekstrakta tla

Povećanje udjela OT kod varijante OT<sub>2</sub> statistički je značajno povećalo koncentracije HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i ukupnog P u saturacijskom vodnom ekstraktu tla (tablica 18).

Primjena NaCl proporcionalno je tretmanima (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) povećala koncentracije Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> i NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a smanjila koncentraciju NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla (tablica 18). Koncentracija SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> također je smanjena, ali bez razlike između primijenjenih tretmana.

Kontaminacija tla Cd smanjila je koncentracije Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla, ali bez razlike između tretmana (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) (tablica 18). Također, najniža ukupna koncentracija P u saturacijskom vodnom ekstraktu tla utvrđena je pri srednjem tretmanu kontaminacije tla Cd (Cd<sub>5</sub>).

Interakcija NaCl\*Cd značajno (P<0,05) je utjecala na koncentraciju Na<sup>+</sup> u saturacijskom vodnom ekstraktu tla (tablica 18).

Tablica 18. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na koncentracije elemenata u saturacijskom vodnom ekstraktu tla.

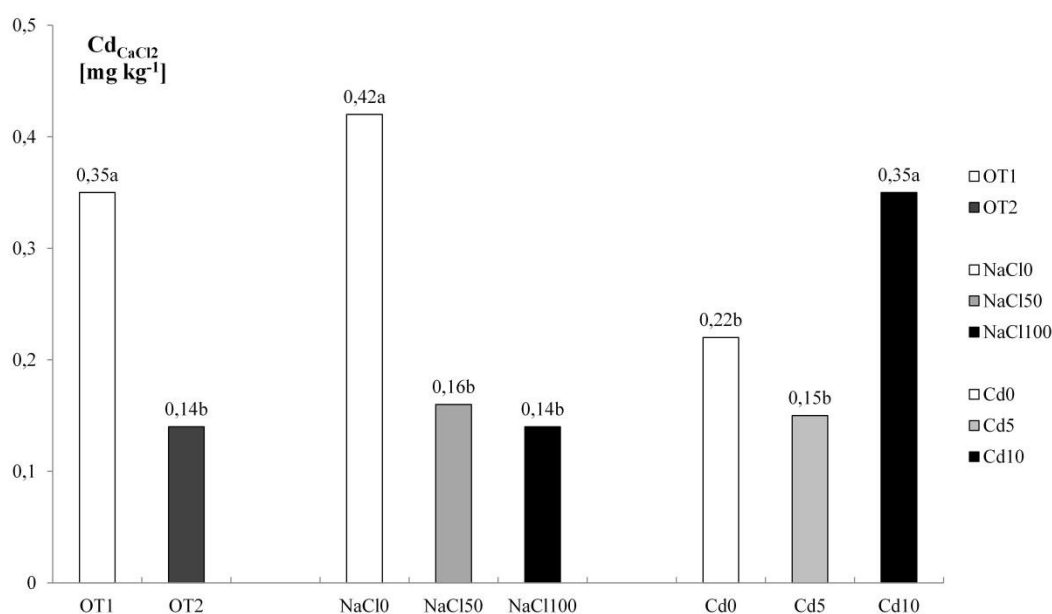
| Tretman             | Na <sup>+</sup>   | K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Cl <sup>-</sup> | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | P    |
|---------------------|-------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------|
|                     | g L <sup>-1</sup> |                |                  |                  |                               |                 |                              | mg L <sup>-1</sup>           |                               |      |
| OT <sub>1</sub>     | 2a                | 0,17a          | 1,3a             | 0,3a             | 0,4b                          | 4a              | 3a                           | 7,5b                         | 146b                          | 0,8b |
| OT <sub>2</sub>     | 2a                | 0,17a          | 1,3a             | 0,3a             | 0,5a                          | 4a              | 3a                           | 8,2a                         | 276a                          | 1,1a |
| NaCl <sub>0</sub>   | 0,1c              | 0,14c          | 1c               | 0,2c             | 0,4c                          | 0,3c            | 3,4a                         | 7,2c                         | 233a                          | 0,9b |
| NaCl <sub>50</sub>  | 2b                | 0,18b          | 1,4b             | 0,3b             | 0,41b                         | 4,4b            | 2,8b                         | 7,8b                         | 201b                          | 0,9b |
| NaCl <sub>100</sub> | 3a                | 0,2a           | 1,5a             | 0,32a            | 0,44a                         | 7,3a            | 2,5c                         | 8,5a                         | 198b                          | 1,1a |
| Cd <sub>0</sub>     | 2a                | 0,2a           | 1,4a             | 0,3a             | 0,4c                          | 4,5a            | 3,4a                         | 7,8a                         | 201a                          | 1a   |
| Cd <sub>5</sub>     | 1,5b              | 0,16b          | 1,3a             | 0,3a             | 0,41b                         | 3,7b            | 2,7b                         | 7,5a                         | 215a                          | 0,9b |
| Cd <sub>10</sub>    | 1,6b              | 0,16b          | 1,3a             | 0,3a             | 0,44a                         | 3,8b            | 2,7b                         | 8,3a                         | 216a                          | 1a   |
| <i>Interakcije</i>  |                   |                |                  |                  |                               |                 |                              |                              |                               |      |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.              | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.              | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| OT*Cd               | n.s.              | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |
| NaCl*Cd             | P<0,05            | n.s.           | n.s.             | n.s.             | n.s.                          | n.s.            | n.s.                         | n.s.                         | n.s.                          | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

### 4.3.3. Ekstrakcija kadmija iz tla s 0,01 M CaCl<sub>2</sub>

Statistički značajne razlike utvrđene su za koncentracije Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla s obzirom na sve tretmane primijenjene u pokusu (slika 13). Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> značajno je smanjio koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla. Primjena NaCl također je smanjila koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla, ali bez statistički opravdane razlike između primijenjenih tretmana (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>). Kontaminacija tla (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) značajno je povećala koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla.

Također, interakcije OT\*NaCl, OT\*Cd i NaCl\*Cd su visoko značajno ( $P < 0,01$ ) utjecale na koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla (slika 13).



| Interakcije | Cd <sub>CaCl2</sub> [mg kg <sup>-1</sup> ] |
|-------------|--------------------------------------------|
| OT*NaCl*Cd  | n.s.                                       |
| OT*NaCl     | P<0,01                                     |
| OT*NaCd     | P<0,01                                     |
| NaCl*Cd     | P<0,01                                     |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri  $P < 0,01$ ;  
n.s.: nije značajna („non-significant“) interakcija.

Slika 13. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla.

#### 4.3.4. Modeliranje kemijske specijacije kadmija u otopini tla

Modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan pokazuje da se Cd u otopini tla koje nije tretirano niti jednom varijantom pokusa ( $OT_1$ ,  $NaCl_0$ ,  $Cd_0$ ) većinom nalazi kao slobodni  $Cd^{2+}$  (42% od ukupne koncentracije), zatim kao Cd kompleksiran s huminskim kiselinama (30% od ukupne koncentracije) te u manjoj mjeri (1-12% od ukupne koncentracije) kompleksiran s anorganskim ligandima (pretežno kao  $CdCl^+$  i  $CdCO_3$ ) (tablica 19).

Kontaminacija tla srednjim tretmanom ( $Cd_5$ ) rezultirala je manjim promjenama u udjelu različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%), dok je pri  $Cd_{10}$  tretmanu tla utvrđen porast udjela slobodnog  $Cd^{2+}$  (do 47% od ukupne koncentracije), većinom na račun udjela Cd kompleksa s huminskim kiselinama (22% od ukupne koncentracije) (tablica 19).

Modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) u odnosu samo na povećan udio OT ( $Cd_0$ - $NaCl_0$ - $OT_1$  i  $Cd_0$ - $NaCl_0$ - $OT_2$ ) pokazuje porast Cd kompleksa s huminskim kiselinama (i do 60% od ukupne koncentracije), dok je u odnosu samo na povećan stupanj NaCl zaslanjenosti tla ( $Cd_0$ - $NaCl_0$ - $OT_1$ ,  $Cd_0$ - $NaCl_5$ - $OT_1$  i  $Cd_0$ - $NaCl_{10}$ - $OT_1$ ) povećan udio  $CdCl_n^{2-n}$  kompleksa (62-72% od ukupne koncentracije) na račun svih ostalih kemijskih oblika Cd u otopini tla (tablica 19).

Tablica 19. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM) i kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) na procjenu kemijske specijacije Cd u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan.

| Tretman             | Kemijski oblik <sup>1,2</sup>   | OT <sub>1</sub>                  |                 |                  | OT <sub>2</sub>                  |                 |                  |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|----------------------------------|-----------------|------------------|
|                     |                                 | Cd <sub>0</sub>                  | Cd <sub>5</sub> | Cd <sub>10</sub> | Cd <sub>0</sub>                  | Cd <sub>5</sub> | Cd <sub>10</sub> |
|                     |                                 | Udio u ukupnoj koncentraciji (%) |                 |                  | Udio u ukupnoj koncentraciji (%) |                 |                  |
| NaCl <sub>0</sub>   | Cd <sup>2+</sup>                | 42                               | 43              | 47               | 23                               | 23              | 27               |
|                     | CdCl <sup>+</sup>               | 12                               | 13              | 14               | 7                                | 7               | 8                |
|                     | CdCl <sub>2</sub> (aq)          | 0                                | 0               | 0                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdSO <sub>4</sub> (aq)          | 2                                | 2               | 2                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | CdNO <sub>3</sub> <sup>+</sup>  | 3                                | 3               | 3                | 1                                | 1               | 2                |
|                     | CdHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> | 3                                | 3               | 3                | 1                                | 1               | 2                |
|                     | CdCO <sub>3</sub> (aq)          | 7                                | 7               | 8                | 4                                | 4               | 4                |
|                     | HA1-Cd (6) (aq)                 | 1                                | 1               | 1                | 2                                | 2               | 2                |
|                     | HA2-Cd (6) (aq)                 | 30                               | 27              | 22               | 60                               | 60              | 53               |
| NaCl <sub>50</sub>  | Cd <sup>2+</sup>                | 14                               | 14              | 15               | 12                               | 12              | 12               |
|                     | CdCl <sup>+</sup>               | 49                               | 49              | 52               | 40                               | 40              | 40               |
|                     | CdCl <sub>2</sub> (aq)          | 13                               | 13              | 14               | 10                               | 10              | 10               |
|                     | CdSO <sub>4</sub> (aq)          | 0                                | 0               | 0                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdNO <sub>3</sub> <sup>+</sup>  | 1                                | 1               | 1                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> | 1                                | 1               | 1                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | CdCO <sub>3</sub> (aq)          | 2                                | 2               | 2                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | HA1-Cd (6) (aq)                 | 1                                | 1               | 1                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | HA2-Cd (6) (aq)                 | 19                               | 19              | 14               | 34                               | 34              | 34               |
| NaCl <sub>100</sub> | Cd <sup>2+</sup>                | 10                               | 10              | 10               | 8                                | 8               | 8                |
|                     | CdCl <sup>+</sup>               | 51                               | 51              | 53               | 43                               | 43              | 43               |
|                     | CdCl <sub>2</sub> (aq)          | 21                               | 21              | 22               | 18                               | 18              | 18               |
|                     | CdSO <sub>4</sub> (aq)          | 0                                | 0               | 0                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdNO <sub>3</sub> <sup>+</sup>  | 0                                | 0               | 0                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup> | 1                                | 1               | 1                | 0                                | 0               | 0                |
|                     | CdCO <sub>3</sub> (aq)          | 1                                | 1               | 1                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | HA1-Cd (6) (aq)                 | 1                                | 1               | 0                | 1                                | 1               | 1                |
|                     | HA2-Cd (6) (aq)                 | 15                               | 15              | 13               | 28                               | 28              | 28               |

<sup>1</sup>Kemijski oblici čiji je udio u ukupnoj koncentraciji <0,5 % nisu prikazane.

<sup>2</sup>HA-Cd: Cd kompleksiran s humusnim kiselinama (engl. Humic Acids - HA) preko 1-karboksilnih i 2-fenolnih funkcionalnih skupina.

#### 4.3.5. Dehidrogenazna aktivnost (DHA) u tlu

Veći udio OT kod varijante OT<sub>2</sub> značajno je povećao DHA u tlu (tablica 20).

Primjena NaCl značajno je smanjila aktivnost dehidrogenaza u tlu, dok kontaminacija tla Cd (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) nije značajno utjecala na DHA u tlu. Ipak, interakcija NaCl\*Cd bila je značajna (P<0,05) za DHA (tablica 20).

Tablica 20. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na DHA u tlu i koncentraciju kemijskih oblika Cd u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ.

| Tretman             | TLO                                                    | KEMIJSKI OBLIK Cd U OTOPINI TLA <sup>1,2</sup> |                                                        |                   |
|---------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------|
|                     | DHA<br>μg TPF g <sup>-1</sup> suho tlo h <sup>-1</sup> | Cd <sup>2+</sup>                               | CdCl <sub>n</sub> <sup>2-n</sup><br>mg L <sup>-1</sup> | Cd <sub>org</sub> |
| OT <sub>1</sub>     | 3,3b                                                   | 0,012b                                         | 0,013a                                                 | 0,009a            |
| OT <sub>2</sub>     | 4,3a                                                   | 0,003b                                         | 0,007b                                                 | 0,01a             |
| NaCl <sub>0</sub>   | 4,5a                                                   | 0,017a                                         | 0,003c                                                 | 0,017a            |
| NaCl <sub>50</sub>  | 3,7b                                                   | 0,003b                                         | 0,012b                                                 | 0,007b            |
| NaCl <sub>100</sub> | 3,2c                                                   | 0,002c                                         | 0,014a                                                 | 0,006c            |
| Cd <sub>0</sub>     | 3,9a                                                   | 0,005b                                         | 0,009b                                                 | 0,008b            |
| Cd <sub>5</sub>     | 3,6a                                                   | 0,006b                                         | 0,008b                                                 | 0,009b            |
| Cd <sub>10</sub>    | 3,9a                                                   | 0,011a                                         | 0,012a                                                 | 0,013a            |
| <i>Interakcije</i>  |                                                        |                                                |                                                        |                   |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.                                                   | P<0,01                                         | n.s.                                                   | n.s.              |
| OT*NaCl             | n.s.                                                   | P<0,01                                         | n.s.                                                   | P<0,01            |
| OT*Cd               | n.s.                                                   | P<0,01                                         | P<0,01                                                 | n.s.              |
| NaCl*Cd             | P<0,05                                                 | P<0,01                                         | n.s.                                                   | P<0,05            |

<sup>1</sup>Kemijski oblici čiji je udio u ukupnoj koncentraciji <0,5 % nisu prikazane.

<sup>2</sup>Cd kompleksiran s: CdCl<sub>n</sub><sup>2-n</sup>-kloridima (CdCl<sup>+</sup>, CdCl<sub>2</sub>); Cd<sub>org</sub>- humusnim kiselinama.

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05;

n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

Nadalje, na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ izračunate su realne koncentracije najznačajnijih kemijskih oblika Cd prisutnih u otopini tla kako bi se dobio utjecaj na DHA (tablica 20).

Korelacijskom matricom (gornji trokut) prikazane su korelacije između ukupne koncentracije Cd u tlu, koncentracije Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla, koncentracija najznačajnijih

kemijskih oblika Cd u otopini tla ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ -Cd kompleksiran s kloridima ( $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ ) i  $\text{Cd}_{\text{org}}$ -Cd kompleksiran s humusnim kiselinama) i DHA u tlu (tablica 21).

Iako nije utvrđen negativan utjecaj kontaminacije tla Cd ( $\text{Cd}_5$  i  $\text{Cd}_{10}$ ) na DHA u tlu (tablica 20), ipak je utvrđena značajna negativna korelacija ( $P < 0,01$ ) između DHA u tlu i izračunate koncentracije Cd kompleksiranog s kloridima u otopini tla ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ ), s korelacijskim koeficijentom  $r = -0,514$  (tablica 21).

Tablica 21. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cd u tlu, koncentraciju Cd u 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla, koncentraciju kemijskih oblika Cd u otopini tla izračunate na osnovi njihova udjela u otopini tla (%) procijenjenog programom Visual MINTEQ i DHA u tlu.

|                             | $\text{Cd}_{\text{ukupni}}$ | $\text{Cd}_{\text{CaCl}_2}$ | Kemijski oblik Cd u otopini tla <sup>1</sup> |                       |                          | DHA                  |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|
|                             |                             |                             | $\text{Cd}^{2+}$                             | $\text{CdCl}_n^{2-n}$ | $\text{Cd}_{\text{org}}$ |                      |
| $\text{Cd}_{\text{ukupni}}$ | 1                           | 0,238 <sup>ns</sup>         | 0,177 <sup>ns</sup>                          | 0,245 <sup>ns</sup>   | 0,213 <sup>ns</sup>      | -0,048 <sup>ns</sup> |
| $\text{Cd}_{\text{CaCl}_2}$ |                             | 1                           | 0,941*                                       | -0,064 <sup>ns</sup>  | 0,670*                   | -0,032 <sup>ns</sup> |
| $\text{CdCO}_3$             |                             |                             | 1                                            | -0,238 <sup>ns</sup>  | 0,738*                   | 0,024 <sup>ns</sup>  |
| $\text{CdCl}_n^{2-n}$       |                             |                             |                                              | 1                     | -0,470*                  | -0,514*              |
| $\text{Cd}_{\text{org}}$    |                             |                             |                                              |                       | 1                        | 0,281 <sup>ns</sup>  |
| DHA                         |                             |                             |                                              |                       |                          | 1                    |

<sup>1</sup>Cd kompleksiran s:  $\text{CdCl}_n^{2-n}$ -kloridima ( $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_2$ );  $\text{Cd}_{\text{org}}$ - humusnim kiselinama.

\*korelacija značajna pri  $P < 0,01$ .

