

Utjecaj plazmom aktivirane vode na klijavost ječma i rotkvice

Vojvoda, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:977423>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Jelena Vojvoda

1110/PI

**UTJECAJ PLAZMOM
AKTIVIRANE VODE NA
KLIJAVOST JEČMA I ROTKVICE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Tomislave Vukušić, doc. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja odrađen je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za kemijsku biologiju na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom dr.sc. Dunje Šamec.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Tomislavi Vukušić na strpljenju, pristupačnosti i stručnom vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Hvala svim prijateljima koji su studentsko doba učinili posebnim, a najveće hvala roditeljima koji su mi omogućili obrazovanje i zajedno sa sestrama i Željkom bili najveća podrška tijekom studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno – prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ PLAZMOM AKTIVIRANE VODE NA KLIJAVOST JEČMA I ROTKVICE

Jelena Vojvoda, 1110/ PI

Sažetak: Hladna plazma nova je tehnologija koja se primjenjuje u agronomiji za poboljšanje klijanja te rast i razvoj biljki. Primjena hladne plazme odvija se direktnim tretmanima visokonaponskim pražnjenjem u plinu pri čemu se induciraju promjene na površini sjemena ili indirektnim tretmanom tekućeg medija koji se koristi za daljnju primjenu na sjemenu. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti utjecaj plazmom aktivirane vode (PAW) na klijavost ječma i rotkvice. PAW voda aktivirana je u hibridnom reaktoru (HVED plazma), plazmom jet i mikrovalnom plazmom. Tretman mikrovalnom plazmom s argonom kao radnim plinom pokazao se najpogodnijim za formiranje PAW vode u svrhu poticanja procesa klijavosti rotkvice i ječma. Za rast i razvoj stabljike boljim se pokazala PAW voda formirana HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom. Zahvaljujući formiranim nitratima zaustavila se dormancija te potaknuo proces klijanja sjemena. Primijenjenim plazma tretmanima formirani su kisikovi i dušikovi radikali uzrokujući pad pH vrijednosti te povišenje temperature i električne vodljivosti PAW vode.

Gljučne riječi: hladna plazma, plazmom aktivirana voda, ječam, rotkvica, klijanje

Rad sadrži: 55 stranica, 28 slika, 1 tablicu, 63 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Tomislava Vukušić*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Zoran Herceg (predsjednik)*
2. Doc.dr.sc. *Tomislava Vukušić (mentor)*
3. Dr.sc. *Dunja Šamec, znanstveni suradnik (član)*
4. Izv.prof.dr.sc. *Dubravka Novotni (zamjena)*

Datum obrane: 26. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering

Scientific area: Biotechnical Science

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF PLASMA ACTIVATED WATER ON GERMINATION OF BARLEY AND RADISH

Jelena Vojvoda, 1110/PI

Abstract: Cold plasma is a novel technology used in agriculture for germination enhancement. Cold plasma can be generated directly by high-pressure gas discharge treatment, which induces changes on the seed surface or by indirect treatment of the liquid that is used for further applications to the seed. The aim of this study was to compare the effect of plasma activated water (PAW) on germination of barley and radish. PAW water is activated by HVED plasma, jet plasma and microwave plasma. Microwave plasma treatment with argon as a working gas is best solution for activation of PAW water in order to enhance the germination of radish and barley while HVED plasma treatment with nitrogen as a working gas for the growth and development of the stem. Due to the nitrates formed by cold plasma, dormancy was stopped and the seed germination process was initiated. Plasma treatment induced creation of radicals in PAW causing low pH, temperature and conductivity rise.

Keywords: cold plasma, plasma activated water, barley, radish, germination

Thesis contains: 55 pages, 28 figures, 1 table, 63 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduated Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Tomislava Vukušić, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Zoran Herceg, Full professor (president)*
2. PhD. *Tomislava Vukušić, Assistant professor (mentor)*
3. PhD. *Dunja Šamec, Research associate (member)*
4. PhD. *Dubravka Novotni, Associate professor (substitute)*

Thesis defended: 26th September 2019

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Plazma	2
2.2. Kemija plazme.....	3
2.3. Vrste plazma tretmana.....	5
2.3.1. Plazma jet	6
2.3.2. Mikrovalna hladna plazma	6
2.4. Plazmom aktivirana voda (PAW).....	6
2.5. Primjena hladne plazme	7
2.5.1. Primjena hladne plazme u agronomiji i prehrambenoj industriji.....	8
2.6. Rotkvice	9
2.7. Ječam.....	11
2.8. Klorofil.....	13
2.9. Prolin	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.1.1. Sjeme rotkvice.....	16
3.1.2. Sjeme ječma	16
3.1.3. Destilirana voda.....	16
3.1.4. Kemikalije	16
3.1.5. Pribor i aparatura	17
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Priprema agara.....	20
3.2.2. Priprema uzoraka.....	20
3.2.3. Tretman uzoraka hladnom plazmom u hibridnom reaktoru	21
3.2.4. Tretman uzoraka atmosferskom plazmom JET	22
3.2.5. Tretman uzoraka modificiranom hladnom plazmom mikrovalovima	23
3.2.6. Označavanje uzoraka.....	24
3.2.7. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara u plazmom aktiviranoj vodi	25
3.2.8. Metoda praćenja klijavosti	26
3.2.9. Određivanje ukupnog klorofila.....	27
3.2.10. Ekstrakcija i određivanje sadržaja slobodnog prolina	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Utjecaj plazma tretmana na fizikalno-kemijska svojstva plazmom aktivirane vode.....	30
4.1.1. pH vrijednost	30
4.1.2. Električna vodljivost i temperatura.....	32

4.1.3. Slobodni radikali	33
4.2. Utjecaj plazmom aktivirane vode na rast i razvoj sjemenki rotkvice i ječma.....	36
4.3. Utjecaj plazmom aktivirane vode na razvoj ukupnog klorofila u uzorku rotkvice i ječma	43
4.4. Utjecaj plazmom aktivirane vode na razvoj ukupnog sadržaja slobodnog prolina u uzorku rotkvice i ječma	46
5. ZAKLJUČCI	49
6. LITERATURA	50