<sup>ns</sup>korelacija nije značajna (engl. non-significant)

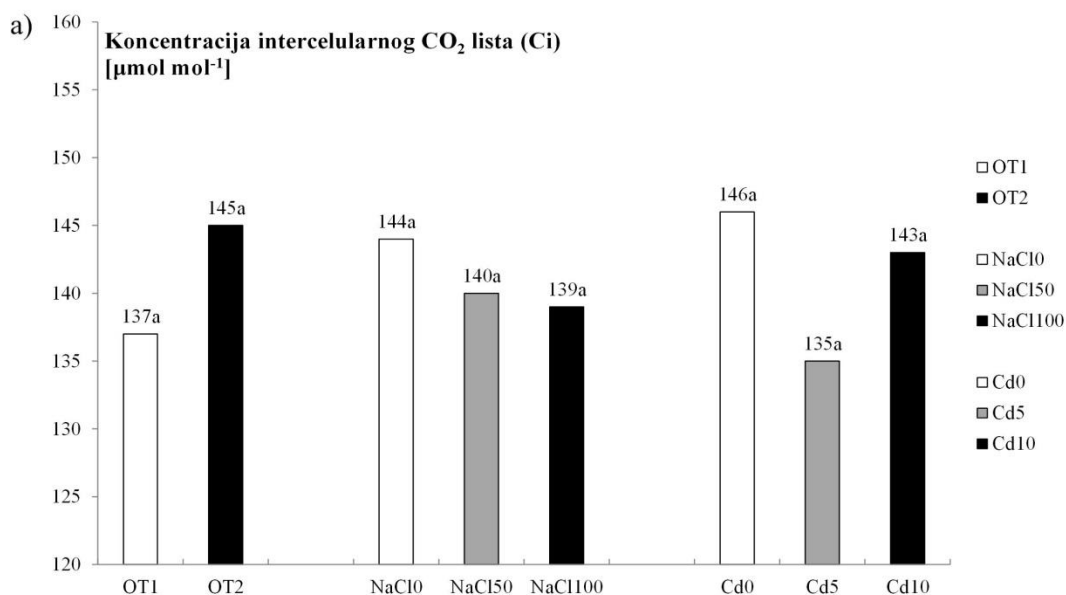
#### 4.3.6. Fotosintetski pokazatelji lista boba

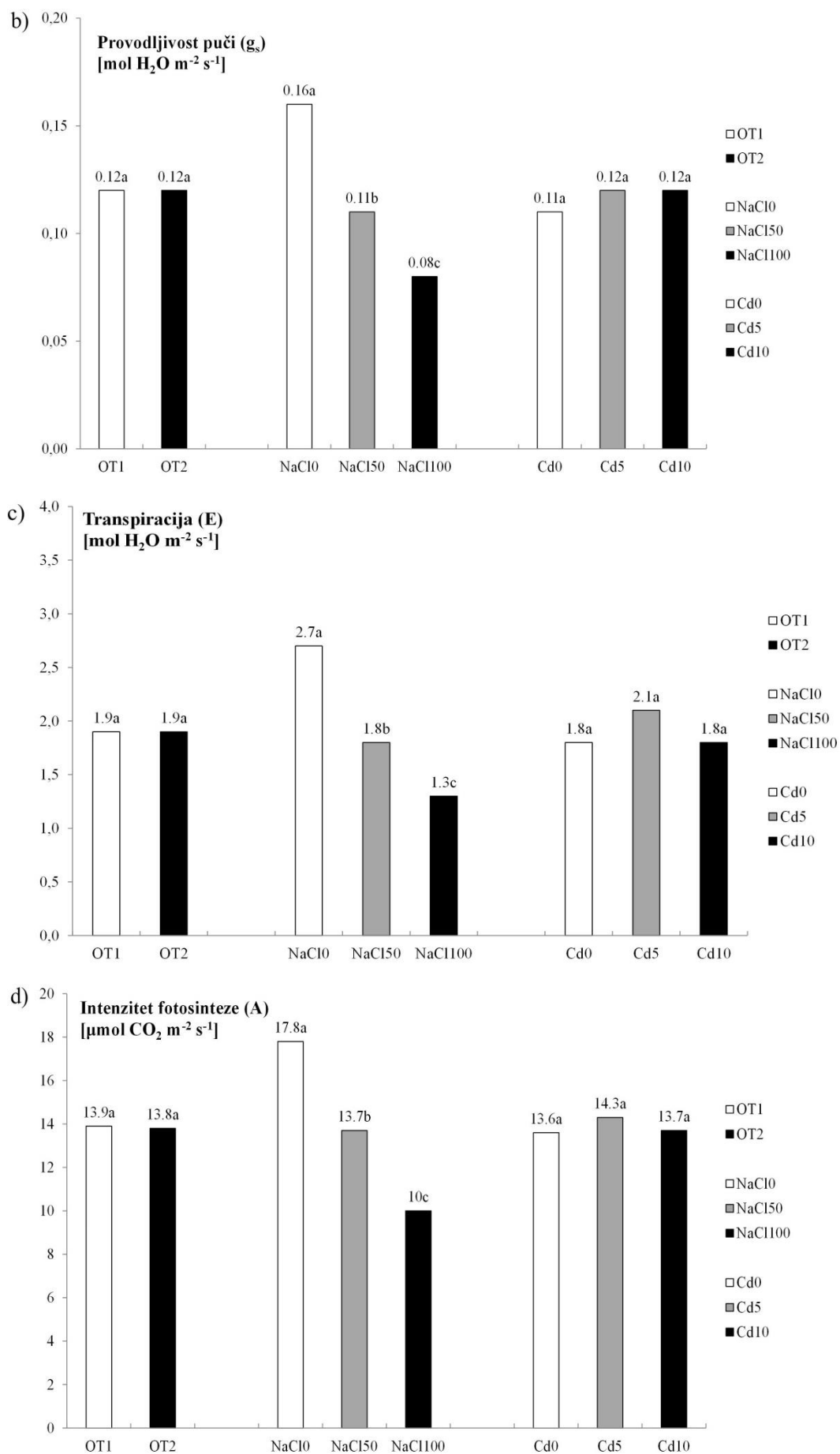
Povećan udio OT kod OT<sub>2</sub> tretmana nije značajno utjecao na mjerene fotosintetske pokazatelje lista boba (slika 14 a, b, c, d, e).

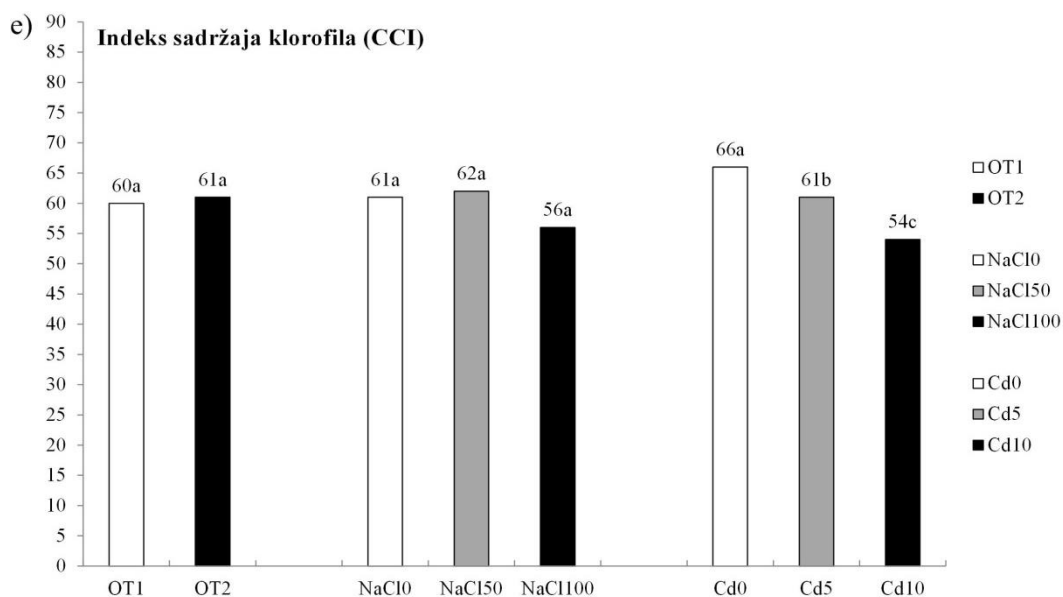
NaCl značajno je smanjio provodljivosti puči lista boba ( $g_s$ ), transpiraciju ( $E$ ) te intenzitet fotosinteze ( $A$ ) (slika 14 b, c, d). Primjena NaCl nije značajno utjecala na koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista ( $C_i$ ), niti na indeks sadržaja klorofila ( $CCI$ ) (slika 14 a, e).

Kontaminacija tla Cd značajno je utjecala samo na indeks sadržaja klorofila ( $CCI$ ), koji je smanjen proporcionalno tretmanima (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) (slika 14 e).

Interakcija OT\*NaCl\*Cu značajno je utjecala ( $P=0,05$ ) na provodljivosti puči lista boba ( $g_s$ ) (slika 14).







| Interakcije | Koncentracija                                                        |                                                                           |                                                                                              |                                                                                    |                                 |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
|             | intercelularnog CO <sub>2</sub> lista (Ci)<br>μmol mol <sup>-1</sup> | Transpiracija (E)<br>mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Provodljivost puči (g <sub>s</sub> )<br>mol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Intenzitet fotosinteze (A)<br>μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> | Indeks sadržaja klorofila (CCI) |
| OT*NaCl*Cd  | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | P=0,05                                                                                       | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| OT*NaCl     | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| OT*Cd       | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |
| NaCl*Cd     | n.s.                                                                 | n.s.                                                                      | n.s.                                                                                         | n.s.                                                                               | n.s.                            |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri  $P < 0,05$ ; n.s.: nije značajna („non-significant“) interakcija.

Slika 14. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na fotosintetske pokazatelje lista boba: a) koncentraciju intercelularnog CO<sub>2</sub> lista (Ci, μmol mol<sup>-1</sup>), b) provodljivost puči (g<sub>s</sub>, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), c) transpiraciju (E, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), d) intenzitet fotosinteze (A, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) i e) indeks sadržaja klorofila (CCI).

#### 4.3.7. Elementarni sastav lista boba

Povećanje udjela OT kod varijante OT<sub>2</sub> statistički je značajno povećalo koncentraciju Mg i Mo, a smanjilo koncentraciju Cd u listu boba (tablica 22).

NaCl značajno je povećao koncentracije Na i Cl u listu boba (63 g Na kg<sup>-1</sup> i 86 g Cl kg<sup>-1</sup> pri NaCl<sub>100</sub> tretmanu zaslanjivanja) (tablica 22). Također, proporcionalno tretmanima NaCl (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) značajno je smanjena suha tvar lista i koncentracije K i Ca u listu boba, ali i koncentracije Mg, P, Cd i Zn, no bez značajne razlike između tretmana.

Kontaminacija tla Cd povećala je koncentraciju Cd u listu boba, proporcionalno tretmanima (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) (tablica 22). Također, kontaminacija tla Cd značajno je utjecala na koncentraciju Na u listu boba, pri čemu je najniža koncentracija Na utvrđena u listu kontrolnih biljaka (Cd<sub>0</sub>), a najviša kod Cd<sub>5</sub> varijante. Koncentracija S u listu boba značajno je povećana s kontaminacijom tla Cd, no bez razlike između tretmana (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>). Nadalje, koncentracije Ca, Mg i Mn u listu boba značajno su smanjene, ali bez razlike između primijenjenih tretmana (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) (tablica 22).

Interakcija OT\*Cd bila je visoko značajna (P<0,01), a interakcija NaCl\*Cd značajna (P=0,05) za koncentraciju Cd u listu boba (tablica 22).

Tablica 22. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u listu boba.

| Tretman             | Cd<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na                 | K    | Ca   | Mg   | Cl   | P    | S    | Cu                  | Fe    | Zn   | Mn   | Mo   |
|---------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|---------------------|-------|------|------|------|
|                     |                           |                   | g kg <sup>-1</sup> |      |      |      |      |      |      | mg kg <sup>-1</sup> |       |      |      |      |
| OT <sub>1</sub>     | 1,8a                      | 13a               | 38a                | 18a  | 35a  | 3,2b | 53a  | 2a   | 3a   | 8a                  | 762a  | 15a  | 80a  | 0,6b |
| OT <sub>2</sub>     | 1,3b                      | 13a               | 37a                | 18a  | 37a  | 3,9a | 52a  | 2a   | 3a   | 8a                  | 801a  | 15a  | 80a  | 5a   |
| NaCl <sub>0</sub>   | 1,8a                      | 15a               | 3c                 | 34a  | 42a  | 4,4a | 12c  | 3a   | 3a   | 9a                  | 847a  | 16a  | 83a  | 3a   |
| NaCl <sub>50</sub>  | 1,3b                      | 12b               | 44b                | 12b  | 34b  | 3b   | 57b  | 2b   | 3a   | 9a                  | 775a  | 14b  | 83a  | 2a   |
| NaCl <sub>100</sub> | 1,4b                      | 11c               | 63a                | 9c   | 31c  | 3b   | 88a  | 2b   | 3a   | 8a                  | 724a  | 14b  | 74a  | 3a   |
| Cd <sub>0</sub>     | <0,15c*                   | 13a               | 33c                | 18a  | 40a  | 4a   | 49a  | 2a   | 2,6b | 8a                  | 542a  | 14a  | 90a  | 3a   |
| Cd <sub>5</sub>     | 1,6b                      | 12a               | 40a                | 17a  | 33b  | 3b   | 56a  | 3a   | 3a   | 8a                  | 696a  | 16a  | 74b  | 3a   |
| Cd <sub>10</sub>    | 2,8a                      | 12a               | 37b                | 18a  | 34b  | 3b   | 52a  | 2a   | 3a   | 9a                  | 1107a | 15a  | 76b  | 2a   |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |                    |      |      |      |      |      |      |                     |       |      |      |      |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*NaCl             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*Cd               | P<0,01                    | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |
| NaCl*Cd             | P=0,05                    | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s.  | n.s. | n.s. | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*granica detekcije instrumenta

#### **4.3.8. Elementarni sastav mahune boba**

Povećanje udjela OT kod OT<sub>2</sub> tretmana statistički je značajno smanjilo koncentraciju Cd u mahuni boba (tablica 23). Također je pri OT<sub>2</sub> tretmanu utvrđeno i povećanje koncentracije Mo te smanjenje koncentracije Cu.

Primjena NaCl značajno je povećala koncentracije Na, Cl i Mo te smanjila koncentracije Ca, Mg i S u mahuni boba, proporcionalno tretmanima zaslanjivanja (tablica 23). Suha tvar mahune

Kontaminacija tla Cd proporcionalno je tretmanima povećala koncentraciju Cd, a smanjila koncentracije Ca i Mo u mahuni boba (tablica 23). Utvrđeno je i smanjenje koncentracije Cu u mahuni boba, ali bez razlike u odnosu na tretmane (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>).

Interakcija OT\*NaCl bila je visoko značajna ( $P < 0,01$ ) za koncentraciju Mo u mahuni boba. Interakcija OT\*Cd visoko je značajno ( $P < 0,01$ ) utjecala na koncentraciju Cd, a značajno ( $P < 0,05$ ) na koncentraciju K u mahuni boba (tablica 23).

Tablica 23. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u mahuni boba.

| Tretman             | Cd<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na                 | K      | Ca   | Mg   | Cl   | P    | S    | Cu                  | Fe   | Zn   | Mn   | Mo     |
|---------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|--------|------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|--------|
|                     |                           |                   | g kg <sup>-1</sup> |        |      |      |      |      |      | mg kg <sup>-1</sup> |      |      |      |        |
| OT <sub>1</sub>     | 0,5a                      | 14a               | 5a                 | 19a    | 2a   | 1a   | 7a   | 3a   | 1a   | 5a                  | 145a | 16a  | 13a  | 3b     |
| OT <sub>2</sub>     | 0,3b                      | 14a               | 5a                 | 19a    | 2a   | 1a   | 6a   | 3a   | 1a   | 4b                  | 65a  | 18a  | 13a  | 12a    |
| NaCl <sub>0</sub>   | 0,4a                      | 13a               | 0,5c               | 19a    | 2,3a | 1,4a | 2c   | 3a   | 1,2a | 4a                  | 53a  | 17a  | 13a  | 6c     |
| NaCl <sub>50</sub>  | 0,3a                      | 15a               | 6b                 | 18a    | 1,9b | 1,3b | 7b   | 3a   | 1,1b | 4a                  | 193a | 17a  | 13a  | 8b     |
| NaCl <sub>100</sub> | 0,5a                      | 15a               | 8a                 | 20a    | 1,8c | 1,2c | 11a  | 3a   | 1c   | 4a                  | 69a  | 18a  | 13a  | 9a     |
| Cd <sub>0</sub>     | <0,15c*                   | 14a               | 5a                 | 19a    | 2,1a | 1a   | 6a   | 3a   | 1a   | 5a                  | 125a | 18a  | 14a  | 9a     |
| Cd <sub>5</sub>     | 0,4b                      | 14a               | 5a                 | 19a    | 2b   | 1a   | 6a   | 3a   | 1a   | 4b                  | 41a  | 16a  | 13a  | 8b     |
| Cd <sub>10</sub>    | 0,7a                      | 14a               | 5a                 | 19a    | 1,8c | 1a   | 7a   | 3a   | 1a   | 4b                  | 148a | 17a  | 13a  | 7c     |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |                    |        |      |      |      |      |      |                     |      |      |      |        |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| OT*NaCl             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | P<0,01 |
| OT*Cd               | P<0,01                    | n.s.              | n.s.               | P<0,05 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |
| NaCl*Cd             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s.   | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.   |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*granica detekcije instrumenta

#### **4.3.9. Elementarni sastav sjemena boba**

Povećanje udjela OT kod varijante OT<sub>2</sub> značajno je smanjilo koncentraciju Cd, a povećalo koncentraciju P i Mo u sjemenu boba (tablica 24).

Primjena NaCl proporcionalno je tretmanima (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) značajno povećala koncentracije Na, Cl i Mo, a smanjila koncentracije P, S i Fe u sjemenu boba (tablica 24). Koncentracija Ca u sjemenu boba također je smanjena primjenom NaCl, međutim bez značajne razlike između tretmana (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>).

Kontaminacija tla Cd proporcionalno je tretmanima (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>) značajno povećala koncentraciju Cd, a smanjila koncentraciju Zn u sjemenu boba (tablica 24). Utvrđeno je i smanjenje koncentracija Fe i Mo u sjemenu boba s kontaminacijom tla Cd, međutim bez značajne razlike između tretmana (Cd<sub>5</sub> i Cd<sub>10</sub>).

Interakcija OT\*NaCl bila je visoko značajna ( $P < 0,01$ ) za koncentraciju Cd u sjemenu boba. Također je i interakcija OT\*Cd bila visoko značajna ( $P = 0,01$ ) za koncentraciju Cd u sjemenu boba (tablica 24).

Tablica 24. Utjecaj udjela organske tvari u tlu (OT<sub>1</sub> i OT<sub>2</sub>), NaCl (0, 50 i 100 mM NaCl), kontaminacije tla kadmijem (5 i 10 mg kg<sup>-1</sup>) i njihovih interakcija na akumulaciju elemenata u sjemenu boba.

| Tretman             | Cd<br>mg kg <sup>-1</sup> | Suha<br>tvar<br>% | Na                 | K    | Ca   | Mg   | Cl   | P    | S    | Cu                  | Fe   | Zn   | Mn   | Mo   |
|---------------------|---------------------------|-------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|---------------------|------|------|------|------|
|                     |                           |                   | g kg <sup>-1</sup> |      |      |      |      |      |      | mg kg <sup>-1</sup> |      |      |      |      |
| OT <sub>1</sub>     | 0,5a                      | 21a               | 0,3a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6,2b | 2a   | 11a                 | 46a  | 27a  | 9a   | 8b   |
| OT <sub>2</sub>     | 0,4b                      | 20a               | 0,4a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6,5a | 2a   | 9a                  | 44a  | 29a  | 9a   | 20a  |
| NaCl <sub>0</sub>   | 0,4a                      | 20a               | 0,06c              | 18a  | 1,1a | 1a   | 0,9c | 6,8a | 1,8a | 11a                 | 56a  | 30a  | 9a   | 12c  |
| NaCl <sub>50</sub>  | 0,4a                      | 20a               | 0,4b               | 18a  | 0,8b | 1a   | 1,3b | 6,2b | 1,6b | 11a                 | 41b  | 28a  | 9a   | 14b  |
| NaCl <sub>100</sub> | 0,5a                      | 21a               | 0,6a               | 18a  | 0,8b | 1a   | 1,6a | 6c   | 1,5c | 9a                  | 38c  | 27a  | 9a   | 15a  |
| Cd <sub>0</sub>     | <0,15c*                   | 21a               | 0,4a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a   | 2a   | 11a                 | 50a  | 31a  | 9a   | 15a  |
| Cd <sub>5</sub>     | 0,5b                      | 20a               | 0,3a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a   | 2a   | 9a                  | 43b  | 28b  | 9a   | 13b  |
| Cd <sub>10</sub>    | 0,7a                      | 21a               | 0,4a               | 18a  | 1a   | 1a   | 1a   | 6a   | 2a   | 11a                 | 42b  | 26c  | 9a   | 13b  |
| <i>Interakcije</i>  |                           |                   |                    |      |      |      |      |      |      |                     |      |      |      |      |
| OT*NaCl*Cd          | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*NaCl             | P<0,01                    | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| OT*Cd               | P=0,01                    | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| NaCl*Cd             | n.s.                      | n.s.              | n.s.               | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.                | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Srednje vrijednosti označene istim slovom nisu statistički značajno različite pri P<0,05; n.s.: nije značajna (engl. non-significant) interakcija.

\*granica detekcije instrumenta

#### 4.3.10. Korelacije između ukupne koncentracije Cd u tlu, koncentracije Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i tkivu boba

Korelacije između ukupne koncentracije Cd u tlu, koncentracije Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla te koncentracije Cd u tkivu boba (list, mahuna, sjeme), prikazane su korelacijskom matricom (gornji trokut) (tablica 25). Koncentracija Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla značajno je korelirala samo s koncentracijom Cd u listu boba, iako korelacijski koeficijent nije bio visok ( $r=0,404$ ). Utvrđena je bolja korelacija između ukupne koncentracije Cd u tlu i koncentracije Cd u tkivu boba (list, mahuna, sjeme), s najvišim korelacijskim koeficijentom ( $r=0,824$ ) između ukupne koncentracije Cd u tlu i koncentracije Cd u listu boba. Koncentracije Cd u tkivu boba (list, mahuna, sjeme) međusobno su značajno korelirale, s visokim korelacijskim koeficijentima ( $r=0,831$ - $0,897$ ) (tablica 25).

Tablica 25. Korelacijska matrica (gornji trokut) za ukupnu koncentraciju Cd u tlu, koncentraciju Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentraciju Cd u listu, mahuni i sjemenu boba.

|                                | Cd <sub>ukupni</sub> | Cd <sub>CaCl<sub>2</sub></sub> | Cd <sub>list</sub> | Cd <sub>mahuna</sub> | Cd <sub>sjeme</sub> |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| Cd <sub>ukupni</sub>           | 1                    | 0,255 <sup>ns</sup>            | 0,824*             | 0,672*               | 0,748*              |
| Cd <sub>CaCl<sub>2</sub></sub> |                      | 1                              | 0,404*             | 0,319 <sup>ns</sup>  | 0,213 <sup>ns</sup> |
| Cd <sub>list</sub>             |                      |                                | 1                  | 0,831*               | 0,842*              |
| Cd <sub>mahuna</sub>           |                      |                                |                    | 1                    | 0,897*              |
| Cd <sub>sjeme</sub>            |                      |                                |                    |                      | 1                   |

\*korelacija značajna pri  $P<0,01$

<sup>ns</sup>korelacija nije značajna (engl. non-significant)

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari i saliniteta tla

#### 5.1.1. Biopristupačnost bakra biljci boba (*Vicia faba* L.) u tlu kontaminiranom bakrom

Kontaminacija tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ) značajno je povećala koncentracije Cu u tkivu boba (list, mahuna, sjeme) (tablica 13, 14 i 15), što upućuje na povećanu biopristupačnost Cu i njegovo povećano primanje u biljku s povećanjem ukupne koncentracije Cu u tlu. Najviša koncentracija Cu utvrđena je u sjemenu boba (tablica 15), što je u suglasnosti s prethodnim istraživanjima translokacije i akumulacije Cu u tkivu boba (Rashed i Awadallah, 1998). Koncentracije metala u biljnom tkivu općenito su u funkciji ukupne koncentracije metala u okolnom mediju, ali je također poznato da taj odnos varira s obzirom na ispitivanu biljnu vrstu, ali i biljni organ (Mohamed i sur., 2003), što je ovim istraživanjem potvrđeno i za biljku boba. Prosječne koncentracije Cu u nadzemnim organima leguminoznih usjeva iznose oko  $8,7 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari (Liao, 2000), a kritičnim se koncentracijama Cu u biljnom tkivu prema Marschner (1995) smatraju koncentracije više od  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari. S obzirom na to da su koncentracije Cu u svim ispitivanim nadzemnim biljnim organima (list, mahuna, sjeme) bile niže od navedene kritične vrijednosti (tablica 13, 14, 15), rezultati upućuju na mogućnost da su biljke boba u uvjetima kontaminacije tla Cu ( $Cu_{250}$  i  $Cu_{500}$ ) bile u mogućnosti ograničiti translokaciju Cu u nadzemne dijelove biljke, ponašajući se kao biljke isključivači metala (engl. metal excluder plants; Baker, 1981). Naime, različite strategije tolerantnosti koje se javljaju kao odgovor biljke na povećanu koncentraciju Cu u okolnom mediju definirali su Akbar Boojar i Goodarzi (2007): isključivanje Cu u stanicama korijena, stabilizacija suvišnog Cu u tlu i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima. Međutim, različite biljne vrste, ali i različiti biljni organi, mogu imati različite mehanizme tolerantnosti na povećane koncentracije metala u tlu te postoji i mogućnost da više od jednog mehanizma unutar jedne biljne vrste/organa može istovremeno biti uključeno u odgovor biljke na toksične koncentracije metala u tlu (Reichman, 2002). Primjerice, Pedersen i sur. (2000) u istraživanjima toksičnosti Cu na biljke zaključili su da *Fallopia convolvulus* imobilizira suvišni Cu izvan ili unutar korijenovih dlačica te na taj način sprječava njegovu translokaciju u nadzemne dijelove biljke. Također su utvrdili i limit navedenog biljnog regulatornog mehanizma za zaštitu biljke od

toksičnosti suvišnog Cu u tlu, koji je za istraživanu biljnu vrstu iznosio oko 200 mg Cu kg<sup>-1</sup> tla, odnosno oko 20 mg Cu kg<sup>-1</sup> biljne biomase, nakon kojega se primanje Cu iz tla brzo povećavalo. S obzirom na to da u ovom istraživanju nije utvrđeno brzo povećanje akumulacije Cu u biljnom tkivu (tablica 13, 14, 15) koje bi prešlo kritične koncentracije Cu u biljnom tkivu (Marschner, 1995), možemo zaključiti da postoji vjerojatnost da pri istraživanim ukupnim koncentracijama Cu u tlu (250 i 500 mg kg<sup>-1</sup>), nismo dosegili limit regulatornog mehanizma za zaštitu biljke boba od toksičnosti suvišnog Cu u tlu. Na mogućnost postojanja mehanizama prilagodbe boba na povećane koncentracije Cu u tlu ukazali su i Probst i sur. (2009) kada su povezali zadebljanja stanične stijenke u stanicama korijena s izlaganjem biljaka povećanim koncentracijama Cu u tlu. Također, kontaminacija tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) nije utjecala na mjerene fotosintetske pokazatelje lista boba (slika 12 a, b, c, d, e), upućujući na zaključak da povećana ukupna koncentracija Cu u tlu nije utjecala na produktivnost biljaka boba.

Smatra se da slaba ekstrakcijska sredstva kao što je 0,01 M CaCl<sub>2</sub> daju najbolje rezultate za procjenu primanja metala iz tla u biljke (Brun i sur., 1998; Romić i sur., 2004). Međutim, ekstrakcija s 0,01 M CaCl<sub>2</sub> nam daje informaciju o koncentraciji Cu koja je dostupna biljkama, dok se ukupna koncentracija Cu u biljnom tkivu može definirati kao funkcija primanja Cu iz otopine tla u korijen, ali i njegove akumulacije u određenom biljnom organu tijekom određenog vremenskog perioda. Iz navedenog proizlazi da bi se točnije moglo procijeniti biopristupačnost Cu u tlu ako umjesto izravne komparacije ukupne koncentracije Cu u tlu, koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracija Cu u biljnom tkivu, dobivene podatke interpretiramo na temelju njihovih korelacija. Iz Slike 11 vidljivo je da je kontaminacija tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) značajno povećala koncentraciju Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla. Utvrđena je visoko značajna pozitivna korelacija ( $P < 0,01$ ) između ukupne koncentracije Cu u tlu, koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracije Cu u tkivu boba (tablica 16). Ipak, korelacijski koeficijenti bili su veći između koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracije Cu u listu, mahuni i listu boba, u odnosu na korelaciju s ukupnom koncentracijom Cu u tlu, s najvišim korelacijskim koeficijentom ( $r = 0,803$ ) između koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracije Cu u mahuni boba. Navedeni rezultati upućuju na zaključak da za procjenu pristupačnosti Cu u tlu biljkama, ekstrakcija s 0,01 M CaCl<sub>2</sub> daje bolje rezultate u odnosu na ukupnu koncentraciju Cu u tlu. Isto tako, iz navedenih rezultata proizlazi da tkivo mahune boba najbolje odražava pristupačnu frakciju Cu u tlu (tablica 14). Dodatno, rezultati upućuju na mogućnost da je akumulacija Cu u listu i sjemenu boba modificirana (drugačijim) biljnim mehanizmima u odnosu na mahunu boba. Brun i sur. (1998) također su pronašli visoko značajnu korelaciju između koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla i koncentracije Cu u biljnom tkivu

nadzemnih biljnih organa kod biljaka uzgojenih u kiselim do neutralnim tlima, kao i varijacije u dobivenim rezultatima u odnosu na ispitivanu biljnu vrstu. Iz dobivenih rezultata istraživanja (tablica 10, slika 11, tablica 16), možemo zaključiti da biopristupačnost Cu u tlu ovisi o njegovu otpuštanju s krute faze tla u otopinu tla te da će na fitopristupačnost utjecati isti procesi (tablica 13, 14, 15 i 16), ali da navedeni utjecaj može biti modificiran biljnim regulatornim mehanizmima.

Povećana ukupna koncentracija Cu u tlu utjecala je na koncentracije drugih elemenata u tkivu boba (tablica 13, 14, 15), što upućuje na zaključak da povećano primanje, akumulacija i/ili translokacija Cu može interferirati u primanju, akumulaciji i/ili translokaciji drugih elemenata, a time i u odvijanju fizioloških procesa. Primanje Cu iz tla u biljku regulirano je specifičnim proteinskim transporterima koji se nalaze u plazmatskoj membrani korijena. Xiong i sur. (2002) u svojim istraživanjima zaključuju da povećane koncentracije Zn i Mn mogu smanjiti koncentraciju Cu u nadzemnim organima *Brassica pekinensis*, upućujući pri tome na antagonizam u primanju Cu i navedenih hraniva. U ovom istraživanju također postoji mogućnost antagonizma između Cu i Zn jer je povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu uzrokovalo značajno smanjenje koncentracije Zn u mahuni i sjemenu boba, proporcionalno tretmanima kontaminacije tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>) (tablica 14 i 15), što je u suglasnosti s istraživanjima koje je proveo Bowen (1969) gdje je navedeni antagonizam objašnjen istim membranskim transporterima za Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> na plazmatskoj membrani korijena. Nadalje, koncentracija Mn u listu boba također statistički je značajno smanjena, ali samo pri Cu<sub>250</sub> tretmanu kontaminacije tla Cu (tablica 13). Ait Ali i sur. (2002) u svojim su istraživanjima dobili smanjenje koncentracije Mn u nadzemnim organima *Phragmites australis* i *Zea mays*. Međutim, u ovom istraživanju je povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu kontaminacijom uzrokovalo povećanje koncentracije Mn u mahuni i sjemenu boba (tablica 14 i 15), što ukazuje na mogućnost različitog mehanizma primanja i/ili translokacije Mn u biljci ovisno o biljnoj vrsti ili čak organu. Također, kontaminacija tla Cu imala je značajan utjecaj na koncentraciju Ca u listu boba (tablica 13) te su sličan učinak povećane koncentracije Cu na koncentraciju Ca u listu *Cucumis sativus* pronašli i Alaoui-Sossé i sur. (2004). Narušavanje homeostaze Ca<sup>2+</sup> unutar biljnih stanica može biti jedan od prvih znakova negativnog djelovanja različitih okolišnih stresora na rast i razvoj biljke, uključujući i povećane koncentracije metala u tlu, jer ionske interakcije u prostoru apoplasta stanice te na samoj plazmatskoj membrani stanica korijena biljke, mogu biti odgovorne za promjene u koncentraciji Ca u biljnom tkivu (Rengel, 1992). Međutim, navedene promjene u koncentraciji drugih elemenata u biljnom tkivu s povećanjem koncentracije Cu mogu biti i rezultat transporta Cu unutar biljke prilikom kojeg Cu može interferirati s transportom drugih elemenata u biljci. Cu se prvenstveno transportira ksilemom, kompleksiran s ligandima jer

slobodni  $\text{Cu}^{2+}$  može imati toksičan učinak na stanice. Poznato je da povećane koncentracije Cu u okolnom mediju induciraju sintezu određenih aminokiselina unutar biljke (histidin i nikotianamin imaju najznačajniju ulogu), a koje stvaraju visoko stabilne komplekse s Cu u ksilemu biljke (pH ksilemskog fluida je 5,5-6,5), što se može odraziti i na koncentracije drugih elemenata u nadzemnim organima biljke (Liao, 2000).