1. UVOD

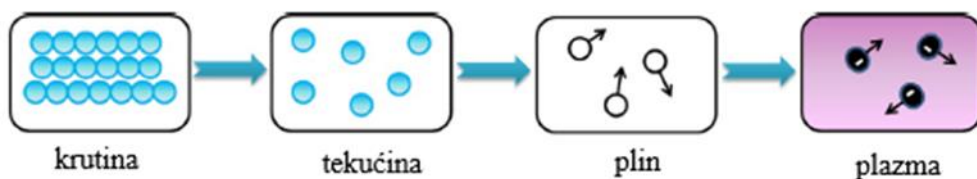
Tradicionalne metode koje se koriste u svrhu povećanja prinosa žitarica su navodnjavanje i gnojidba. Međutim, kako one za sobom povlače pitanje ekonomičnosti i utjecaja na okoliš i dugoročno gledano nisu održive, neprestano se traže nove i inovativne metode. Tehnologija hladne plazme nameće se kao obećavajuća jer je brza, održiva i nisko rizična metoda koja nudi novi i inovativni način povećanja prinosa u poljoprivredi (Jiang i sur., 2014a). Svrstava se u netoplinske tehnologije budući da se generira na sobnoj temperaturi i, prema dosad provedenim istraživanjima, ne uzrokuje negativne promjene na hrani (Niemira, 2012). Dobiva se električnim pražnjenjem u plinu pri atmosferskom ili smanjenom tlaku (vakuumu) ili pomoću mikrovalova te zahtijeva manji unos energije (Misra i sur., 2016). Plazma pražnjenjem u plinu nastaju reaktivne neutralne čestice, nabijeni elektroni i ioni te električna polja i ultraljubičasto zračenje. Dosadašnjim istraživanjima dokazano je da nastali slobodni radikali kisikovih i dušikovih spojeva utječu na pH vrijednost i električnu vodljivost plazmom aktivirane vode (PAW) čime se posljedično utječe na klijavost sjemenja, rast i razvoj biljke, a u konačnici i kvalitetu poljoprivrednog proizvoda (Ohta, 2016). Međutim, ukoliko se formira prekomjerna koncentracija slobodnih radikala kisika dolazi do narušavanja ravnoteže radikala i antioksidansa u smjeru radikala koji pritom izazivaju oksidacijski stres i posljedično oksidaciju klorofila (Ramazzina i sur., 2015). Zbog toga su mehanizmi tolerancije koje biljke razvijaju kao odgovor na stres uzrokovan nepovoljnim okolišnim uvjetima od ključne važnosti za proizvodnju sigurne hrane. Jedan od mehanizama zaštite od oksidativnog stresa je akumulacija aminokiseline prolina (Hayat i sur., 2012). Prolin je multifunkcionalna molekula koja djeluje kao osmoregulator, puferirajuće sredstvo i kao svojevrsni antioksidans kad se biljka nađe u stresnim uvjetima (Linić i sur., 2019).

Cilj ovog rada bio je usporediti utjecaj plazmom aktivirane vode (PAW) dobivene visokonaponskim pražnjenjem u tri različita sustava na klijavost i razvoj ukupnog sadržaja klorofila i slobodnog prolina u uzorcima ječma i rotkvice. Biljni materijal je podvrgnut tretmanu hladnom plazmom u vodi (direktni) i kontinuirano tretiran PAW vodom (indirektni). PAW voda dobivena je visokonaponskim pražnjenjem u hibridnom reaktoru (HVED plazma), plazmom jet i mikrovalnom plazmom. Ispitan je utjecaj plazma tretmana ovisno o korištenom radnom plinu i trajanju tretmana na fizikalno-kemijska svojstva PAW vode. Osim utjecaja PAW vode, ispitan je utjecaj hladnog stresa na sadržaj klorofila i slobodnog prolina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Plazma

Tri osnovna stanja tvari u prirodi su tekuće, kruto i plinovito dok je plazma je opisana kao četvrto stanje (Niemira i Gutsol, 2010). Plazma je ionizirani ili djelomično ionizirani plin koji se sastoji od nabijenih čestica (elektrona i iona), radikala, fotona i neutralnih čestica atoma i molekula (Tonks, 1967). Dovođenjem energije u sustav, tvari prelaze iz jednog agregatnog stanja u drugo. Slika 1 shematski prikazuje kako povišenjem temperature pri konstantnom tlaku čvrsta tvar prelazi u tekuće, a daljnjim dovođenjem toplinske energije u plinovito stanje. Iako brojčana vrijednost točke leđišta i točke vrenja ovisi o materijalu, svima je zajedničko da u faznim prijelazima dolazi do slabljenja veza i do promjene strukture molekula te u konačnici pucnja samih veza (Niemira i Gutsol, 2010). Porastom temperature od atoma nastaju slobodni pozitivni ioni i negativno nabijeni elektroni, a tvari ulazi u četvrto stanje- stanje plazme.



Slika 1. Shematski prikaz faznih prijelaza tvari (Misra i sur., 2016)

Plinovi su skup molekula (npr. N_2 , O_2 , CO_2) ili pojedinih atoma (npr. He, Ne, Ar) bez uređene strukture. Pri višim energijama, intramolekularna i intraatomska struktura plinova se razara, oslobađajući slobodne elektrone i ione (Niemira, 2012). Energija koja je potrebna za ionizaciju plinova može potjecati iz raznih izvora kao što su toplina, struja, lasersko svjetlo, zračenje i izuzetno brze kompresije. Kao oblak aktivnih čestica, plazma zadržava dodijeljenu energiju kroz određeni vremenski period. Međutim, kad sudari atoma postajnu toliko intenzivni da dolazi do oslobađanja negativno nabijenih elektrona i pozitivno nabijenih iona, njihovim kretanjem formiraju se električka i magnetska polja, odnosno formira se pobuđeno stanje materije – plazma (Vukušić, 2016). Zahvaljujući elektronima i ionima kao nosiocima naboja, plazma je električki vodljiva i zato snažno odgovara na magnetska polja. Kada se aktivne čestice međusobno rekombiniraju oslobađa se energija koja se manifestira kao vidljiva i UV svjetlost (Niemira i Gutsol, 2010). Aktivne čestice u plazmi mogu reagirati s prehrambenim

supstratom oslobađajući prethodno apsorbiranu energiju. Količina predane energije plazmom ovisit će o kemijskom sastavu, gustoći i temperaturi prehranbenog supstrata.

Glavne karakteristike djelomično ioniziranog plina su

- da se pokreće električnom energijom
- dolazi do sudaranja nabijenih čestica s neutralnim molekulama plina pa se ionizacijom neutralnih čestica plazma održava u stabilnom stanju
- elektroni nisu u toplinskoj ravnoteži s ionima
- na granici dolazi do površinskih gubitaka.