S obzirom na to da su dehidrogenaze unutarstanični enzimi koji se nalaze u svim živućim mikrobnim stanicama te se ne akumuliraju u tlu izvanstanično (Alrumman i sur., 2015), često se koriste kao indikator ukupne mikrobiološke aktivnosti u tlu, odnosno kao mjera opće plodnosti tala. Iz navedenog razloga, kao dodatni pokazatelj učinka povećane koncentracije Cu u tlu na organizme u tlu, osim utjecaja na samu biljku, procijenjen je i učinak kontaminacije tla Cu na DHA u tlu (tablica 11). Utvrđeno je značajno smanjenje DHA u tlu s porastom ukupne koncentracije Cu u tlu te je pri najvećem tretmanu kontaminacije tla Cu ( $\text{Cu}_{500}$ ) DHA bila reducirana čak za 50 % (tablica 11). Poznato je da povećana koncentracija Cu u tlu može štetno djelovati na aktivnost mikrobnih enzima uzrokujući promjene u metaboličkim putevima u stanicama, često rezultirajući staničnom apoptozom, kao i posljedičnim smanjenjem brojnosti i raznolikosti mikroorganizama u tlu, a time i smanjenjem njihove aktivnosti u tlu (Wyszkowska i Wyszkowski, 2003). Iako je Cu kao esencijalno mikrohranivo sastavni dio fizioloških procesa svih organizama, u uvjetima njegove povećane koncentracije može imati toksičan učinak na organizme. Cu može smanjiti DHA neizravno - smanjenjem mikrobne biomase, ili izravno - stvarajući smetnje u procesu sinteze enzima u mikrobnim stanicama, utječući na enzim-supstrat kompleks, denaturirajući protein enzima ili interferirajući s funkcionalnim skupinama na proteinu enzima (Pan i Yu, 2011). Wyszkowska i sur. (2009) također su u svojim istraživanjima potvrdili da koncentracije Cu u rasponu od 150-450  $\text{mg kg}^{-1}$  značajno inhibiraju DHA te su u isto vrijeme, u odnosu na ostale ispitivane enzime u navedenom istraživanju (dehidrogenaze, ureaze, katalaze), dehidrogenaze bile najosjetljiviji enzim na kontaminaciju tla Cu. Nadalje, utvrđena je i značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između DHA i ukupne koncentracije Cu u tlu ( $r = -0,576$ ) te DHA i koncentracije Cu u 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla ( $r = -0,586$ ). Također je utvrđena i značajna ( $P < 0,01$ ) negativna korelacija između DHA u tlu i (na osnovi njihova udjela u otopini tla (%)) procijenjenog programom Visual MINTEQ) izračunatih koncentracija  $\text{CuCO}_3$  i  $\text{Cu}_{\text{org}}$  kemijskih oblika Cu u otopini tla (tablica 12). Navedene korelacije upućuju na sličan inhibitorni učinak na DHA u tlu svih promatranih kemijskih oblika Cu u otopini tla, povezujući negativan učinak povećanih koncentracija Cu u tlu na DHA više sa biopristupačnošću Cu u tlu općenito, nego sa većim ili manjim negativnim učinkom određenih kemijskih oblika Cu u otopini tla. Iako korelacija ne implicira i uzročno-posljedičnu vezu, ipak postoji mogućnost i povratnog učinka između parametara koji koreliraju, odnosno da DHA može utjecati na biopristupačnost Cu u

tlu. Ovakva mogućnost osobito se odnosi na Cu zbog velikog afiniteta Cu za organske komponente u tlu te zbog činjenice da enzimi dehidrogenaze sudjeluju u procesima oksidacije OT u tlu. Otopljena OT (engl. Dissolved Organic Matter - DOM) sastoji se od organskih komponenti koje se nalaze u otopini tla te predstavljaju izvor supstrata za mikrobiološku aktivnost u tlu (Haynes, 2005). Oksidacijom OT u otopini tla djelovanjem enzima dehidrogenaza moglo bi se stvoriti više pozitivnog naboja na DOM-u, smanjujući na taj način sposobnost DOM-a da kompleksira kationske metale. Drugim riječima, rezultati upućuju na mogućnost da DHA može utjecati na biopristupačnost Cu u tlu tako da utječe na stvaranje metal-DOM kompleksa u otopini tla.

### **5.1.2. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari u tlu**

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> uzrokovao je povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu (za 5 %; tablica 8). Iako sama ukupna koncentracija Cu nije dovoljan podatak za procjenu njegove biopristupačnosti u tlu (Allen i Janssen, 2006; Reichman, 2002; Maderova i sur., 2011), česta je pozitivna korelacija između ukupne koncentracije nekog elementa i njegove biopristupačne frakcije. Ova korelacija obično je visoko značajna osobito u jako kontaminiranim tlima ili u tlima postupno kontaminiranim (engl. spiked) metalima (Romić i sur., 2004), što je potvrđeno i ovim istraživanjem jer je utvrđena visoko značajna korelacija ( $P < 0,01$ ) između ukupne koncentracije Cu u tlu i koncentracije Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla ( $r = 0,800$ ) (tablica 16).

Cu je u tlima obično prisutan u dvovalentnom obliku jer se jednovalentni oblik smatra izrazito nestabilnim (Reichman, 2002) te povećanje ukupne koncentracije Cu u tlu s povećanjem udjela OT (tablica 8) upućuje na zaključak da je Cu<sup>2+</sup> u prisutnosti povećanog udjela OT u tlu većinom adsorbiran na OT. Iz navedenog možemo zaključiti da je mobilnost Cu u tlu, a time i njegova pristupačnost organizmima, bila kontrolirana procesima sorpcije i kompleksacije s OT. Naime, Cu stvara vrlo stabilne organske komplekse (Liao, 2000; Romić, 2012) te je stoga OT korištena u pokusu kompleksirala više Cu, zadržavajući ga na taj način u krutoj fazi tla i uzrokujući povećanje njegove ukupne koncentracije u tlu (tablica 8), a time i smanjenje njegove mobilnosti u tlu (Romić i sur., 2012). Dodatno, da je Cu jako vezan na čvrstu OT u tlu u uvjetima gdje dolazi do isušivanja i ponovnog vlaženja tla potvrdili su i Degryse i sur. (2009). Isušivanje i ponovno vlaženje tla u pokusima u loncima s biljkama neizbježno je te je takav bio slučaj i u ovom pokusu. Također, OT\*Cu interakcija bila je visoko značajna ( $P < 0,01$ ) za ukupnu koncentraciju Cu u tlu (tablica 8), što također naglašava važnost navedene interakcije za konačnu sudbinu Cu u okolišu.

CaCl<sub>2</sub> kao ekstraktant daje mjeru trenutačno biopristupačnog Cu (uključujući topljive i lako zamjenjive oblike Cu) u prirodnim uvjetima (Yobouet i sur., 2010). Koncentracija Cu u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla smanjila se s dodatkom OT u varijanti OT<sub>2</sub> te je također utvrđena i visoko značajna interakcija OT\*Cu ( $P < 0,01$ ) za koncentraciju Cu u CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla (slika 11). Navedeni rezultati dodatno potvrđuju važnost uloge OT u biopristupačnosti Cu u tlu, odnosno da povećanje OT može smanjiti pristupačnost Cu organizmima u tlu.

Nadalje, modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cu u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan jasno upućuje na dominaciju Cu-kompleksa s huminskim kiselinama u otopini tla, neovisno o tretmanima pokusa (tablica 10). Već je poznato da će pri pH tla  $> 5$ , Cu u većini otopina tla biti prisutan kao Cu-DOC kompleks (Degryse i sur., 2009; Liao, 2000) te da biopristupačnost metala u tlima može varirati s obzirom na koncentraciju humusnih kiselina (Shahid i sur., 2012). Iz navedenog proizlazi da će u uvjetima povećanog udjela OT, (pri pH tla  $> 5$ ) Cu u otopini tla biti pretežno vezan s organskim ligandima, neovisno o varijacijama drugih okolišnih faktora kao što je primjerice povećan salinitet tla. Ipak, utvrđeno je i manje povećanje udjela kemijskog oblika CuCO<sub>3</sub> u otopini tla (%) s porastom kontaminacije tla Cu (Cu<sub>250</sub> i Cu<sub>500</sub>), ali samo ako nije povećan i udio OT (OT<sub>1</sub>) (tablica 10). Kompleksiranje Cu s anorganskim ligandima (većinom CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) raste pri neutralnom pH tla (Ondrašek i Rengel, 2012). Dakle, rezultati također upućuju na zaključak da je moguće povećanje anorganski kompleksiranog Cu u otopini tla (prvenstveno CuCO<sub>3</sub>) u odnosu na Cu kompleksiran s organskim ligandima, ali samo u uvjetima povećane ukupne koncentracije Cu u tlima s manjim udjelom OT, pri neutralnom do slabo bazičnom pH tla. Također, primijenjeni program za određivanje kemijske ravnoteže pokazuje da je većina Cu bila kompleksirana s humusnim kiselinama preko fenolnih funkcionalnih skupina (tablica 10), što je u suglasnosti s pretpostavkom da fenolne funkcionalne skupine imaju veći značaj za kompleksiranje metala na humusne kiseline u otopini tla pri višem pH tla (pH = 7,5-7,7; tablica 10), u odnosu na karboksilne funkcionalne skupine (Ondrašek i Rengel, 2012).

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> uzrokovao je i smanjenje ukupnih koncentracija drugih metalnih kationa u tlu (Ca, Mg, Fe, Mn i Zn) (tablica 8). Međutim, iako drugi metalni kationi mogu konkurirati Cu za sorpcijska mjesta na površini čvrste tvari u tlu (Degryse i sur., 2009), Cu stvara jače organske komplekse od drugih dvovalentnih prijelaznih metala (Romić, 2012) kao što su primjerice Fe, Mn ili Zn te bi navedena kompeticija mogla uzrokovati njihovo otpuštanje s čvrste OT u otopinu tla. Dodatno, kod varijante OT<sub>2</sub> je utvrđeno povećanje ukupne koncentracije Mo i S (tablica 8). Molibden se u tlima većinom nalazi kao anion MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup> koji može biti kompleksiran s OT zamjenom s OH<sup>-</sup> anionima (Mengel i Kirkby, 1979),

što omogućava njegovo zadržavanje u krutoj fazi tla i sprječavanje ispiranja. S druge strane, većina sumpora u tlu organskog je porijekla te je pretpostavka da je treset korišten u pokusu mogao predstavljati dodatni izvor sumpora i povećati njegovu ukupnu koncentraciju kod varijante OT<sub>2</sub> (tablica 8).

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> nije značajno smanjio koncentraciju Cu u listu (tablica 13) niti sjemenu (tablica 15) boba, ali je uzrokovalo statistički značajno smanjenje koncentracije Cu u mahuni boba za 14 % (tablica 14), što potvrđuje zaključak iz prethodnog poglavlja (Poglavlje 5.1.1.) da tkivo mahune boba (s obzirom na ostale analizirane nadzemne organe boba) najbolje odražava pristupačnu frakciju Cu u tlu (tablica 14).

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> statistički je značajno povećao DHA u tlu za 65 % (tablica 11). Enzimatska aktivnost u tlu često je usko povezana s udjelom OT u tlu (Das i Varma, 2011) te su mnoga istraživanja, uključujući i ovo istraživanje, dokazala da povećanje udjela OT u tlu može povećati DHA u tlu (Kalembasa i Symanowicz, i navedene reference, 2012). Poznato je da povećanje udjela OT u tlu može poboljšati fizikalne, kemijske i biološke značajke tla (Cha-um i Kirdmanee, 2011) te da različiti agrotehnički zahvati mogu utjecati na biogenost tla kao i na mikrobiološke procese (Sikora i sur., 2010). OT u tlu zadržava hraniva u tlu tako da sprječava njihovo ispiranje u dublje horizonte tla, ali i dalje dostupne (mikro)organizmima za primanje (Bohn i sur., 2001) te na taj način osigurava povoljnije uvjete za rast mikrobnih populacija u tlu. Često je potvrđena pozitivna linearna veza između mikrobne biomase i udjela OT u tlu (Kaurin i sur., 2015). S obzirom na to da dehidrogenaze imaju ulogu u oksidaciji OT, povećanje udjela OT predstavlja dodatni izvor supstrata za rad enzima, što se može odraziti i na povećanje njihove aktivnosti u tlu (tablica 11).

### **5.1.3. Modifikacija biopristupačnosti bakra biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem saliniteta tla**

pH tla jedan je od najznačajnijih faktora koji utječe na mobilnost, a time i biopristupačnost, elemenata u tlu, uključujući i metale. U ovom istraživanju, pH tla malo je, ali statistički značajno povećan primjenom NaCl (tablica 8). Poznato je da povećanje pH može rezultirati smanjenjem mobilnosti metala u tlu zbog povećanja njihove adsorpcije na krutu fazu tla, ali i povećanjem mobilnosti metala zbog povećanja koncentracije DOC-a u otopini tla (Kim i sur., 2010). Međutim, (kruta) OT jedan je od najznačajnijih faktora koji utječu na mobilnost Cu u tlu (Matijević i sur., 2014) te se povećanjem pH tla zbog procesa kompleksacije Cu s OT u tlu smanjuje koncentracija Cu u otopini tla, kao i aktivnost slobodnog iona Cu u otopini tla (Liao,

2000). Ipak, prema istraživanju Tao i sur. (2004), promjene pH tla koje su manje od pola jedinice malo će vjerojatno inducirati značajne promjene u frakcioniranju Cu u tlu. S obzirom na to da je povećanje pH tla s povećanjem stupnja zaslanjenosti tla u ovom istraživanju bilo minimalno, navedeni neizravan utjecaj povećanog saliniteta tla na pristupačnost Cu u tlu ne možemo sa sigurnošću potvrditi.

Iako ukupna koncentracija Cu u tlu nije otkrila značajan utjecaj primjene NaCl na biopristupačnost Cu u tlu (tablica 8), koncentracija Cu u 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla smanjila se s povećanjem stupnja zaslanjenosti tla, proporcionalno primijenjenim tretmanima zaslanjivanja ( $\text{NaCl}_{50}$  i  $\text{NaCl}_{100}$ ) (slika 11). Također, primjena NaCl značajno je smanjila koncentraciju Cu u sjemenu boba (tablica 15), dok su OT\*NaCl i NaCl\*Cu interakcije bile značajne ( $P < 0,05$ ) za koncentraciju Cu u mahuni boba (tablica 14). Dobiveni podaci upućuju na zaključak da je koncentracija Cu u biljnom tkivu biljaka uzgojenim u uvjetima povećanog stupnja zaslanjenosti tla rezultat više faktora, jedan od kojih je i salinitet tla, kao i njihovih interakcija. Poznato je da neki metali, kao što je primjerice Cd, mogu biti kompleksirani s anorganskim ligandima (kloridi) (Ondrašek i sur., 2009; Ondrašek i Rengel, 2012). Međutim, u ovom istraživanju Cu je gotovo u cijelosti bio kompleksiran s organskim ligandima (tablica 10). Ipak, smanjenje koncentracije Cu u  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla (slika 11) te u sjemenu boba (tablica 15) s povećanjem stupnja zaslanjenosti tla, ukazuje na mogućnost smanjenja mobilnosti Cu u zaslanjenim tlima i/ili njegovo smanjeno primanje u biljku iz zaslanjene rizosfere. Suvišak  $\text{Na}^+$  u otopini tla mogao bi inducirati kationsku zamjenu s primjerice Ca i Mg na adsorpcijskom kompleksu tla (Matijević i sur., 2012), dok je manje vjerojatno da bi mogao inducirati otpuštanje Cu kompleksiranog s OT. Naime, Cu stvara unutarstjerne komplekse s OT (BouDESCQUE i sur., 2007) koji predstavljaju mnogo čvršću vezu s OT od vanjskosfernih kompleksa kakve stvaraju zemnoalkalijski metali kao što su Ca i Mg (Tessier i sur., 1996). Tako bi primjena NaCl i posljedično povećanje koncentracije  $\text{Na}^+$  u otopini tla mogli omogućiti Cu da se veže na oslobođena mjesta na OT te bi navedeni učinak mogao uzrokovati smanjenje koncentracije pristupačnog Cu u tlu (slika 11). Rezultati dakle upućuju na zaključak da povećan stupanj zaslanjenosti tla može izravno i/ili neizravno utjecati i na biopristupačnost Cu u tlu: izravno smanjenjem mobilnosti Cu u tlu zbog povećanja njegove adsorpcije na OT te neizravno smanjenjem njegova primanja iz zaslanjene rizosfere u korijen.

Također, mogućnost ameliorativnog učinka visoke koncentracije Na u otopini tla (tablica 9) na toksični učinak povećanih koncentracija Cu u tlu na biljke je također istražen. Biljni kapacitet zamjene kationa (engl. Plant Cation Exchange Capacity - biljni CEC) određen je zamjenjivim mjestima na staničnoj stijenci stanica korijena biljke (Reichman, 2002), što

dopušta pretpostavku da saturacija zamjenjivih mjesta na staničnoj stijenci suviškom  $\text{Na}^+$  može utjecati na primanje ostalih kationa ( $\text{Cu}^{2+}$ ) iz otopine tla. Ipak, s obzirom na to da Cu može izmjestiti većinu drugih iona sa stanične stijenke stanica korijena (Mengel i Kirkby, 1979), čini se malom vjerojatnost da suvišak iona  $\text{Na}^+$  može u tolikoj mjeri smanjiti primanje Cu u biljku da bi se to odrazilo i na značajno smanjenje toksičnog učinka povećanih koncentracija Cu u tlu na biljku. Ipak, takvu mogućnost ostavljaju otvorenom istraživanja koja su primjerice proveli Chiu i sur. (1995), a koji su sugerirali da NaCl reducira toksični učinak Cu (i Zn) kod halofitne biljne vrste *Kandelia candel*. Bob se ne može smatrati halofitnom kulturom, međutim njegova sposobnost preživljavanja u zaslanjenim uvjetima već je potvrđena, kao i mogućnost postojanja biljnih mehanizama adaptacije na povećan stupanj zaslanjenosti tla (Matijević i sur., 2012).

Isto tako, utvrđena je i mogućnost suprotnog učinka, odnosno zabilježeno je povećanje koncentracije Na u listu boba (tablica 13), praćeno smanjenjem koncentracije  $\text{Na}^+$  u otopini tla (tablica 9), s povećanjem ukupne koncentracije Cu u tlu. Dodatno, NaCl\*Cu interakcija bila je značajna ( $P < 0,05$ ) za koncentraciju  $\text{Na}^+$  u otopini tla (tablica 9). Rezultati stoga upućuju na povećano primanje Na u korijen boba iz tla kontaminiranog Cu. Već je poznato da visoke koncentracije Cu u tlu mogu imati štetan utjecaj na strukturu plazmatske membrane korijena, ometajući tako primanje drugih hraniva (de Vos i sur., 1991; Arduini i sur., 1995). Iz navedenog proizlazi da bi povećana koncentracija Cu u tlu mogla doprinijeti povećanom influksu Na u stanice korijena boba u uvjetima povećane zaslanjenosti tla. S obzirom na to da se suvišak Na obično akumulira u listu biljaka (Ondrašek i sur., 2009), za očekivati je da bi se takav učinak u mogao odraziti na elementarni sastav lista biljke, kakav je i bio slučaj u ovom istraživanju (tablica 13). Također, rezultati upućuju na mogućnost da u uvjetima povećane koncentracije Cu u tlu može doći do narušavanja strukture plazmatske membrane korijena boba.

Dodatno, primjena NaCl značajno je smanjila DHA u tlu (za 28 % pri  $\text{NaCl}_{100}$  tretmanu; tablica 11). Povećana zaslanjenost tla smanjuje enzimatsku aktivnost u tlu zbog osmotskog i ionskog stresa kojemu su izložene mikrobne populacije u prisutnosti visokih koncentracija soli u tlu (Rao i Pathak, 1996). Visoke koncentracije soli u tlu mogu uzrokovati značajne promjene u vodnom potencijalu tla, što se može negativno odraziti na normalnu staničnu aktivnost mikrobni populacija. Isto tako, povećane koncentracije soli u tlu zbog interferencije s primanjem hraniva, mogu uzrokovati smetnje u kompetitivnom primanju hraniva iz tla i/ili njihovoj raspodjeli unutar mikrobni stanica, uzrokujući u konačnici usporavanje rasta mikrobni stanica i/ili staničnu smrt. Osim navedenog, većina abiotičkih i biotičkih stresova može inducirati oksidativni stres u stanicama, koji je karakteriziran povećanim stvaranjem slobodnih radikala (engl. Reactive Oxygen Species - ROS) koji mogu dovesti do nespecifične

oksidacije proteina i membranskih lipida u stanicama te uzrokovati oštećenja nukleinskih kiselina (Schützendübel i Polle, 2002). Smanjenje DHA s porastom stupnja zaslanjenosti tla potvrđeno je i u drugim istraživanjima (Malik i sur., 1995; Batra i Manna, 1997) te također objašnjeno smanjenjem mikrobne biomase zbog osmotskog stresa nastalog zbog povećane koncentracije soli u tlu, kao i specifičnom ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) toksičnosti koja može uzrokovati smetnje u ishrani mikrobnih stanica i posljedičnom smanjenju mikrobne biomase, a time i njihove (dehidrogenazne) aktivnosti (tablica 11).

## **5.2. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari i saliniteta tla**

### **5.2.1. Biopristupačnost kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) u tlu kontaminiranom kadmijem**

Iako je kontaminacija tla Cd ( $Cd_5$  i  $Cd_{10}$ ) rezultirala tretmanima proporcionalnim povećanjem ukupne koncentracije Cd u tlu (tablica 17), koncentracija Cd u  $CaCl_2$  ekstraktu tla statistički je značajno povećana samo pri najvećem tretmanu kontaminacije tla Cd ( $Cd_{10}$ ) te nije pronađena razlika između koncentracije Cd u  $CaCl_2$  ekstraktu kontrolnog tla ( $Cd_0$ ) i tla kontaminiranog srednjim tretmanom Cd ( $Cd_5$ ) (slika 13). Navedeni rezultati jasno pokazuju da pristupačnost Cd u tlu nije linearno slijedila ukupnu koncentraciju Cd u tlu, upućujući na zaključak da na pristupačnost Cd u tlu, osim njegove ukupne koncentracije u tlu, također utječu i drugi faktori. Poznato je da se samo mali udio u ukupnoj koncentraciji metala obično nalazi u njegovom pristupačnom obliku u tlu (Leštan i Grčman, 2001). Isto tako, veliki sorpcijski kapacitet tla upotrijebljenog u pokusu (dosta humozno tlo koje je po granulometrijskom sastavu praškasto glinasta ilovača - PrGI; tablica 7) mogao je utjecati na pristupačnost Cd u tlu tako da je Cd u kontrolnom tlu ( $Cd_0$ ) i tlu kontaminiranom srednjim tretmanom Cd ( $Cd_5$ ) većina Cd zadržana na adsorpcijskom kompleksu tla. Navedeni učinak bi smanjio pristupačnost Cd u tlu, odnosno utjecao na koncentraciju Cd u  $CaCl_2$  ekstraktu tla. Stoga možemo pretpostaviti da je pri  $Cd_5$  tretmanu kontaminacije tla Cd, tlo upotrijebljeno u pokusu bilo u mogućnosti zadržati većinu Cd na svom adsorpcijskom kompleksu, umanjujući na taj način učinak  $Cd_5$  kontaminacije na koncentraciju Cd u  $CaCl_2$  ekstraktu tla, odnosno njegovu pristupačnost u tlu (slika 13).

Međutim, povećana ukupna koncentracija Cd u tlu značajno je, ali i tretmanima kontaminacije tla Cd ( $Cd_5$  i  $Cd_{10}$ ) proporcionalno, povećala koncentraciju Cd u listu (tablica 22), mahuni (tablica 23) i sjemenu (tablica 24) boba. Navedeni rezultati ipak upućuju na zaključak da povećanje ukupne koncentracije Cd u tlu uzrokuje njegovu povećanu biopristupačnost u tlu. Iako ukupna koncentracija Cd u tlu nije dovoljan podatak za procjenu njegove fitopristupačnosti, često je u istraživanjima potvrđeno povećano primanje Cd u biljku s povećanjem njegove ukupne koncentracije u tlu (Smolders, 1998). U skladu s navedenim su i podaci dobiveni korelacijama između ukupne koncentracije Cd u tlu, koncentracije Cd u 0,01 M  $CaCl_2$  ekstraktu tla te koncentracije Cd u tkivu boba (list, mahuna, sjeme) (tablica 25). Naime, utvrđena je bolja korelacija između ukupne koncentracije Cd u tlu i koncentracije Cd

u tkivu boba (list, mahuna, sjeme), nego između koncentracije Cd u 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla te koncentracije Cd u tkivu boba. Nadalje, najviši korelacijski koeficijent ( $r=0,824$ ) pronađen je između ukupne koncentracije Cd u tlu i koncentracije Cd u listu boba (tablica 25).

Kada procjenjujemo biopristupačnosti Cd u tlu kontaminiranom Cd, moramo uzeti u obzir da je kontaminacija tla Cd praćena cijelim nizom kaskadnih reakcija u tlu te da je koncentracija Cd u otopini tla rezultat mnogobrojnih, međusobno povezanih, procesa kao što su: oksidacija-redukcija, precipitacija-otapanje, adsorpcija-desorpcija te formiranje različitih anorganskih i organskih kompleksa u tlu (Romić, 2012). Cd adsorbiran na mineralne površine u tlu vezan je reverzibilnom adsorpcijom (Cullen i Maldonado, 2013), što ga čini vrlo mobilnim između različitih frakcija u tlu (Kos i sur., 2003). Iako navedeno upućuje na zaključak da se Cd relativno lako može mobilizirati u tlu i manjim promjenama okolišnih uvjeta, s obzirom na sve rezultate dobivene u ovom istraživanju, možemo pretpostaviti da veza između mobilnosti Cd u tlu i njegove biopristupačnosti, nije nužno linearna. Odnosno, rezultati upućuju na zaključak da fizikalno-kemijske značajke tla kontaminiranog Cd mogu utjecati na vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla, koje može biti manje ili veće od brzine njegova primanja u korijen. Iz navedenog proizlazi da ukoliko tlo ima veliki sorpcijski kapacitet za Cd, vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla pri prelasku s jedne na drugu krutu fazu tla (ukoliko je došlo do njegove mobilizacije u tlu) može biti kraće od brzine njegova primanja u korijen, što bi rezultiralo manjom koncentracijom Cd u biljnom tkivu, odnosno obrnuto. Međutim, i vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla s velikim sorpcijskim kapacitetom, ali i brzina njegova primanja iz otopine tla u korijen, ponajviše će ovisiti o kemijskom obliku Cd u otopini tla. Naime, poznato je da se nekompleksirani (slobodni) ion metala u otopini tla smatra najpristupačnijim kemijskim oblikom metala za njegovo primanje u biljku (Ghallab i Usman, 2007). Stoga, povećano primanje Cd u biljku s rastućom ukupnom koncentracijom Cd u tlu (tablica 22, 23 i 24), upućuje na povećanje udjela kemijskog oblika Cd<sup>2+</sup> u otopini tla.

Međutim, modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ i modela NICA-Donnan pokazala je da je kontaminacija tla Cd<sub>5</sub> tretmanom rezultirala samo manjim promjenama u udjelu različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) u odnosu na otopinu kontrolnog tla (OT<sub>1</sub>, NaCl<sub>0</sub>, Cd<sub>0</sub>) (tablica 19). Naime, Cd u otopini kontrolnog tla većinom se nalazio kao slobodni Cd<sup>2+</sup> (42% od ukupne koncentracije), što je u suglasnosti s drugim istraživanjima (Bataillard i sur., 2003) te je tek pri Cd<sub>10</sub> tretmanu tla utvrđen porast udjela slobodnog Cd<sup>2+</sup> (do 47% od ukupne koncentracije) (tablica 19). Kako slaba ekstrakcijska sredstva kao što je 0,01 M CaCl<sub>2</sub> ekstrahiraju frakciju metala u tlu koja se smatra dostupnom biljkama za primanje (Ivezić i sur., i navedene reference, 2013),

podaci dobiveni navedenom ekstrakcijom korišteni su za modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) primjenom programa Visual MINTEQ (tablica 19). Iz navedenog proizlazi da ukoliko je i došlo do trenutalnog povećanja koncentracije  $\text{Cd}^{2+}$  pri  $\text{Cd}_5$  tretmanu kontaminacije tla Cd, to ne bi bilo vidljivo iz rezultata dobivenih navedenim modeliranjem. No, uzevši u obzir oba tretmana kontaminacije tla Cd ( $\text{Cd}_5$  i  $\text{Cd}_{10}$ ), modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) ipak upućuje na zaključak da, ukoliko ostali okolišni parametri nisu promijenjeni, povećanje ukupne koncentracije Cd u tlu će rezultirati povećanjem udjela (%) slobodnog  $\text{Cd}^{2+}$  u otopini tla (tablica 19).

Kada uzmemo u obzir sve navedene rezultate, možemo ustvrditi da je kontaminacija tla Cd rezultirala povećanjem njegove ukupne koncentracije u tlu (tablica 17), ali i njegove pristupačnosti biljkama boba (tablica 22, 23 i 24). Iako postoji mogućnost da je tlo upotrijebljeno u pokusu bilo u mogućnosti zadržati većinu Cd na svom adsorpcijskom kompleksu, umanjujući na taj način učinak  $\text{Cd}_5$  kontaminacije na koncentraciju Cd u  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla (slika 13), to se ipak nije u dovoljnoj mjeri odrazilo i na njegovu biopristupačnost u tlu (tablica 22, 23 i 24). Iz navedenog proizlazi da je vrijeme zadržavanja  $\text{Cd}^{2+}$  u otopini tla pri prelasku s jedne na drugu krutu fazu tla, bilo dovoljno da bi bio primljen u korijen boba, odnosno da je brzina primanja  $\text{Cd}^{2+}$  iz otopine tla u korijen biljke bila veća od brzine njegove ponovne adsorpcije na krutu fazu tla, što je rezultiralo povećanom koncentracijom Cd u biljnom tkivu proporcionalno tretmanima kontaminacije tla Cd (tablica 22, 23 i 24).

Dodatno, kontaminacija tla Cd ( $\text{Cd}_5$  i  $\text{Cd}_{10}$ ) uzrokovala je smanjenje koncentracije Zn u sjemenu boba (tablica 24). Nespecifična propusnost stanica korijena obično je objašnjenje inhibicije primanja Zn u prisutnosti povećanih koncentracija Cd u tlu, vjerojatno zbog njihove kompeticije za proteinske transportere na plazmatskoj membrani korijena, ili zbog interferencije Cd s ekspresijom gena koji su zaduženi za regulaciju proteinskih transportera (Andersen i Küpper, 2013). S obzirom na to da je  $\text{Cd}^{2+}$  kemijski sličan  $\text{Zn}^{2+}$ , rezultati upućuju na zaključak da Cd može konkurirati Zn za mjesto na proteinskim transporterima plazmatske membrane korijena boba. Također, povećana ukupna koncentracija Cd u tlu je uzrokovala smanjenje koncentracije Ca u listu (tablica 22) i mahuni (tablica 23) boba. Ca-Cd kompeticija za transportne kanale kod ulaska hraniva u ksilem biljke već je sugerirana u prijašnjim (Vondráčková i sur., 2014), a potvrđena i ovim istraživanjem. Nadalje, s povećanjem ukupne koncentracije Cd u tlu utvrđeno je i povećanje koncentracije S u listu boba (tablica 22). Poznato je da Cd ima veliki afinitet prema tiolnim skupinama (SH) u biljnim enzimima i drugim proteinima te postoji mogućnost da obrambeni mehanizam biljke protiv toksičnog učinka povećane koncentracije Cd u okolnom mediju uključuje i povećano primanje S iz otopine tla (Gill i Tuteja, 2011; Andersen i Küpper, 2013). Iako je u ovom istraživanju

potvrđena povećana koncentracija S u listu boba s kontaminacijom tla Cd ( $Cd_5$  i  $Cd_{10}$ ) (tablica 22), samo iz elementarnog sastava lista ne možemo sa sigurnošću potvrditi prethodno navedena istraživanja, kao niti da je učinjena kontaminacija tla Cd izazvala aktivaciju adaptacijskih mehanizama biljaka boba. Ipak, s obzirom na prethodno navedene rezultate, kao i činjenicu da su sve biljke boba korištene u pokusu bile sposobne završiti svoj životni ciklus, odnosno producirati mahune i sjeme, navedena mogućnost ipak postoji i trebala bi se dalje istražiti u budućim istraživanjima.

Na sličan zaključak upućuju i rezultati mjerenja fotosintetskih pokazatelja lista boba koji iako su pokazali mogući toksični učinak kontaminacije tla Cd na molekule klorofila jer je indeks sadržaja klorofila (CCI) smanjen za 4% pri  $Cd_{10}$  kontaminaciji tla (slika 14 e), navedeni se učinak nije odrazio na intenzitet fotosinteze (A) (slika 14 d). Poznato je da povećane koncentracije Cd u biljnom tkivu mogu smanjiti aktivnost fotosintetskih enzima te smetnje u fotosintetskom transportnom lancu elektrona, rezultirajući smanjenom sintezom (a time i smanjenim CCI) molekula klorofila u listu te da Cd može zamijeniti dva esencijalna iona -  $Ca^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ , prisutna u reakcijskom centru fotosustava II (*Photosystem* - PS II) (Hossain i sur., 2014). U ovom istraživanju je uz smanjenje CCI u listu boba s kontaminacijom tla Cd (slika 14 e) utvrđeno i smanjenje koncentracije Ca u listu boba (tablica 22), što ukazuje na mogućnost da je povećana koncentracija Cd mogla uzrokovati smetnje u funkcioniranju fotosustava II. Ipak, navedeni učinak se nije odrazio na intenzitet fotosinteze (A) u listu boba (slika 14 d), upućujući na mogućnost da su biljke boba mogle aktivirati određene strukturalne i/ili funkcionalne modifikacije potrebne za održanje intenziteta fotosinteze unatoč smanjenju CCI uzrokovanim kontaminacijom tla Cd.

Kako se enzimatska aktivnost u tlu često koristi kao biološki pokazatelj negativnog utjecaja onečišćenja na kvalitetu tala (Das i Varma, 2011), kao dodatni pokazatelj učinka kontaminacije tla Cd ( $Cd_5$  i  $Cd_{10}$ ) na organizme u tlu, procijenjeno je i djelovanje kontaminacije tla Cd na DHA u tlu (tablica 20). Iako je poznato da povećane koncentracije metala u tlu mogu negativno utjecati na DHA (Wyszkowska i Wyszkowski, 2003), nije pronađen značajan utjecaj povećane ukupne koncentracije Cd u tlu na DHA u tlu (tablica 20). Wolińska i Stępniewska (2012) su u svojim istraživanjima utjecaja koncentracija Cd u tlu na DHA pronašle da je koncentracija Cd od  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  zapravo imala stimulativan učinak na DHA u tlu, dok je koncentracija Cd od  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  imala jak inhibitoran učinak na DHA. U ovom istraživanju nije utvrđen ni stimulativni, niti inhibitorni učinak ispitivanih koncentracija Cd u tlu ( $Cd_5$  i  $Cd_{10}$ ) na DHA u tlu, odnosno ispitivane koncentracije Cd nisu predstavljale ni pozitivnu niti negativnu granicu koncentracije Cd u tlu na DHA. Međutim, iako nije potvrđen učinak ukupne koncentracije Cd na DHA u tlu (tablica 20), pronađena je značajna ( $P < 0,01$ )

negativna korelacija između DHA u tlu i (na osnovi njihova udjela u otopini tla (%)) procijenjenog programom Visual MINTEQ) izračunate koncentracije Cd kompleksiranog s kloridima u otopini tla ( $\text{CdCl}_n^{2-n}$ ), s korelacijskim koeficijentom  $r=-0,514$  (tablica 21). Postojanje navedene negativne korelacije upućuje na mogućnost da  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kemijski oblici Cd u otopini tla imaju jači inhibitorski učinak od drugih kemijskih oblika Cd u otopini tla na DHA u tlu. Ovakav zaključak potvrđuje i činjenica da iako povećana ukupna koncentracija Cd u tlu nije imala učinka na DHA, interakcija između  $\text{NaCl} \cdot \text{Cd}$  ipak je bila značajna ( $P<0,05$ ) za DHA u tlu (tablica 20).