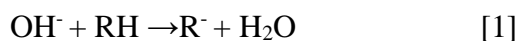
Plazma je definirana kao prosječna gustoća čestica gdje je gustoća čestica iona (n_i) i gustoća čestica elektrona (n_e) približno jednaka gustoći svih čestica (n)/ m^{-3} . Isto vrijedi i za temperaturu. Temperatura potrebna za formiranje plazme varira ovisno o korištenom plinom pa je tako za ionizaciju elementa kao što je cesij potrebno 400 K dok je za ionizaciju nekog plemenitog plina kao što je helij potrebno i do 20 000 K (Niemira, 2012).

2.2. Kemija plazme

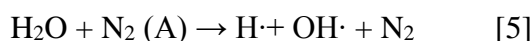
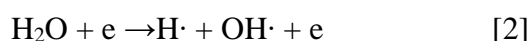
Kemijske reakcije plina ključne su za obradu nekog materijala plazmom (Lieberman i Lichtenberg, 2005). Kemijski sastav dovodnog plina je odgovarajući faktor u vrstama reakcija koje plazma može pokrenuti (Niemira i Gutsol, 2010). Plazma stvorena pri atmosferskom tlaku najčešće se koristi u agronomiji i prehrambenoj industriji jer ne zahtijeva ekstremne procesne uvjete (Misra i sur., 2011). Iako se atmosfera sastoji gotovo u potpunosti od neutralnih čestica, postoji i mala gustoća nabijenih iona i slobodnih elektrona. Uslijed djelovanja električnog polja dolazi do ubrzanja nabijenih čestica. Akcelerirane nabijene čestice dovest će do sudara, a posljedično i izmjene energije s nenabijenim česticama. Količina izmijenjene energije ovisi o omjeru njihovih masa, a izražava se u elektron voltima (eV). Nakon sudara iona približno jednake mase doći do potpune izmjene energije te će se oni prestati kretati dok će u slučaju sudara elektrona, čija masa je različita, doći do izmjene male količine energije. Preostala količina energije uzrokovat će zagrijavanje elektrona te će njihova temperatura postati viša od temperature plina. Zahvaljujući toj razlici temperatura, „vrući“ elektroni prevode električnu energiju u reaktivne radikale te pritom ne dolazi do zagrijavanje plina, odnosno pokreće se kemija hladne plazme (Turner, 2016). Uslijed velike gustoće elektrona u plazmi koji se ubrzavaju potaknuti električnim poljem dolazi do velikog broja sudara elektrona s atomima i molekulama plina te niza reakcija kao što su:

- Ionizacija $e + M \rightarrow M^+ + 2e$
- Disocijativna ionizacija $e + AB \rightarrow A^+ + B + 2e$
- Vežanje elektrona $e + M \rightarrow M^-$
- Disocijacija vezanih elektrona $e + AB \rightarrow A^- + B$
- Eksitacija $e + M \rightarrow M^* + e$
- Disocijacija $e + AB \rightarrow A + B$

Vjerojatnost bilo koje od navedenih reakcija ovisi o samoj energiji elektrona. Navedeni primarni procesi dovode do sekundarnih sudara elektrona, a samim time produkti primarnih reakcija postaju reaktanti sekundarnih kemijskih reakcija. U sekundarnim reakcijama dolazi do sudara iona i neutralnih čestica. I u primarnim i u sekundarnim reakcijama neutralizacije nastaje hidroksilni radikal (OH^\cdot) koji je vrlo reaktivan te djeluje kao jak oksidans u reakcijama s organskim tvarima koje u svojoj strukturi sadrže vodik (RH) pri čemu se formiraju radikali [1].

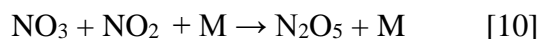
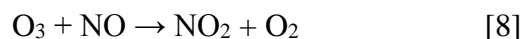
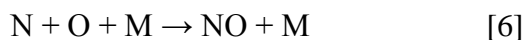


Hidroksidni radikal nastaje i u primarnoj reakciji disocijacije vode [2] te sekundarnim reakcijama neutralizacije iona [3] te u reakcijama s kisikom [4] i dušikom [5] u pobuđenom stanju. Nastali vodikovi i hidroksilni radikali mogu reagirati međusobno i stvoriti stabilni vodikov peroksid.



U sekundarnim reakcijama nastaje i dušikov oksid (NO) rekombinacijom dušikovih i kisikovih atoma nastalih u primarnim reakcijama u plinu, uz prisustvu molekule plina (M) [6]. Daljnjom reakcijom oksidacije dušikov oksid se prevodi pomoću molekularnog kisika [7] ili ozona [8] do dušikovog dioksida (NO_2). Nastali dušikov dioksid može ući u reakcije rekombinacije s atomom kisika te u tom slučaju nastaje reaktivna molekula NO_3 [9] koja u kombinaciji s molekulom NO_2 daje dušikov pentaoksid N_2O_5 [10]. Često se dodaju inertni plinovi kao što je

argon kako bi se stabilizirao naboj čestica. Međutim, ovakvi plinovi u plazmi nisu inertni već potiču stvaranje pobuđenih stanja koja uzrokuju različite reakcije (Whitehead, 2016).



2.3. Vrste plazma tretmana

Plazma se dijeli ovisno o temperaturi pri kojoj nastaje (Bogaerts i sur., 2002). Prema Niemiri (2012) razlikujemo termalnu (ravnotežnu) i netermalnu (neravnotežnu) plazmu. Ukoliko se plin zagrije na dovoljno visoku temperaturu (do 20 000 K) da se postigne ionizacija plina govorimo o termalnoj plazmi. Kod termalne plazme energija je dovoljno visoka da drži sve čestice u ravnoteži i ne dolazi do prijenosa energije među njima. Primjenom nižih temperatura (100 – 150 °C) generirat će se takozvana kvazitermalna plazma, dok su niske temperature (niže od 60 °C) dovoljne za formiranje netermalne plazme. Kod netermalne plazme elektroni posjeduju veću prosječnu energiju od težih čestica pa prilikom svakog sudara dolazi od prijenosa energije. Iako se kod termalne plazme postiže lokalna ravnoteža, ipak je učinkovitija netermalna plazma kod koje dolazi do hlađenja iona i neutralnih molekula pa tako i temperatura plina ostaje na niskoj temperaturi i otud potiče naziv hladna plazma. (Misra i sur., 2016). Hladna plazma se može generirati pri atmosferskom tlaku ili vakuumu. Plazma generirana pri atmosferskom tlaku dijeli se na pražnjenje izolatorskom pregradom (DBD; engl. dielectric barrier discharge), korona pražnjenje (engl. corona discharge) i kontinuirano pražnjenje lukovima (engl. gliding arc discharge). Plin koji se koristi kao radni može biti zrak, dušik ili smjesa koja sadrži neki plemeniti plin poput helija, argona ili neona. Kao pokretačka sila mogu se koristiti električna energija, mikrovalovi ili laseri. Ova široka paleta mogućnosti ukazuje na fleksibilnost sustava hladne plazme te pruža niz mogućnosti glede konstrukcije i izvedbe (Niemira, 2012).