### 5.2.2. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem organske tvari u tlu

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> rezultirao je malim, ali statistički značajnim smanjenjem pH tla (tablica 17), upućujući na zaključak da su  $\text{H}^+$  razgradnjom OT otpušteni u otopinu tla. Iako dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> nije utjecao na ukupnu koncentraciju Cd u tlu (tablica 17), uzrokovao je smanjenje koncentracije Cd u  $\text{CaCl}_2$  ekstraktu tla (slika 13). Poznato je da ukupna koncentracija nije dobar pokazatelj biopristupačnosti metala u tlu (Reichman, 2002) te stoga rezultati  $\text{CaCl}_2$  ekstrakcije tla upućuju na zaključak da je biopristupačnost Cd u tlu smanjena dodatkom OT, što je u suglasnosti s prethodnim istraživanjima (Ciadamidaro i sur., 2015).

Modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) u odnosu samo na povećan udio OT (usporedba  $\text{Cd}_0\text{-NaCl}_0\text{-OT}_1$  i  $\text{Cd}_0\text{-NaCl}_0\text{-OT}_2$  varijanti pokusa) pokazuje da je povećani DOC, koji je u modelu dodijeljen povećanom udjelu OT (OT<sub>2</sub>), uzrokovao porast u udjelu Cd kompleksa s huminskim kiselinama (i do 60% od ukupne koncentracije), i to pretežno na račun udjela  $\text{Cd}^{2+}$  u otopini tla (tablica 19). Također, treba uzeti u obzir da se pH tla u ovom istraživanju kretao u rasponu od 7,6-7,7 (tablica 17) te je poznato da kako pH tla raste iznad neutralnog pH, sorpcija DOC-a u tlu postaje slabija, a time raste mogućnost stvaranja DOC-kation kompleksa u otopini tla (Römkens i sur., 1996). Dakle, rezultati upućuju na zaključak da povećan udio OT, posljedičnim povećanjem koncentracije DOC-a u otopini tla, smanjuje aktivnost slobodnog  $\text{Cd}^{2+}$  u otopini tla, a time i njegovo primanje u korijen.

Prethodno navedeni zaključak potvrđuje i činjenica da je koncentracija Cd u tkivu boba smanjena dodatkom OT u varijanti OT<sub>2</sub> (koncentracija Cd u listu boba smanjena je za 28 %, u mahuni za 40 % te u sjemenu za 20 %; tablica 22, 23 i 24). Smanjeno primanje Cd u biljku iz tla koje sadrži veliki udio OT također je potvrđeno i za druge poljoprivredne kulture te

objašnjeno redistribucijom Cd s pristupačnih frakcija u tlu (vodotopljiva frakcija i lako zamjenjiva frakcija) na manje pristupačnu organsku frakciju Cd u tlu (Ondrašek i sur., 2009; Pinto i sur., 2004; Shuman i sur., 2002).

Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> je, kao i u pokusu s kontaminacijom tla Cu, statistički značajno povećalo DHA (za 30 %) (tablica 20), što je objašnjeno u Poglavlju 5.1.2.

### **5.2.3. Modifikacija biopristupačnosti kadmija biljci boba (*Vicia faba* L.) pod utjecajem saliniteta tla**

Primjena NaCl statistički je značajno utjecala na ukupnu koncentraciju Cd u tlu, ali bez očitog trenda u odnosu na tretmane (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) (tablica 17). U isto vrijeme, utvrđen je i značajan utjecaj primjene NaCl na koncentraciju Cd u CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla, s najvišom koncentracijom Cd utvrđenom u CaCl<sub>2</sub> ekstraktu kontrolnog tla (NaCl<sub>0</sub> - bez zaslanjivanja) (slika 13). S obzirom na to da je najniža ukupna koncentracija Cd u tlu utvrđena u kontrolnom tlu (NaCl<sub>0</sub>) (tablica 17), rezultati dobiveni CaCl<sub>2</sub> ekstrakcijom (slika 13) zapravo potvrđuju da je najveća pristupačnost Cd bila u tlu kojemu nije povećan stupanj zaslanjenosti (NaCl<sub>0</sub>). Isto tako, nije utvrđena značajna razlika između koncentracija Cd u u CaCl<sub>2</sub> ekstraktu tla između primijenjenih tretmana zaslanjivanja (NaCl<sub>50</sub> i NaCl<sub>100</sub>) (slika 13).

Modeliranje udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla (%) u odnosu samo na povećan stupanj zaslanjenosti tla (usporedba Cd<sub>0</sub>-NaCl<sub>0</sub>-OT<sub>1</sub>, Cd<sub>0</sub>-NaCl<sub>5</sub>-OT<sub>1</sub> i Cd<sub>0</sub>-NaCl<sub>10</sub>-OT<sub>1</sub> varijanti pokusa) pokazalo je da se Cd u otopini zaslanjenih tala većinom nalazi kao CdCl<sub>n</sub><sup>2-n</sup> kompleks (CdCl<sup>+</sup> i CdCl<sub>2</sub>: 62-72% od ukupne koncentracije) te da je, u odnosu na tla koja nisu zaslanjena, smanjen udio (%) svih ostalih kemijskih oblika Cd u otopini tla (tablica 19). Poznato je da će u otopinama tala koje sadrže velike koncentracije Cl<sup>-</sup>, Cd primarno biti kompleksiran s kloridima (Adriano, 2001), pri čemu je dominantni kemijski oblik CdCl<sup>+</sup>, dok udio CdCl<sub>2</sub> raste s porastom stupnja zaslanjenosti tla, odnosno s porastom koncentracije klorida u otopini tla (tablica 18). Iz rezultata proizlazi da će povećanje stupnja zaslanjenosti tla i posljedično povećanje koncentracije klorida u otopini tla, formiranjem CdCl<sub>n</sub><sup>2-n</sup> kompleksa, smanjiti koncentraciju slobodnog Cd<sup>2+</sup>, kao i organski kompleksiranog Cd u otopini tla. Smanjenje koncentracije Cd kompleksiranog s huminskim kiselinama s porastom koncentracije drugih iona u otopini tla u suglasnosti je s istraživanjem koje su proveli Abasiyan i Tofighi (2013) te je poznato da povećane koncentracije Na<sup>+</sup> u otopini tla mogu konkurirati metalnim kationima za negativno nabijene funkcionalne skupine na huminskim kiselinama (Ondrašek i sur., 2012). Dakle, ovo istraživanje potvrđuje da povećana (NaCl)

zaslanjenost tla utječe na specijaciju Cd u otopini tla povećanjem udjela (%)  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa, a prvenstveno kemijskog oblika  $\text{CdCl}^+$ . U  $\text{CdCl}^+$  obliku Cd je slabije vezan za čestice tla (nego  $\text{Cd}^{2+}$ ) te uz činjenicu da su kloridi izrazito mobilni u tlu, povećanjem stupnja (NaCl) zaslanjenosti tla očekuje se i povećana mobilnost Cd u tlu, a time i njegova povećana biopristupačnost. Međutim, rezultati dobiveni  $\text{CaCl}_2$  ekstrakcijom (slika 13) pokazuju da je najveća pristupačnost Cd zapravo bila u tlu kojemu nije povećan stupanj zaslanjenosti ( $\text{NaCl}_0$ ). Iz navedenih rezultata proizlazi da povećana mobilnost Cd u tlu ne mora uvijek rezultirati i njegovom povećanom biopristupačnošću. Naime, ako uzmemo u obzir da je tlo upotrijebljeno u pokusu imalo veliki adsorpcijski kapacitet za Cd (tablica 7), moguće je da su kloridi pri istraživanim koncentracijama NaCl ( $\text{NaCl}_{50}$  i  $\text{NaCl}_{100}$ ) služili samo kao nosač za Cd pri njegovu prelasku s jedne krute faze tla na drugu. Također, koncentracija  $\text{Cl}^-$  u saturacijskom vodnom ekstraktu tla smanjena je s kontaminacijom tla Cd u odnosu na kontrolno tlo, bez razlike između tretmana ( $\text{Cd}_5$  i  $\text{Cd}_{10}$ ) (tablica 18), upućujući da je kontaminacija tla Cd mogla povećati adsorpciju  $\text{Cl}^-$  u tlu. Spomenuti rezultati zajedno s rezultatima modeliranja udjela različitih kemijskih oblika Cd u otopini tla koje je pokazalo da se Cd u otopini zaslanjenih tala većinom nalazi kao  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleks (tablica 19), upućuju na mogućnost da je Cd i u obliku klorokompleksa mogao biti zadržan na adsorpcijskom kompleksu tla. Iz navedenog proizlazi da iako bi povećani stupanj (NaCl) zaslanjenosti tla inicijalno uzrokovao povećanu mobilnost Cd u tlu, ukoliko to tlo ima veliki adsorpcijski kapacitet, može rezultirati samo redistribucijom Cd unutar krute faze tla, a ne nužno i njegovom povećanom biopristupačnošću u tlu. Ipak, iz navedenog također proizlazi da bi daljnje povećanje stupnja (NaCl) zaslanjenosti tla ( $>100 \text{ mM NaCl}$ ) moglo dovesti i do povećane biopristupačnosti Cd u tlu, nakon što bi adsorpcijski kapacitet tla za Cd bio premašen. Drugim riječima, djelovanje povećane NaCl zaslanjenosti na biopristupačnost Cd u tlu ovisit će o stupnju zaslanjenosti tla, a koliki stupanj zaslanjenosti tla će uzrokovati povećanu biopristupačnost Cd u tlu bit će uvjetovano fizikalno-kemijskim značajkama tla.

Prethodno navedenu mogućnost potvrđuju i koncentracije Cd u listu boba jer je najviša koncentracija Cd utvrđena u listu biljaka uzgojenim u tlu navodnjavanim kontrolnom otopinom ( $\text{NaCl}_0$ ), dok je primjena NaCl značajno smanjila koncentraciju Cd u listu boba, no bez razlike između tretmana zaslanjivanja ( $\text{NaCl}_{50}$  i  $\text{NaCl}_{100}$ ) (tablica 22). Međutim, primjenom NaCl smanjena je i suha tvar lista boba (tablica 22) što upućuje na moguću inhibiciju translokacije elemenata u listove biljke zbog smanjenog transpiracijskog toka (slika 14c). Ipak, suha tvar lista i transpiracija smanjene su proporcionalno NaCl tretmanima (tablica 22, slika 14c), dok je koncentracija Cd u listu boba primjenom NaCl smanjena samo u odnosu na kontrolne biljke, bez razlike između tretmana (tablica 22), pokazujući isti trend kao i podaci dobiveni  $\text{CaCl}_2$  ekstrakcijom (slika 13). Stoga rezultati ipak upućuju na zaključak da je

primjena NaCl mogla smanjiti biopristupačnost Cd u tlu. Ako povežemo ove rezultate s prethodnom pretpostavkom da su kloridi pri istraživanim koncentracijama NaCl ( $\text{NaCl}_{50}$  i  $\text{NaCl}_{100}$ ) služili samo kao nosač za Cd pri njegovu prelasku s jedne krute faze tla na drugu, isti mehanizam čini se kao najvjerojatnije objašnjenje. Naime, iako se  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksi smatraju fitopristupačnim oblicima Cd u tlu, njihovo je primanje u korijena sporije od primanja  $\text{Cd}^{2+}$  jer Cd koji potječe iz  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa može ući u stanice korijena ili izravno kao  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleks, i/ili disocirajući iz  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa pri kontaktu s korijenom, ulazeći u stanice korijena kao  $\text{Cd}^{2+}$  (Crea i sur., 2013). Iz navedenog proizlazi da je vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla u  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  obliku pri prelasku s jedne na drugu krutu fazu tla bilo kraće od vremena potrebnog da bi ga korijen boba primio kao  $\text{CdCl}_n^{2-n}$ , odnosno da je brzina primanja  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  iz otopine tla u korijen biljaka bila manja od brzine njegove ponovne adsorpcije na krutu fazu tla, što je moglo rezultirati smanjenom koncentracijom Cd u listu boba (tablica 22) primjenom NaCl. Slične rezultate dobili su i Lefèvre i sur. (2008), koji su pronašli da je povećana NaCl i KCl zaslanjenost tala smanjila akumulaciju Cd u korijenu i nadzemnim organima halofitne biljne vrste *Atriplex halimus*. Slično, Mühling i Läuchli (2003) su s povećanjem stupnja zaslanjenosti tla pronašli značajno povećanje koncentracije Cd u nadzemnim biljnim organima samo kod genotipa pšenice koji je osjetljiv na povećane koncentracije soli u rizosferi, dok su Mei i sur. (2014) u svojim istraživanjima sugerirali da kompeticija između Na i Cd za proteinske transportere na plazmatskoj membrani korijena biljke može smanjiti primanje Cd u biljku. Dodatno, primjena NaCl nije imala statistički značajan utjecaj na koncentraciju Cd u mahuni (tablica 23) niti sjemenu (tablica 24) boba, upućujući na mogućnost da povećana koncentracija NaCl u tlu nema utjecaja na transport Cd floemom unutar biljaka boba, odnosno da nije utjecala na mobilnost Cd od listova prema plodovima biljke.

Također, primjena NaCl značajno je smanjila DHA u tlu (za 29 % pri  $\text{NaCl}_{100}$  tretmanu; tablica 20), što je potvrdilo rezultate navedenog utjecaja koji su dobiveni u pokusu s kontaminacijom tla Cu (tablica 11), gdje je navedeni utjecaj i detaljnije objašnjen (Poglavlje 5.1.3.).

## 6. ZAKLJUČCI

1. Udio OT je uz pH tla najznačajniji je faktor koji utječe na mobilnost i biopristupačnost Cu u tlu. Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> smanjio je biopristupačnost Cu procesima sorpcije i kompleksacije s OT (ukupna koncentracija Cu u tlu povećana je za 5 %). Cu je u otopini tla (čiji je pH približno neutralan do slabo lužnat) pretežno prisutan kao Cu-DOC kompleks, dok udio drugih kemijskih oblika Cu u otopini tla raste samo u slučaju povećane ukupne koncentracije Cu u tlu s manjim udjelom OT. Fitopristupačnost Cu također može biti smanjena povećanjem udjela OT u tlu (koncentracija Cu u mahuni boba smanjena je za 14 %), međutim navedeni utjecaj može biti modificiran biljnim regulatornim mehanizmima.
2. Utvrđena je mogućnost smanjene mobilnosti Cu u zaslanjenim tlima i/ili njegovo smanjeno primanje u biljku iz zaslanjene rizosfere. Rezultati upućuju na zaključak da povećan stupanj zaslanjenosti tala može izravno i/ili neizravno utjecati i na biopristupačnost Cu u tlu: izravno smanjenjem mobilnosti Cu u tlu zbog povećanja njegove adsorpcije na OT u tlu te neizravno smanjenjem njegova primanja iz zaslanjene rizosfere u korijen.
3. Iako i manje promjene okolišnih uvjeta mogu rezultirati mobilizacijom Cd u tlu, rezultati upućuju na zaključak da veza između mobilnosti Cd u tlu i njegove biopristupačnosti, nije nužno linearna: fizikalno-kemijske značajke tla mogu utjecati na vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla, koje može biti manje ili veće od brzine njegova primanja u korijen. Ukoliko tlo ima veliki sorpcijski kapacitet za Cd, vrijeme zadržavanja Cd u otopini tla pri prelasku s jedne na drugu krutu fazu tla može biti kraće ili duže od brzine njegova primanja u korijen, ovisno o kemijskom obliku Cd u otopini tla. Kontaminacija Cd tla s velikim adsorpcijskim kapacitetom za Cd ipak dovodi do periodičkog povećanja udjela Cd<sup>2+</sup> u otopini tla, čija je brzina primanja u korijen biljke veća od brzine njegove ponovne adsorpcije na krutu fazu tla, što može rezultirati povećanom koncentracijom Cd u biljnom tkivu.
4. Dodatak OT u varijanti OT<sub>2</sub> i posljedično povećanje koncentracije DOC-a u otopini tla smanjuje aktivnost slobodnog Cd<sup>2+</sup>, a time i njegovo primanje u korijen. Ovaj zaključak potvrđuje i činjenica da je koncentracija Cd u tkivu boba smanjena povećanjem udjela OT u tlu (koncentracija Cd u listu boba smanjena je za 28 %, u mahuni za 40 % te u sjemenu za 20 %).

5. Primjena NaCl značajno je utjecala na ukupnu koncentraciju Cd u tlu, ali rezultati upućuju na zaključak da je najveća pristupačnost Cd zapravo bila u tlu kojemu nije povećan stupanj zaslanjenosti. Naime, iako povećana (NaCl) zaslanjenost tla povećava mobilnost Cd u tlu stvaranjem  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksa u otopini tla, povećana mobilnost Cd u tlu nije rezultirala i njegovom povećanom pristupačnošću biljkama boba. Iz navedenog proizlazi da su kloridi pri istraživanim koncentracijama NaCl (50 i 100 mM) služili samo kao nosač za Cd pri njegovu prelasku s jedne krute faze tla na drugu, upućujući na zaključak da, ukoliko tlo ima veliki adsorpcijski kapacitet za Cd, povećana (NaCl) zaslanjenost tla može rezultirati samo njegovom redistribucijom unutar krute faze tla, ali ne nužno i povećanom biopristupačnošću. Dakle, rezultati upućuju na zaključak da će djelovanje povećane NaCl zaslanjenosti na biopristupačnost Cd u tlu ovisiti o stupnju zaslanjenosti tla, a koliki stupanj zaslanjenosti tla će uzrokovati povećanu biopristupačnost Cd bit će uvjetovano fizikalno-kemijskim značajkama tla. Nadalje, iako se  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kompleksi smatraju fitopristupačnim oblicima Cd u tlu, njihovo je primanje u korijen sporije od primanja  $\text{Cd}^{2+}$  što je moglo rezultirati smanjenom koncentracijom Cd u listu boba primjenom NaCl.
6. Kontaminacija tla Cu i Cd nije utjecala na mjerene fotosintetske pokazatelje lista boba, osim na CCI koji je smanjen za 4 % pri  $\text{Cd}_{10}$  tretmanu, upućujući na zaključak da nije došlo do smanjenja produktivnost biljaka boba. Ipak, rezultati upućuju i na mogući toksični učinak kontaminacije tla Cd na molekule klorofila, ali i da su biljke boba mogle aktivirati određene strukturalne i/ili funkcionalne modifikacije u uvjetima kontaminacije tla Cd, potrebne za održanje intenziteta fotosinteze unatoč smanjenju CCI.
7. Dodatak OT u varijanti  $\text{OT}_2$  je povećao (za 30-65 %), a NaCl salinitet smanjio (za 28-29 % pri  $\text{NaCl}_{100}$  tretmanu) dehidrogenaznu aktivnost (DHA) u tlu. Kontaminacija tla Cu smanjila je DHA za 50 % pri  $\text{Cu}_{500}$  tretmanu. Rezultati upućuju na sličan inhibitorni učinak najznačajnijih kemijskih oblika Cu u otopini tla na DHA u tlu, povezujući negativan učinak kontaminacije tla Cu na DHA s biopristupačnošću Cu u tlu općenito. Rezultati upućuju i na mogućnost da DHA može utjecati na biopristupačnost Cu u tlu tako da utječe na stvaranje metal-DOM kompleksa u otopini tla. Kontaminacija tla Cd nije utjecala na DHA, ali je pronađena značajna negativna korelacija između DHA i kompleksa Cd i klorida u otopini tla, upućujući na mogućnost da  $\text{CdCl}_n^{2-n}$  kemijski oblici Cd imaju izraženiji inhibitorni učinak na DHA u tlu.

8. Daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena na stehiometrijsko/matematičko definiranje najvažnijih mehanizama koji kontroliraju mobilnost i biopristupačnost Cu i Cd u tlu (sorpcija na čvrstu tvar u tlu, kompleksacija i transformacije u otopini tla), u svrhu unapređenja i korištenja računalnih modela za predviđanje biopristupačnosti Cu i Cd u tlima. Navedena bi se istraživanja mogla pokazati korisnim alatom u održivom gospodarenju tlima kontaminiranim Cu i Cd, procjeni i predviđanju njihove potencijalne toksičnosti u okolišu i donošenju preporuka za provođenje popravnih mjera kako bi se smanjila fitopristupačnost Cu i Cd u poljoprivrednim tlima.

## 7. LITERATURA

Abasiyan S. M. A., Tofighi H. (2013). Cadmium adsorption by a humic acid. In: Functions of Natural Organic Matter in Changing Environment (J Xu et al., eds), Zhejiang University Press and Springer Science Business Media Dordrecht.

Abdelhamid M. T., Shokr M. M. B., Bekheta M. A. (2010). Growth, root characteristics, and leaf nutrients accumulation of four faba bean (*Vicia faba* L.) cultivars differing in their broomrape tolerance and the soil properties in relation to salinity. *Commun Soil Sci Plant Anal* 41(22): 2713-2728.

Abdul Qados A. M. S. (2011). Effect of salt stress on plant and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *J Saudi Soc Agric Sci* 10: 7-15.

Acosta J., Faz A., Martinez-Martinez S., Zornoza R., Carmona D., Kabas S. (2011). Multivariate statistical and GIS-based approach to evaluate heavy metals behaviour in mine sites for future reclamation. *J Geochem Explor* 109(1-3): 8-17.

Adriano D. C. (2001). Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag, New York.

Adriano D. C., Wenzel W., Vangronsveld J., Bolan N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122(2-4): 121-142.

Ait Ali N., Pilar Bernal M., Ater M. (2002). Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant Soil* 239: 103-111.

Akbar Boojar M. M., Goodarzi F. (2007). The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere* 67: 2138-2147.

Alaoui-Sossé B., Genet P., Vinit-Dunand F., Toussaint M.-L., Epron D., Badot P.-M. (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 166: 1213-1218.

Allen H. E., Janssen C. R. (2006). Incorporating bioavailability into criteria for metals. In: *Nato Science Series IV: Earth and Environmental Sciences: Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation* (I Twardowska, H E Allen, M M Häggblom, S Stefaniak, eds), Springer, Netherlands, 3-23.

- Alloway B. J. (1990). Soil processes and the behaviour of metals. In: Heavy metals in soils (B J Alloway, ed), John Wiley and Sons, Inc. New York, 7-27.
- Alrumman S. A., Standing D. B., Paton G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. J King Saud Univ - Sci 27: 31-41.
- Andersen E., Küpper H. (2013). Cadmium Toxicity in Plants. In: Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences (A Sigel, H Sigel, R K O. Sigel, eds), Springer Science Business Media Dordrecht, 11: 31-62.
- Arduini I., Godbold D. L., Onnis A. (1995). Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. Seedlings. Tree Physiol 15: 411-415.
- Ashraf M., Bashir A. (2003). Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relations in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance. Flora 198: 486-498.
- Azooz M. M., Alzahrani A. M., Youssef M. M. (2013). The potential role of seed priming with ascorbic acid and nicotinamide and their interactions to enhance salt tolerance in broad bean (*Vicia faba* L.). Aust J of Crop Sci 7(13): 2091-2100.
- Baker A. J. M. (1981). Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. J Plant Nutr 3: 643-654.
- Bakić H. (2014). Stabiliziranje organskog ugljika i retencija metala organo-mineralnim kompleksiranjem u tlima krških polja. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Baldock J. A., Nelson P. N. (2000). Soil organic matter. In: Handbook of soil science (M E Sumner, ed), Boca Raton, FL: CRC.
- Bataillard P., Cambier P., Picot C. (2003). Short-term transformations of lead and cadmium compounds in soil after contamination. Eur J Soil Sci 54: 365-376.
- Batra L., Manna M. C. (1997). Dehydrogenase activity and microbial biomass carbon in salt-affected soils of semiarid and arid regions. Arid Soil Res Rehab 11(3): 295-303.
- Bi R., Lu Q., Yu W., Yuan Y., Zhou S. (2013). Electron transfer capacity of soil dissolved organic matter and its potential impact on soil respiration. J Soil Sediment 13: 1553-1560.
- Bohn H. L., McNeal B. L., O'Connor G. A. (2001). Soil chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc., New York.

BouDESCQUE S., Guillon E., Aplincourt M., Marceau E., Stievano L. (2007). Sorption of Cu(II) onto vineyard soils: macroscopic and spectroscopic investigations. *J Colloid Interf Sci* 307: 40-49.

Bowen J. E. (1969). Absorption of copper, zinc, and manganese by sugarcane leaf tissue. *Plant Physiol* 44: 255-261.

Brady N. C. (1990). *The Nature and Properties of Soils*. 10<sup>th</sup> Edition, MacMillan Publishing Company, New York.

Brun L. A., Maillet J., Richarte J., Herrmann P., Remy J. C. (1998). Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ Pollut* 102(2-3): 151-161.

Cao X., Liang Y., Zhao L., Le H. (2013). Mobility of Pb, Cu, and Zn in the phosphorus-amended contaminated soils under simulated landfill and rainfall conditions. *Environ Sci Pollut Res* 20(9): 5913-5921.

Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. (2011). Salinity stress and salt tolerance. In: *Abiotic stress in plants - Mechanisms and adaptations* (A Shanker, ed), InTech, 21-38.

Cattani I., Fragoulis G., Boccelli R., Capri E. (2006). Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere* 64: 1972-1979.

Chantigny M. H. (2003). Dissolved and water-extractable organic matter in soils: A review on the influence of land use and management practices. *Geoderma* 113: 357-380.

Chaperon S., Sauvé S. (2008). Toxicity interactions of cadmium, copper, and lead on soil urease and dehydrogenase activity in relation to chemical speciation. *Ecotox Environ Safe* 70: 1-9.

Cha-um S., Kirdmanee C. (2011). Remediation of salt-affected soil by the addition of organic matter - an investigation into improving glutinous rice productivity. *Sci Agric* 68(4): 406-410.

Chen L.-M., Lin C. C., Kao C. H. (2000). Copper toxicity in rice seedlings: changes in antioxidative enzyme activities, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level, and cell wall peroxidase activity in roots. *Bot Bull Acad Sinica* 41(2): 99-10.

- Chinnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. (2006). Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. In: Genetic engineering, Principles and methods (J K Setlow, ed), Springer Science Business Media Inc., USA, 27: 141-177.
- Chiu C.-Y., Hsiu F.-S., Chen S.-S., Chou C.-H. (1995). Reduced toxicity of Cu and Zn to mangrove seedlings (*Kandelia candel* (L.) Druce) in saline environments. Bot Bull Acad Sinica 36: 19-24.
- Ciadamidaro L., Puschenreiter M., Santner J., Wenzel W., Madejón P., Madejón E. (2015). Assessment of trace element phytoavailability in compost amended soils using different methodologies. J Soil Sediment, DOI 10.1007/s11368-015-1283-3.
- Clemens S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88(11): 1707-1719.
- Crea F., Foti C., Milea D., Sammartano S. (2013). Speciation of cadmium in the environment. In: Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences (A Sigel, H Sigel, R K O Sigel, eds), Springer Science Business Media Dordrecht, 11: 63-83.
- Cullen J. T., Maldonado M. T. (2013). Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. In: Cadmium: From Toxicity to Essentiality, Metal Ions in Life Sciences (A Sigel, H Sigel, R K O Sigel, eds), Springer Science Business Media Dordrecht, 11: 31-62.
- Das S. K., Varma A. (2011). Role of enzymes in maintaining soil health. In: Soil Enzymology, Soil Biology (G Shukla, A Varma, eds), Springer-Verlag, 22: 25-42.
- De Pascale S., Martino A., Raimondi G., Maggio A. (2007). Comparative analysis of water and salt stress-induced modifications of quality parameters in cherry tomato. J Hortic Sci Biotech 82: 283-289.
- de Vos C. H., Vonk M. J., Vooijs R., Schat H. (1991). Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. Plant Physiol 98: 853-858.
- Debez A., Taamalli W., Saadaoui D., Ouerghi Z., Zarrouk M., Huchzermeyer B., Abdelly C. (2006). Salt effect on growth, photosynthesis, seed yield and oil composition of the potential crop halophyte *Cakile maritime*. In: Biosaline agriculture and salinity tolerance in plants (M Öztürk, Y Waisel, M A Khan, G Görk, eds), Birkhäuser Verlag, Switzerland, 55-63.

Degryse F., Smolders E., Parker D. R. (2009). Partitioning of metals (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn) in soils: concepts, methodologies, prediction and applications - a review. *J Soil Sci* 60: 590-612.

Doncheva S., Stoyanova Z. (2007). Plant response to copper and zinc hydroxidesulphate and hydroxidecarbonate used as an alternative copper and zinc sources in mineral nutrition, *Rom Agric Res* 7-8: 15-23.

Dong J., Wu F., Zhang G. (2005). Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J Zhejiang Univ Sci* 6B (10): 974-980.

Dudley L. M. (1994). Salinity in the soil environment. In: *Handbook of Plant and Crop Stress* (M Pessarakli, ed), Marcel Dekker Inc., New York, 13-30.

Ehlken S., Kirchner G. (2002). Environmental processes affecting plant root uptake of radioactive trace elements and variability of transfer factor data: a review. *J Environ Radioactiv* 58: 97-112.

Emamverdian A., Ding Y., Mokhberdoran F., Xie Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci World J*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/756120>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (1988). Salt affected soils and their management. FAO, Rome, *Soils Bulletin* 39.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). Guidelines for soil description, FAO, Rome, 25-29.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2002). *Crops and Drops: Making the Best Use of Water for Agriculture*. FAO, Rome.

Fargašová A. (2004). Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. *Plant Soil Environ* 50(1): 33-38.

Florence T. M. (1982). The speciation of trace elements in waters. *Talanta* 29(5): 345-364.

Foltête A.-S., Masfaraud J.-F., Féraud J.-F., Cotel S. (2012). Is there a relationship between early genotoxicity and life-history traits in *Vicia faba* exposed to cadmium-spiked soils? *Mutat Res - Gen Tox En* 747(2): 159-163.

- Gama P. B. S., Inanaga S., Tanaka K., Nakazawa R. (2007). Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *Afr J Biotechnol* 6: 79-88.
- Ghallab A., Usman A. R. A. (2007). Effect of sodium chloride-induced salinity on phyto-availability and speciation of Cd in soil solution. *Water Air Soil Poll* 185: 43-51.
- Gill S. S., Tuteja N. (2011). Cadmium stress tolerance in crop plants: Probing the role of sulfur. *Plant Signal Behav* 6 (2): 215-222.
- Glatzel S., Kalbitz K., Dalvac M., Moore T. (2003). Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs. *Geoderma* 113: 397-411.
- Gračanin M. (1951). *Sistematika tala. Školska knjiga, Zagreb.*
- Grattan S. R., Grieve C. M. (1999). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci Hortic* 78: 127-157.
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. (2001). EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant Soil* 235: 105-114.
- Gustafsson J. P. (2006). Arsenate adsorption to soils: Modelling the competition from humic substances. *Geoderma* 136(1-2): 320-330.
- Haynes R. J. (2005). Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: An overview. *Adv Agron* 85: 221-268.
- Hochmuth G., Maynard D., Vavrina C., Hanlon E. (1991). Plant tissue analysis and interpretation for vegetable crops in Florida. Special Publication, SS-VEC-42, Gainesville, University Florida.
- Hossain M. A., Hoque M. A., Burrit D. J., Fujita M. (2014). Proline protects plants against abiotic oxidative stress: Biochemical and molecular mechanisms. In: *Oxidative damage to plants - Antioxidant networks and signaling* (P Ahmad, ed), 477-522.
- Houba V. J. G., Temminghoff E. J. M., Gaikhorst G. A., van Vark W. (1999). Soil analysis procedures extraction with 0,01 M CaCl<sub>2</sub>. The Netherlands: Wageningen Agricultural University.

Houba V. J. G., Uittenbogaard J., Pellen P. (1996). Wageningen evaluating programmes for analytical laboratories (WEPAL) organization and purpose. *Commun Soil Sci Plan* 27(3-4): 421-431.

HRN ISO 10390:2005 (2005). Kakvoća tla - Određivanje pH-vrijednosti. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 10693:2004 (2004). Kakvoća tla - Određivanje sadržaja karbonata - Volumetrijska metoda. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 11265:2004 (2004). Kakvoća tla - Određivanje specifične električne vodljivosti. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 11277:2004 (2004). Kvaliteta tla - Određivanje raspodjele veličine čestica (mehaničkog sastava) u mineralnom dijelu tla - Metoda prosijavanja i sedimentacije. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 11464:2004 (2004). Kakvoća tla - Priprema uzorka za fizikalno-kemijske analize. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 11466:2004 (2004). Kakvoća tla - Ekstrakcija elemenata topljivih u zlatotopci. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

HRN ISO 14235:1998 (1998). Kakvoća tla - Određivanje organskog ugljika sulfokromnom oksidacijom. Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

ISO 23753-1:2005(E) (2005). Soil quality - Determination of dehydrogenase activity in soils - Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC). Internacionalni standard, Hrvatski zavod za norme, Zagreb, Hrvatska.

Ivezić V., Lončarić Z., Engler M., Kerovec D., Singh B. R. (2013). Comparison of different extraction methods representing available and total concentrations of Cd, Cu, Fe, Mn and Zn in soil. *Agric* 19(1): 53-58.

Izzo R., Navari-Izzo F., Quartacci M. F. (1991). Growth and mineral absorption in maize seedlings as affected by increasing NaCl concentrations. *J Plant Nutrit* 14, 687-699.

Jamil M., Deog Bae L., Kwang Yong J., Ashraf M., Sheong Chun L., Eui Shik R. (2006). Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of four vegetable species. *J Cent Eur Agric* 7: 273-282.

Kabata-Pendias A. (2011). Elements of Group 11 (Previously Group Ib). In: Trace elements in soil, Taylor and Francis Group, LLC, 253-272.

Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. (2003). Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113: 273-291.

Kalembasa S., Symanowicz B. (2012). Enzymatic activity of soil after applying various waste organic materials, ash and mineral fertilizers. *Pol J Environ Stud* 21(6): 1635-1641.

Kaurin A., Mihelic R., Kastelec D., Schlöter M., Suhadolc M., Grčman H. (2015). Consequences of minimum soil tillage on abiotic soil properties and composition of microbial communities in a shallow Cambisol originated from fluvioglacial deposits. *Biol Fertil Soils* 51(8), DOI: 10.1007/s00374-015-1037-9.

Khan H. R., Paull J. G., Siddique K. H. M., Stoddard F. L. (2010). Faba bean breeding for drought-affected environments: A physiological and agronomic perspective. *Field Crop Res* 115: 279-286.

Kim K.-R., Owens G., Naidu R., Kwon S. (2010). Influence of plant roots on rhizosphere soil solution composition of long-term contaminated soils. *Geoderma* 155: 86-92.

Kinniburgh D. G., Milne C. J., Benedetti M. F., Pinheiro J. P., Filius J., Koopal L. K. (1996). Metal ion binding by humic acid: Application of the NICA-Donnan model. *Environ Sci Technol* 30: 1687-1698.

Kirchmann H., Eriksson J. (2011). Trace elements in crops: Effects of soil physical and chemical properties. In: *Encyclopedia of Agrophysics* (J Gliński, J Horabik, J Lipiec, eds), Springer Science Business Media, 910-912.

Kos B., Grčman H., Leštan D. (2003). Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil Environ* 49 (12): 548-553.

Koyro H.-W., Geissler N., Seenivasan R., Huchzermeyer B. (2010). Plant stress physiology: Physiological and biochemical strategies allowing plants/crops to thrive under ionic stress. In: *Handbook of plant and crop stress* (M Pessarakli, ed), 3<sup>rd</sup> Edition, CRC Press, Taylor and Francis Group, West Palm Beach, 1051-1093.

Langmuir D. (1997). *Aqueous Environmental Geochemistry*, Prentice-Hall, p. 600.

Lefèvre I., Marchal G., Meerts P., Corréal E., Lutts S. (2008). Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environ Exp Bot* 65 (1): 142-152.