2.3.1. Plazma jet

Plazma JET spada u atmosferske izvore plazma pražnjenja, a generira se ionizacijom inertnog plina, odnosno propuštanjem plina kroz kapilare s elektrodama u kojima dolazi do pobuđivanja i formiranja slobodnih radikala. Slobodni radikali se radnim plinom putem elektrode prenose do tretiranog materijala. Izvor plazme JET prilagodljiv je za površinske i tretmane tekućina ovisno u udaljenosti elektroda i tretiranog medija čime se izbjegava izravan kontakt plazme i medija pa se ovom tretmanu mogu podvrgnuti i osjetljiviji materijali (Turner, 2016).

2.3.2. Mikrovalna hladna plazma

Mikrovalno inducirana plazma nastaje pri nižim vrijednostima tlaka uslijed elektromagnetskih valova formiranih pri frekvenciji do nekoliko stotina MHz. Mikrovalno pražnjenje odvija se u megatronu, cijevi pod vakuumom, iz koje se mikrovalovi šire putem koaksijalnog kabla u procesnu komoru (reaktor). Nastalo zračenje apsorbira radni plin pri čemu se razvija toplina te dolazi do ionizacije čestica plina i formiranja mikrovalne plazme. Prednost mikrovalne plazme je u tome što se lako može ispustiti u zrak, potrebno je malo plina za njeno generiranje, a pritom se formira veliki broj reaktivnih vrsta (Chizoba i sur., 2017). Prednost generiranja hladne plazme mikrovalovima leži u jednostavnoj konstrukciji uređaja, a budući da za pražnjenje plazme nije potrebna elektroda, sprječava se onečišćenje nanočesticama s elektrode (Chang, 2013; Kutasi i sur., 2019).

2.4. Plazmom aktivirana voda (PAW)

U posljednjih desetak godina plazmom aktivirana voda (PAW) tema je istraživanja u medicini i agronomiji budući da posjeduje svojstvo induciranja oksidativnog stresa u stanicama (Kutasi i sur., 2019). Formiranje PAW vode uključuje površinski kontakt vode i plazme ili pak nastaje generiranjem plazme unutar vode. Aktivnost dobivene PAW vode očituje se u promijenjenom fizikalno-kemijskom sastavu u kom se ističu povećanje koncentracije reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, snižen pH te povećanje električne vodljivosti. Zahvaljujući navedenim fizikalno-kemijskim svojstvima, PAW voda nameće se kao alternativa za inaktivaciju bakterija i kontrolu njihova rasta što je vrlo bitno prilikom konzerviranja hrane, dok se neka istraživanja okreću upotrebi PAW vode u agronomiji za poboljšanje klijavosti biljaka (Thirumdas i sur.,

2018). Park i sur. (2013) dokazali su da ovisno o izvoru generiranja plazme, PAW voda potiče rast i pojačava djelovanje kemijskih gnojiva kod lubenice, graha i lucerne koje su bile predmet njihova istraživanja. Ovisno o naponu, vrsti tretmana i korištenom radnom plinu nastaju kisikovi (hidroksidni radikal, atomski kisik, ozon i vodikov peroksid) i dušikovi radikali (dušikov oksid i njegovi derivati s formirani s vodom, uključujući nitrite, nitrate i peroksinitrite). Naknadnom reakcijom vodikova peroksida i nitrita nastaju peroksinitriti koji dodatno doprinose antimikrobnim svojstvima PAW vode. Vrsta i koncentracija formiranih reaktivnih vrsta prisutnih u PAW vodi ovisi i o trajanju tretmana, udaljenosti tretirane vode od izvora plazme te vrsti korištenih elektroda. Vrijednost pH PAW vode kreće se između neutralnog i kiselog područja, ovisno o početnom sastavu vode, stvaranju dušikovih spojeva i duljini tretmana. Što je dulji tretman, niža će biti pH vrijednost PAW vode (Thirumdas i sur., 2018). Oehmigen i sur. (2010) zaključili su da do sniženja pH vrijednosti dolazi zbog reakcije između kisikovih i dušikovih radikala s molekulama vode pri čemu se formiraju vodikov peroksid i dušična kiselina. Osim na pH, radikali prisutni u PAW vodi utječu na povećanje električne vodljivosti. Električna vodljivost je mjera za sposobnost PAW vode da omogući protok električne struje i izražava se u $\mu\text{S cm}^{-1}$ (Thirumdas i sur., 2018). Kisikovi i dušikovi radikali prisutni u PAW vodi doprinose povećanju električne vodljivosti što su dokazali i Ma i sur. (2015). Usporedno, što je veća električna vodljivost PAW vode formirat će se veća koncentracija vodikova peroksida (Lukes i sur., 2008). Međutim, kako s vremenom dolazi do polagane degradacije vodikova peroksida, između ostalog i zbog reakcija s nitritima, dolazi do formiranja dušične kiseline koja doprinosi sniženju pH vrijednosti. Sinergistički učinak između pH vrijednosti i slobodnih radikala pospješuje inaktivaciju bakterija te igra važnu ulogu u produljenju roka trajnosti prehrambenih proizvoda (Kutasi i sur., 2019).

2.5. Primjena hladne plazme

Primjena hladne plazme je vrlo široka te pokriva različite aspekte svakodnevnog života, a koristi se u različitim industrijama. Prvobitna namjena korištenja hladne plazme je kao dio uređaja za obradu materijala, odnosno za jetkanje (graviranje) poluvodičkih površina. U posljednje vrijeme u nanotehnologiji sve više do izražaja dolazi upotreba hladne plazme za sintezu nanočestica po principu „bottom-up approach“. Koristi se i u tekstilnoj industriji za modifikaciju polimera, a u novije doba i kao alternativna tehnologija za uklanjanje ekoloških

onečišćenja uzrokovanih hlapljivim organskim komponentama kao posljedice emisije plinova iz različitih industrija. U vidu smanjenja okolišnog zagađenja koristi se i kao tehnologija za otklanjanje različitih onečišćenja iz industrijskih otpadnih voda (Misra i sur., 2016). Osim u industriji, plazma se koristi i u analitičkoj kemiji, posebice kod spektroskopije i masene spektrometrije za ionizaciju molekula i atoma. Također, primjena hladne plazme u području biologije dovela je do znatnih dostignuća na staničnoj razini, od zacjeljivanja rana, primjene plazme kod kožnih tretmana pa sve do tretmana kostiju i liječenja raka (von Woedtke i sur., 2013).

2.5.1. Primjena hladne plazme u agronomiji i prehrambenoj industriji

Uz stalni porast svjetske populacije i potražnja za hranom je sve veća stoga je od velike važnosti razvoj tehnologija. Primjena hladne plazme u prehrambenoj industriji pokazuje veliki potencijal. Uspoređujući doseg nekih netoplinskih tehnologija i tehnologije hladne plazme, hladna plazma nudi niz prednosti. Prednosti korištenja hladne plazme kod konzerviranja hrane su da pokazuje visoki antimikrobni potencijal kod temperatura nižih od 50 °C čime se produljuje rok trajanja prehrambenih proizvoda i održivost cijelog lanca opskrbe (Ohta, 2016). Osim za dekontaminaciju proizvoda, hladna plazma se u prehrambenoj industriji koristi za inaktivaciju enzima, uklanjanje toksina i kao tretman za obradu otpadnih voda (Pankaj i sur., 2017). Također, plazma generirana iz do sada dostupnih izvora kompatibilna je s većinom postojećih ambalaža i koristi se za dekontaminaciju iste (Pankaj i sur., 2014). Plazmu karakterizira visoka propusnost pa se upotrebom plazme djeluje brzo i po cijeloj površini u većini slučajeva. Ne djeluje štetno na sam prehrambeni proizvod koji se podvrgava tretmanu plazmom pa se smatra da bi u budućnosti mogla zamijeniti i uporabu konzervansa. Smatra se ekološki prihvatljivom budući da ne zahtijeva upotrebu vode ili otapala, kao ni puno električne energije. Također, ova tehnologija primjenjiva je za obradu krute i tekuće hranu. Različite konfiguracije izvora plazme omogućuju generiranje hladne plazme kako u različitim plinskim atmosferama tako i u vodi, odnosno tekućinama. Iako hladna plazma nudi brojne prednosti, također postoje neka ograničenja koja je potrebno dodatno istražiti. Na primjer, za sad ne postoji sustav koji bi precizno mjerio koji točno kemijski produkti nastaju tijekom kemijskih reakcija uslijed plazma pražnjenja u plinu, pogotovo prilikom tretmana namirnica čija vlaga varira. Plazma pražnjenje u smjesi plinova koja sadrži kisik nije najprikladniji za tretman namirnica

koje u svom sastavu sadrže veći udio masti jer posljedično može doći do reakcija oksidacije masti (Misra i sur., 2016).

Glavni problemi u agronomiji su smanjenje ili zaustavljanje rasta žitarica uzrokovano gljivicama, kontaminacija toksinima i pesticidima koji zaostaju u usjevima, ali i žitaricama nakon žetve. Posljedično se smanjuje sposobnost klijanja žitarica, a smanjuju se i prinosi nakon žetve. Zbog toga je vrlo bitan razvoj novih tehnologija koje će doprinijeti suzbijanju štetočina prije i nakon žetve te tijekom skladištenja (Misra i sur., 2015). Također, upotrebom novih tehnologija cilj je modificirati i poboljšati mehanizam rasta i razvoja, a da pritom u prehrambenim proizvodima ne zaostaju kemijski produkti formirani u reakcijama prilikom upotrebe određenog plazma tretmana (Jiang i sur., 2014b).

Plazma pražnjenjem u plinu nastaju reaktivne neutralne čestice, nabijeni elektroni i ioni te ultraljubičasto zračenje i električna polja kojim se mijenja gustoća slobodnih radikala kisika i dušikovih spojeva, pH vrijednost, oksidacijsko- redukcijski potencijal i električna vodljivost čime se utječe na klijavost sjemenja, rast i razvoj biljke, a u konačnici i na kvalitetu poljoprivrednog proizvoda. Trenutno je primjena tehnologije plazme u agronomiji ograničena na dekontaminaciju sjemena ili usjeva namijenjenih sjetvi ili skladištenju, dezinfekciju alata i obradivih površina, na unapređenje klijanja i rasta sjemena, proizvodnje gnojiva na bazi dušika, sanacije tla, smanjenje invazije patogena te uklanjanje etilena iz zraka kako bi se spriječilo ubrzano starenje proizvoda. Još neke od primjena hladne plazme uključuju čišćenje zraka, odvajanje etilena iz skladišta te uklanjanje hlapljivih organskih komponenti iz staklenika i farmi peradi (Ohta, 2016).

2.6. Rotkvica

Rotkvica (*Raphanus sativus* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice krstašica (*Brassicaceae*). Uzgaja se zbog zadebljalog hipokotila koji se na donjem dijelu produžuje u tanki pravi korijen, a na gornjem dijelu ima vrlo skraćenu stabljiku s rozetom lišća. Cvjetovi su skupljeni u grozdasti cvat. Plod je komušica s 3 – 6 sjemenki, svijetlo smeđe boje i nepravilnog okruglog oblika (Lešić i sur., 2002).