Leštan D., Grčman H. (2001). Speciation of lead, zinc and cadmium in contaminated soils from Mežica vally. Zbor Bioteh fakultete Univ Ljublj 77, 205-214.

Liao M. (2000). Mechanisms of copper uptake and transport in plants. PhD Thesis. Massey University, New Zealand.

Lombardi L., Sebastiani L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Plant Sci 168(3): 797-802.

Luo Z-B., Wu C., Zhang C., Li H., Lipka U., Polle A. (2014). The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. Environ Exp Bot 108: 47-62.

Maas E. V. (1993). Plant Growth Response to Salt Stress. In: Towards the Rational Use of High Salinity Tolerant Plants (H Lieth, A Al Masoom, eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 279-291.

Maderova L., Watson M., Paton G. I. (2011). Bioavailability and toxicity of copper in soils: integrating chemical approaches with response of microbial biosensors. Soil Biol Biochem 43: 1162-1168.

Maksymiec W. (1997). Effect of copper on cellular processes in higher plants, Photosynthetica 34(3): 321-342.

Malik A., Kaushik A., Kaushik C. P. (1995). Salinization effects on dehydrogenase activity and CO<sub>2</sub> evolution from soils following phytomass amendments. Proc Ind Nat Sci Acad B61(3): 181-186.

Marschner H. (1995). Mineral nutrition of higher plants, 2<sup>nd</sup> Edition. London: Academic Press.

Matijević L., Romić D., Maurović N., Romić M. (2012). Saline irrigation water affects element uptake by bean plant (*Vicia faba* L). Eur Chem Bull 1(12): 498-502.

Matijević L., Romić D., Romić M. (2014). Soil organic matter and salinity affect copper bioavailability in root zone and uptake by *Vicia faba* L. plants. Environ Geochem Hlth 36: 883-896.

McBride M. B. (1994). Environmental Chemistry of Soils. Oxford University Press, p. 406.

McLaughlin M. J., Palmer L. T., Tiller K. G., Beech T. A., Smart M. K. (1994). Increased soil salinity causes elevated cadmium concentrations in field grown potato tubers. J Environ Qual 23:1013-1018.

McLaughlin M. J., Singh B. R. (1999). Cadmium in Soils and Plants. In: Cadmium in Soils and Plants (M J McLaughlin, B R Singh, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

McLaughlin M. J., Tiller K. G., Smart M. K. (1997). Speciation of cadmium in soil solutions of saline/sodic soils and relationships with cadmium concentrations in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Aust J Soil Res 35: 183-198.

Mei X., Li S., Li Q., Yang Y.-F., Luo X., He B., Li H., Xu Z. (2014). Sodium chloride salinity reduces Cd uptake by edible amaranth (*Amaranthus mangostanus* L.) via competition for Ca channels. Ecotox Environ Safe 105C: 59-64.

Mengel K., Kirkby E. A. (1979). Principles of plant nutrition, 2<sup>nd</sup> Edition. Bern, Switzerland: International Potash Institute.

Mitchell J. P., Shennan C., Grattan S. R., May D. M. (1991). Tomato fruit yields and quality under water deficit and salinity. J Am Soc Hortic Sci 116: 215-221.

Mohamed A. E., Rashed M. N., Mofty A. (2003). Assessment of essential and toxic elements in some kinds of vegetables. Ecotox Environ Safe 55: 251-260.

Moya J.L., Ros R., Picazo I. (1993). Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. Photosynth Res 36: 75-80.

Mühling K. H., Läuchli A. (2003). Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. Plant Soil 253: 219-231.

Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Ann Rev Plant Biol 59: 651-681.

Neff J. C., Asner G. P. (2001). Dissolved organic carbon in terrestrial ecosystems: synthesis and a model. Ecosystems 4: 29-48.

Nicholls A. M., Mal T. K. (2003). Effects of lead and copper exposure on growth of an invasive weed *Lythrum salicaria* L. (Purple Loosestrife), Ohio J Sci 103(5): 129-133.

Nieder R., Benbi D. K. (2008). Soil organic matter characterization. In: Carbon and Nitrogen in the Terrestrial Environment, Springer Science Business Media, 81 - 111.

Norvell W. A., Wu J., Hopkins D. G., Welch R. M. (2000). Association of cadmium in durum wheat grain with soil chloride and chelate-extractable soil cadmium. *Soil Sci Soc Am J* 64: 2162-2168.

Ondrašek G. (2015). Modeliranje biogeokemijskih procesa: primjer specijacije kadmija u saliniziranim vodnim resursima. U: *Voda u agroekosustavima* (G Ondrašek, ed), Sveučilišni udžbenik, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 320-329.

Ondrašek G., Rengel Z. (2012). The role of soil organic matter in trace element bioavailability and toxicity. In: *Abiotic stress responses in plants: Metabolism, productivity and sustainability* (P Ahmad, M N V Prasad, eds), Springer, New York.

Ondrašek G., Rengel Z., Romić D., Savic R. (2012). Salinity decreases dissolved organic carbon in the rhizosphere and increases trace element phyto-accumulation. *Eur J Soil Sci* 63(5): 685-693.

Ondrašek G., Romić D., Rengel Z., Romić M., Zovko M. (2009). Cadmium accumulation by muskmelon under salt stress in contaminated organic soil. *Sci Tot Environ* 407: 2175-2182.

Ondrašek G., Romić D., Romić M., Duralija B., Mustač I. (2006). Strawberry growth and fruit yield in a saline environment. *Agric Conspec Sci* 71(4): 155-158.

Paalman M. A. A., van der Weijden C. H., Loch J. P. G. (1994). Sorption of cadmium on suspended matter under estuarine conditions: competition and complexation with major sea-water ions. *Water Air Soil Poll* 73: 49-60.

Pan J., Yu L. (2011). Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecol Eng* 37: 1889-1894.

Parida A. K., Das A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotox Environ Safe* 60: 324-349.

Pedersen M. B., Kjær C., Elmegaard N. (2000). Toxicity and bioaccumulation of copper to Black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 431-439.

Pinto A. P., Mota A. M., de Varennes A., Pinto F. C. (2004). Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. *Sci Tot Environ* 326: 239-247.

- Pitman M. G., Laüchli A. (2002). Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Salinity: Environment-Plants-Molecules (A Laüchli, U Lüttge, eds), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 3-20.
- Probst A., Liu H., Fanjul M., Liao B., Hollande E. (2009). Response of *Vicia faba* L. to metal toxicity on mine tailing substrate: Geochemical and morphological changes in leaf and root. *Environ Exp Bot* 66: 297-308.
- Rahman S., Vance G. F., Munn L. C. (1993). Salinity induced effects on the nutrient status of soil, corn leaves and kernels. *Commun Soil Sci Plant Anal* 24: 2251-2269.
- Rao D. L. N., Pathak H. (1996). Ameliorative influence of organic matter on biological activity of salt-affected soils. *Arid Soil Res Rehab* 10(4): 311-319.
- Rashed M. N., Awadallah R. M. (1998). Trace elements in faba bean (*Vicia faba* L.) plant and soil as determined by atomic absorption spectroscopy and ion selective electrode. *J Sci Food Agric* 77: 18-24.
- Redžepović S., Blažinkov M., Sikora S., Husnjak S., Čolo J., Bogunović M. (2012). enzymatic activity and microbiological characteristics of luvic and pseudogley soils in western Slavonia. *Period Biol* 114(1): 111-116.
- Reichman S. M. (2002). The responses of plants to metal toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Melbourne: The Australian Minerals & Energy Environment Foundation.
- Rengasamy P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot* 57(5): 1017-1023.
- Rengel Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ* 15, 625-632.
- Richards L. A. (1954). Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils. USDA Agriculture Handbook 60, Washington D.C.
- Romić D. (2003). Zaštita tla i voda. Pisana predavanja, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Romić D., Ondrašek G., Romić M., Borošić J., Vranješ M., Petošić D. (2008). Salinity and irrigation method affect crop yield and soil quality in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) growing. *Irrig Drain* 57: 463-469.

Romić D., Romić M., Husnjak S., Ondrašek G., Stričević I., Zovko M., Bakić H., Maurović N., Kondres N., Filipović V. (2010): Stupanj zaslanjenosti i održivo korištenje tala Donje Neretve. Elaborat, Zagreb.

Romić D., Romić M., Zovko M., Bakić H., Ondrašek G. (2012). Trace metals in the coastal soils developed from estuarine floodplain sediments in the Croatian Mediterranean region. *Environ Geochem Hlth* 34(4): 399-416.

Romić D., Romić M., Zovko M., Juračak J., Ondrašek G., Bakić H. (2010). Harmonization of agricultural intensification with long-term ecological integrity in Croatia. In: *Innovations in European Rural Landscapes* (H Wiggering, H P Ende, A Knierim, M Pintar, eds), Springer, Berlin Heidelberg, 97-114.

Romić M. (2012). Bioavailability of trace metals in terrestrial environment: Methodological issues. *Eur Chem Bull* 1(11): 489-493.

Romić M., Romić D., Ondrašek G. (2004). Heavy metals accumulation in topsoils from the wine-growing regions. Part 2. Relationships between soil properties and extractable copper contents. *Agric Conspec Sci* 69(2-3): 35-41.

Römkens P. F., Bril J., Salomons W. (1996). Interaction between  $\text{Ca}^{2+}$  and dissolved organic carbon: implications for metal mobilization. *Appl Geochem* 11: 109-115.

Schnitzer M. (2000). A lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter. *Advan Agron* 68: 1-58.

Schützendübel A., Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* (53)372: 1351-1356.

Semple K. T., Doick K. J., Burauel P., Craven A., Harms H., Jones K. C. (2004). Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol* 38: 228A-231A.

Shahid M., Dumat C., Silvestre J., Pinelli E. (2012). Effect of fulvic acids on lead-induced oxidative stress to metal sensitive *Vicia faba* L. plant. *Biol Fertil Soils* 48: 689-697.

Shahid M., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Dumat C. (2011). Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotox Environ Safe* 74: 78-84.

Shainberg I. (1992). Chemical and mineralogical components of crusting. In: Soil crusting: Chemical and physical processes, Advances in Soil Science (M E Sumner, B A Stewart, eds), Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Shitza A., Swennen R., Tashko A. (2008). Chromium speciation and existing natural attenuation conditions in lagoonal and pond sediments in the former chemical plant of Porto-Romano (Albania). *Environ Geol* 53: 1107-1128.

Shuman L. M., Dudka S., Das K. (2002). Cadmium forms and plant availability in compost-amended soil. *Commun Soil Sci Plant Anal* 33 (5-6): 737-748.

Sikora S., Huić Babić K., Blažinkov M., Sraka M., Redžepović S., Žderić J. (2010). Utjecaj pokrivanja tla i različitih razina gnojidbe dušikom na mikrobiološka svojstva tla. *Radovi Polj fakulteta Univ Sarajevu* 1: 387-395.

Smolders E., Lambregts R. M., McLaughlin M. J., Tiller K. G. (1998). Effect of soil solution chloride on cadmium availability to Swiss chard. *J Environ Qual* 27: 426-431.

Sposito G., Page A. L. (1984). Cycling of metal ions in the soil environment. In: Metal Ions in Biological Systems, Circulation of Metals in the Environment (H Sigel, ed), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 287-332.

SSSA - Soil Science Society of America (1997). Glossary of soil science terms. Available at: <https://www.soils.org/publications/soils-glossary>.

Stoddard F. L., Balko C., Erskine W., Khan H. R., Link W., Sarker A. (2006). Screening techniques and sources of resistance to abiotic stresses in cool-season food legumes. *Euphytica* 147: 167-186.

Strobel B. W., Hansen H. C. B., Borggaard O. K., Andersen M. K., Raulund-Rasmussen K. (2001). Composition and reactivity of DOC in forest floor soil solutions in relation to tree species and soil type. *Biogeochemistry* 56: 1-26.

Sumner M. E. (1992). The electrical double layer and clay dispersion. In: Soil crusting: Chemical and physical processes, Advances in Soil Science (M E Sumner, B A Stewart, eds), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 38-53.

Tao S., Liu W. X., Chen Y. J., Xu F. L., Dawson R. W., Li B. G., Cao J., Wang X. J., Hu J. Y., Fang J. Y. (2004). Evaluation of factors influencing root-induced changes of copper fractionation in rhizosphere of a calcareous soil. *Environ Poll* 129: 5-12.

- Tejera N. A., Soussi M., Lluch C. (2006). Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environ Exp Bot* 58: 17-24.
- Tessier A., Fortin D., Belize N., DeVitre R. R., Leppard G. G. (1996). Metal sorption to diagenetic iron and manganese oxyhydroxides and associated organic matter: Narrowing the gap between field and laboratory measurements. *Geochim Cosmochim Acta* 60: 387-404.
- Turhan A., Seniz V. (2012). Salt tolerance during vegetative growth in cross of tomato and effect of cytoplasm in response to salt tolerance. *Bulg J Agric Sci* 18: 207-218.
- Tyerman S. D., Skerrett I. M. (1999). Root ion channels and salinity. *Sci Hortic* 78: 175-235.
- van Assche F., Clijsters H. (1990). Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13: 195-206.
- Vondráčková S., Hejzman M., Száková J., Müllerová V., Tlustoš P. (2014). Soil chemical properties affect the concentration of elements (N, P, K, Ca, Mg, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn) and their distribution between organs of *Rumex obtusifolius*. *Plant Soil* 379: 231-245.
- Wagner G. J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* 51: 173-212.
- Wegglar K., McLaughlin M. J., Graham R. D. (2004). Effect of chloride in soil solution on the plant availability of biosolid-borne cadmium. *J Environ Qual* 33(2): 496-504.
- Welch R. M. (1995). Micronutrient nutrition of plant. *Crit Rev Plant Sci* 14(11): 49-82.
- Weng L. P., Temminghoff E. J. M., Loft S., Tipping E., Van Riemsdijk W. H. (2002). Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environ Sci Technol* 36(22): 4804-4810.
- Wicke B., Smeets E., Dornburg V., Vashev B., Gaiser T., Turkenburg W., Faaij A. (2011). The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. *Energy Environ Sci* 4: 2669-2681.
- Wolińska A., Stępniewska Z. (2012). Dehydrogenase activity in the soil environment. In: *Dehydrogenases* (R A Canuto, ed), InTech, Rijeka. Available at <http://dx.doi.org/10.5772/48294>.

- Wyszkowska J., Kucharski M., Kucharski J., Borowik A. (2009). Activity of dehydrogenases, catalase and urease in copper polluted soil. *J Elem* 14(3): 605-617.
- Wyszkowska J., Wyszkowski M. (2003). Effect of cadmium and magnesium on enzymatic activity in soil. *Pol J Environ Stud* 12(4): 473-479.
- Xiong Z.-T., Li Y.-H., Xu B. (2002). Nutrition influence on copper accumulation by *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotox Environ Safe* 53: 200-205.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011). Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. *J Environ Biol* 32: 667-685.
- Yobouet Y. A., Adouby K., Trokourey A., Yao B. (2010). Cadmium, copper, lead and zinc speciation in contaminated soils. *Int J Eng Sci Technol* 2(5): 802-812.
- You S.-J., Yin Y., Allen H. E. (1999). Partitioning of organic matter in soils: Effects of pH and water/soil ratio. *Sci Tot Environ* 227: 155-160.
- Yruela I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36(5): 409-430.
- Zhang G., Wu F., Wei K., Dong Q., Dai F., Chen F., Yang J. (2006). Cadmium stress in higher plants. In: *Cadmium toxicity and tolerance in plants* (N A Khan, Samiullah, eds), Narosa Publishing House, New Delhi, India.
- Zhao J., Ren W., Zhi D., Wang L., Xia G. (2007). Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall rescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep* 26: 1521-1528.
- Zhu J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* 53: 247-273.
- Zhu J. K. (2007). Plant Salt Stress. In: *Encyclopedia of Life Sciences* (A O'Daly, ed), John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK, 1-3.
- Zovko M. (2015). Procjena rizika zasljanjivanja i mobilnosti metala u poljoprivrednim tlima priobalnih riječnih dolina. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Zsolnay A. (2003). Dissolved organic matter: artefacts, definitions and functions. *Geoderma* 113: 187-209.

## ŽIVOTOPIS

**Lana Filipović**, mag. ing. agr. rođena je 18.10.1983. godine u Derventi. Na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 2008. na preddiplomskom studiju Agroekologija i stekla akademski naziv univ. bacc. ing. agr. te 2010. na diplomskom studiju Agroekologija - Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi i stekla akademski naziv mag. ing. agr. Na Zavodu za melioracije Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zaposlena je od 15.02.2011. u statusu znanstvenog novaka. Suradnik je na sljedećim predmetima na preddiplomskom studiju: Poljoprivredne melioracije, Navodnjavanje; te na diplomskom studiju: Laboratorijske metode i upravljanje podacima, Programiranje i projektiranje sustava navodnjavanja, Korištenje i zaštita voda; kao i na diplomskom studiju na engleskom jeziku - InterEnAgro: Analytical chemistry and laboratory methods te na diplomskom studiju Geologija zaštite okoliša na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u izvođenju vježbi iz modula Biogeokemija. Sudjelovala je na znanstvenim i stručnim usavršavanjima, a najznačajnija su: International Summer School "Climate change and natural resource management", University of Zagreb Faculty of Agriculture, Zagreb, Croatia (2012), "Monitoring the reduction of soil carbon and nutrient losses in Croatia: quality assessment/quality control of soil sampling procedures and soil analysis", ILVO, Merelbeke, Belgija (2011). Koautorica je 2 znanstvena rada indeksirana u a1 bazi podataka i 5 radova u a2 bazi podataka te 2 poglavlja u knjizi. Rezultate istraživanja prezentirala je na 5 međunarodnih skupova. Članica je Hrvatskog tloznanstvenog društva.

Lista radova iz CROSBI bibliografije: <https://bib.irb.hr/lista-radova?autor=327233>