Prednost uzgoja rotkvice je vrlo brzo dozrijevanje i otpornost na hladnoću, a sije se od sredine veljače do sredine rujna. Ako se radi o uzgoju u tunelima i plastenicima, sije se od kraja rujna do kraja ožujka. Moguća je cjelogodišnja proizvodnja na otvorenom, a zbog brzog dozrijevanja često se koristi kao međuusjev (Gadžo, 2014; Šakić Bobić, 2014). Uglavnom se uzgaja se u

područjima umjerene klime (Lešić i sur., 2002). Rotkvica se nikad ne uzgaja u monokulturi već je proizvođači često koriste u plodoredu kako bi iskoristili prostor prije sjetve sljedeće kulture, na primjer ječma (Gadžo, 2014; Šakić Bobić, 2014). Osim kao međuusjev, dobro se uklapa i kao pretkultura i kao naknadni usjev (Kantoci, 2009). Sije se preciznom sijačicom uz razmak redova 15 – 20 cm, oko 350 sjemenki po m², na dubinu od 1 do 1,5 cm (Lešić i sur., 2002). Optimalna temperatura za uzgoj sjemena rotkvice je 18 °C dok je minimalna 2-3 °C (Kantoci, 2009). Prilikom uzgoja najvažnije je pravovremeno navodnjavanje, a vlaga tla ne bi smjela biti ispod 60 % poljskog vodnog kapaciteta. Rotkvica ima razmjerno plitak korijen pa joj zato najbolje odgovara lagano, humozno tlo, dobre strukture, koje nakon navodnjavanja kišom ne stvara pokoricu. Najbolje uspijeva pri pH 5,6 do 7. Ako se sije nakon kulture koja ostavlja dosta dušika u tlu (grašak, grah mahunarke) često nije potrebno gnojiti dušikom jer prevelike doze mogu djelovati na smanjenje kvalitete. Za vrućih dana potrebno je dnevno orošavanje (Lešić i sur., 2002).

U posljednje vrijeme rotkvica se uzgaja i kao mikrozelenje (engl. microgreens) budući da je interes potrošača za svježom i funkcionalnom hranom u stalnom porastu (Slika 2). Mikrozelenje, često zvano i „povrće konfeti“ nova je vrsta specijalnih usjeva, definirana kao mlado, nježno i nezrelo zelenje uzgojeno iz sjemena povrća, bilja i žitarica (Kyriacou i sur., 2016). Mikrozelenje rotkvice je vrsta s dva potpuno razvijena kotiledonska listića, bez prisutstva pravih, zrelih listova. Iako je visine od 2,5 do 7,6 centimetara, mikrozelenje je često intenzivnog okusa, životopisne boje te hrskave teksture pa se često poslužuje kao ukras ili jede kao salata. Bere se 7 do 14 dana nakon klijanja, a konzumira se stabljika s razvijenim kotiledonskim listićima (Xiao i sur., 2012). Prednost uzgoja rotkvice kao mikrozelenja, osim kratkog proizvodnog ciklusa i toga što je relativno nezahtjevno za uzgoj leži u tome što do potrošača dolazi svježije, u posudama za uzgoj. Na taj način potrošač ubere mikrozelenje rotkvice neposredno prije upotrebe čime se sprječava gubitak nutrijenata u procesu transporta od tvornice do krajnjeg potrošača (Di Gioia i sur., 2017). Xiao i sur. (2012) dokazali su da je mikrozelenje rotkvice bogato antioksidansima, točnije askorbinskom kiselinom, karotenoidima, filokinonima i tokoferolima. Obiluje i mineralima i vitaminima. Odlikuju je i ljekovita svojstva jer djeluje pozitivno na probavu, dišne organe i kožu (Šakić Bobić, 2014).



Slika 2. Mikrozeljenje rotkvice (Anonymus 1)

2.7. Ječam

Ječam (*Hordeum vulgare* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice trava (*Poacea*), roda *Hordeum* (Slika 3), a ovisno o broju klasova razlikujemo tri podvrste: dvoredni, prijelazni i višeredni ječam. Postoje jare i ozime forme ječma. Jare su osjetljivije na sušu od ozime (Gagro, 1997). U industriji se prvenstveno koristi u proizvodnji piva i alkohola dok se slad ječma koristi se pekarskoj, konditorskoj i tekstilnoj industriji.

Morfologija ječma slična je morfologiji ostalih strnih žitarica s nekoliko razlika u građi klasa i lista. Korijen ječma je žiličast, a sastoji se od primarnog i sekundarnog. Primarni korijen sadrži četiri do osam korjenčića. Sam korijenski sustav slabo je razvijen i male apsorpcijske snage u odnosu na ostale žitarice pa je zbog toga vrlo bitno osigurati kvalitetnu površinu za uzgoj. Ječmu odgovaraju plodnija, strukturalna i dublja tla, slabo kiselog do neutralnog pH. Stabljika ječma je šuplja je i s manje građevnih elemenata, pa je zato nježnija i sklona polijeganju, za razliku od suvremenih sorti koje imaju stabljiku nižu od metra pa su otpornije na samo polijeganje. List ječma se sastoji od lisnog rukavca i plojke, a od ostalih žitarica se razlikuje po klasiću koji može biti zbijen u usjeku kasnog vretena. U usjeku mogu biti zbijena jedan do tri klasića i po njima se prepoznaju radi li se o jednorednom ili dvorednom ječmu. Plod ječma je zrno obraslo pljevicom (Poljoprivredni fakultet Osijek, 2015).

Ječam je vrlo otporna biljna vrsta pa ima veliki areal rasprostranjenosti u usporedbi s ostalim žitaricama. Skromnih je zahtjeva prema vlazi i toplini u odnosu na pšenicu. Karakterizira ga kratka vegetacija (ozime forme 240-260 dana, jare forme 60-130 dana). Tijekom vegetacije za nesmetan razvoj dovoljno je do 450 mm pravilno raspoređenih oborina. Klijanje (Slika 4) se odvija i pri temperaturi 1-2 °C, a optimalna temperatura za rast je 15 °C, iako podnosi i niske

temperature do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Da bi isklijalo, zrnju ječma potrebno je 48 % vlage od ukupne mase zrna. U povoljnim uvjetima, ječmam klija 5-6 dana nakon sjetve. Nicanje može biti usporeno ukoliko nakon sjetve dođe do naglog zahlađenja. Ječmam ima slabije razvijeni korijen u odnosu na druge žitarice i ne podnosi tla slabije kvalitete i niskog pH. Optimalni pH za uzgoj ječma iznosi 6,5-7,2. Za uzgoj ječma treba izabrati tla na kojima nema zadržavanja suvišnih oborinskih voda i visokih podzemnih voda. Kao i rotkvice, ječmam se ne uzgaja u monokulturi. Sije se sijačicom u redove na razmak 8–10 cm, oko 300-500 klijavih sjemenki po m^2 , na dubinu 3-5 cm. Žetva ječma obavlja se kad je vlaga zrna manja od 14 % (Gagro, 1997).



Slika 3. Klas ječma (Anonymus 2)

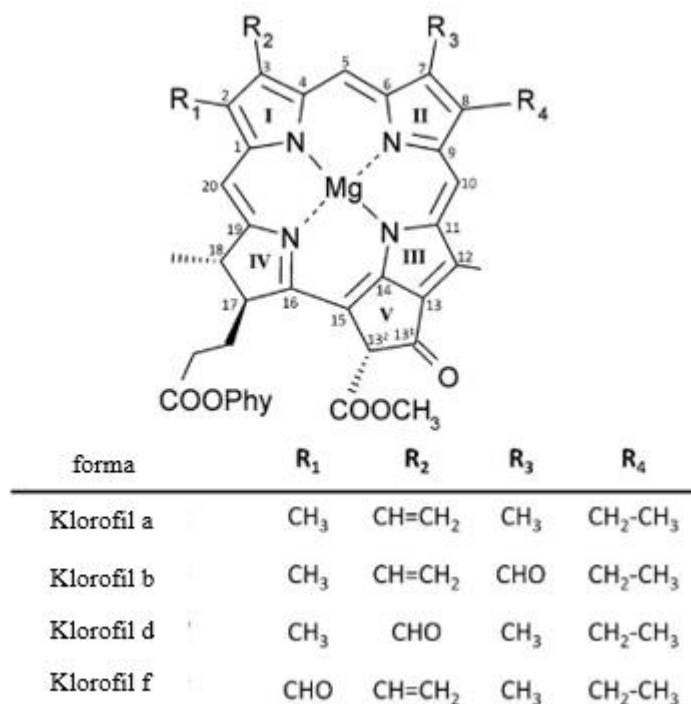


Slika 4. Isklijala zrna ječma (Anonymus 3)

Zrno ječma sadrži tri sloja aleuronskih stanica bogatih nutritivno vrijednim sastojcima: vitaminima, mineralima i esencijalnim aminokiselinama te se zbog toga smatra jednom od nutritivno najvrjednijih žitarica. Sadrži sve oblike vitamina E, ali je prvenstveno izvor vitamina B (niacin B3). Ječmam je dobar izvor kalija, fosfora i magnezija. Od polifenolnih spojeva prevladavaju antocijani i katehini, međutim skloni su oksidaciji te prilikom procesa mljevenja dolazi do značajnih gubitaka ovih bioaktivnih komponenti. Ječmam je odličan izvor topivih i netopivih vlakana. Omjer neškrobnih polisaharida (prehrambenih vlakana) u ječmu je β -glukan: arabinoksilan: celuloza = 70 % : 20 % : 3 %. Topiva vlakna, β -glukani, nalaze se većinom u endospermu te usporavaju prolazak hrane i poboljšavaju apsorbciju nutrijenata u tankom crijevu, smanjuju porast glukoze nakon obroka i razinu kolesterola u plazmi te tako smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti i pridonose radu imunološkog sustava dok netopiva vlakna poput celuloze pospješuju probavu i smanjuju rizik od raka debelog crijeva. I β -glukani i arabinoksilani imaju visoki afinitet vezanja vode pa se često nazivaju i gumama. Smatraju se prebioticima (hrana za dobre bakterije u probavnom sustavu), posebice njihovi oligosaharidi koji se mogu dobiti hidrolizom (Serna Salvidar, 2010).

2.8. Klorofil

Klorofil je pigment koji daje zelenu boju biljkama i nekim vrstama voća (Bulgari i sur., 2017). Osnovna građevna jedinica klorofila je hidrofilni heterociklički porfirinski prsten koji se sastoji od četiri pirolova prstena povezana preko dušikova atoma s ionom magnezija (Mg^{2+}) u središtu prstena. Na četvrti pirolov prsten vezan je hidrofobni lanac fitola. Molekula klorofila lokalizirana je na tilakoidnim membranama kloroplasta. U prirodi se klorofil može naći u obliku klorofila *a*, *b*, *d* ili *f*. Forme klorofila međusobno se razlikuju u strukturi (Slika 5). Forme *a* i *b* su najrasprostranjenije u prirodi (Voloshin i sur., 2015). Modrozeleni klorofil *a* i žutozeleni klorofil *b* apsorbiraju vidljivi dio spektra i imaju maksimume apsorpcije u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Omjer klorofila *a* i *b* u biljkama iznosi 3:1 i njihov omjer može se mijenjati ovisno o okolišnim uvjetima i uvjetima rasta pa se tako prilikom duge izloženosti suncu omjer pomiče na 3,3:4 dok biljke uzgajane u sjeni imaju niži omjer klorofila *a* i *b*. Klorofil se smatra bioaktivnom komponentom budući da djeluje antioksidacijski i antimutageno (Willows i sur., 2013). Sadržaj klorofila je osim pozitivnog učinka na zdravlje ljudi važan i zbog organoleptike (Bulgari i sur., 2017). Vrlo je bitna molekula za apsorpciju svjetla i prijenos energije u procesu fotosinteze (Willows i sur., 2013). Zahvaljujući svojstvu apsorpcije svjetlosti, klorofil može djelovati i kao potencijalni fototoksin. Primjerice, ukoliko je biljka izložena uvjetima visoke razine svjetlosti, apsorbirana energija se prenosi na kisik što rezultira stvaranjem kisikovih slobodnih radikala (ROS). Inhibicijom biosinteze ili degradacije klorofila dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih kisikovih radikala i do odumiranja stanica (Hörtensteiner i Kräutler, 2011). Razgradnja klorofila povezana je sa starenjem proizvoda i degradacijom na staničnoj razini, a do degradacije klorofila može doći kao odgovor stanice na biotski i abiotski stres (Paradiso i sur., 2018).

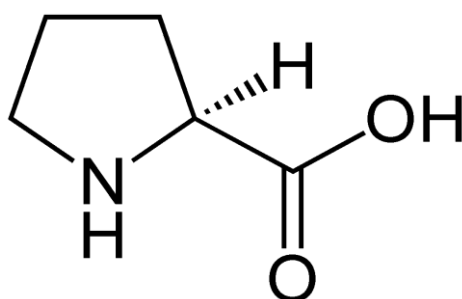


Slika 5. Prikaz strukture klorofila *a*, *b*, *d*, *f* (Voloshin i sur., 2015)

2.9. Prolin

Aminokiseline su prekursori i glavne sastavnice proteina te igraju važnu ulogu u metabolizmu i razvoju biljaka. Kad se biljke izlože različitim oblicima stresa, dolazi do nakupljanja niza metabolita, prvenstveno aminokiselina u njihovom sustavu (Hayat i sur., 2012). Prolin je aminokiselina koja se nakuplja u mnogim biljnim vrstama kao odgovor na stres uzrokovan promjenama u okolišu kao što su suša, visoki salinitet, UV zračenje, prisutnost teških metala ili oksidativni stres. Hladni stres, kao jedan od brojnih ekološki izazvanih stresova, u metabolizmu biljaka izaziva remećenje ravnoteže prekomjernim stvaranjem kisikovih slobodnih radikala koji lančanom reakcijom sa staničnim makromolekulama dovode do oksidativnog stresa (Valizadeh-Kamran i sur., 2017). Kako bi se izbjegao oksidativni stres, dolazi do formiranja slobodnog prolina (Hayat i sur., 2012). Iako se o metabolizmu prolina danas mnogo toga zna, neki aspekti njegova biološka djelovanja još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni. U biljkama se prolin sintetizira uglavnom iz glutamata, koji se reducira do glutamata-polualdehida (GSA) enzimom pirolin-5-karboksilat sintetaza (P5CS) i spontano pretvara u pirolin-5-karboksilat (P5C). Pirolin-5-karboksilat se tada pomoću enzima reduktaze (P5CR) prevodi u prolin. Strukturna formula prolina prikazana je na Slici 6. Sinteza prolina se

odvija u citoplazmi i kloroplastima dok se razgradnja odvija u mitohondrijima (Szabados i Savouré, 2010). Verbruggen i Hermans (2008) pretpostavili su da se razgradnjom prolina može osigurati biljci izvor energije, ugljika i dušika za oporavak od stresa. Dugo vremena se prolin smatrao inertnim kompatibilnim osmolitom koji štiti stanične strukture i makromolekule od promjena uzrokovanih osmotskim stresom. Međutim, prolin može djelovati i kao signalna molekula za moduliranje mitohondrijskih funkcija, utjecati na proliferaciju stanica ili staničnu smrt i potaknuti ekspresiju specifičnih gena, što može biti bitno za oporavak biljke od stresa. Prolin je tako svojevrsna prateća aminokiselina koji djeluje protektivno na proteine, odnosno utječe na aktivnost enzima i ekspresiju gena kojima se regulira rast i razvoj biljaka (Szabados i Savouré, 2010). Kad se biljka nađe u stresnim uvjetima, dolazi do prekomjerne sinteze prolina koji održavanjem turgona stanica ili osmotske ravnoteže doprinosi povećanju tolerancije biljke na izazvani stres. Prolin stabilizira membrane čime se sprječava istjecanje elektrolita te regulira koncentracijsku ravnotežu reaktivnih kisikovih vrsta ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$, H_2O_2 radikala). Biljke kontinuirano sintetiziraju reaktivne kisikove spojeve kao nusprodukte različitih metaboličkih puteva budući da imaju značajnu ulogu u pružanju zaštite od štetnih patogena, lignifikaciji i ostalim razvojnim procesima. Međutim, prekomjerna razina formiranih kisikovih reaktivnih spojeva dovodi do remećenja ravnoteže i do pojave tzv. oksidativnog stresa. Ukoliko se poremeti ravnoteža formiranja reaktivnih kisikovih vrsta dolazi do različitih oštećenja kao što su oštećenja nukleinskih kiselina, oksidacije proteina i lipida te razgradnje pigmenta klorofila. Do remećenja ravnoteže dolazi kad se biljka izloži bilo biotskom ili abiotskom stresu. Jedna od uloga prolina je i uklanjanje slobodnih radikala (Hayat i sur, 2012). Osim što štiti enzime od denaturacije, prolin regulira citosolni pH, održava omjer $\text{NADH} / \text{NAD}^+$ u ravnoteži te služi kao izvor energije (Javadian i sur., 2010).



Slika 6. Strukturna formula prolina (Anonymus 4)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Sjeme rotkvice

Za potrebe ovog eksperimentalnog rada korištene su sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus* L.) marke Nutrigold (100 g, Tvornica zdrave hrane, Zagreb, Hrvatska) kupljene u specijaliziranoj lokalnoj prodavaonici u Zagrebu.

3.1.2. Sjeme ječma

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteno je zrno ječma (*Hordeum vulgare* L.) sorte Golden Promise dostavljeno s Wigner Research Centre for Physics iz Budimpešte, Mađarska.

3.1.3. Destilirana voda

U eksperimentalnom dijelu korištena je deionizirana voda dobivena postupkom deionizacije niske električne vodljivosti, neutralnog pH i sobne temperature.

3.1.4. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su visoke analitičke (p.a.).

Titan test reagens za određivanje vodikovog peroksida

- titan (IV) oksid, Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- sumporna kiselina (1:1), Sigma Aldrich (Steinhaim, Njemačka)
- deionizirana voda

Titan test reagens pripremljen je otapanjem 1 g titan (IV) oksida u 100 mL vruće sumporne kiseline (1:1). Reakcijska smjesa se zagrijava na oko 190 °C i miješa kroz 20 h. Titan je otopljen kada inicijalno bijela otopina postane prozirna. Nakon što se sav titan otopi, reagens otopina se ohladi na sobnu temperaturu i razrijedi na volumen od 500 mL destiliranom vodom.

Određivanje nitrita i nitrata u plazmom aktiviranoj vodi

- Indikatorski listići za određivanje nitrita i nitrata (Quantofix Peroxyde 25, Quantofix Nitrate / Nitrite test strips, Macherey-Nagel (Düren, Njemačka)

Određivanje ukupnih klorofila u uzorcima ječma i rotkvice

- Aceton, Gram mol (Zagreb, Hrvatska)

Za određivanje ukupnih klorofila korišten je 80 %-tni aceton pripremljen razrjeđivanjem 100 %-tnog acetona s destiliranom vodom. 80 mL 100 %-tnog acetona pomiješa se s 20 mL destilirane vode. Otopina za ekstrakciju skladištena je na sobnoj temperaturi.

Ekstrakcija i određivanje prolina u uzorcima ječma i rotkvice

- Tekući dušik, Sol Group (Sisak, Zagreb)
- 96 %-tni etanol, Sigma Aldrich (Steinham, Njemačka)
- 70 %-tni etanol, Sigma Aldrich (Steinham, Njemačka)
- Octena kiselina, Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- Ninhidrin, Sigma Aldrich (Steinham, Njemačka)

Kao otopina za ekstrakciju korišten je 70 %-tni etanol pripremljen razrjeđivanjem 70 mL 96 %-tnog etanola s 30 mL destilirane vode.

Radna otopina pripremljena je otapanjem 0,5 g ninhidrina u 30 mL octene kiseline i 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 50 mL. Odmjerna tikvica se do oznake nadopuni deioniziranom vodom. Radna otopina čuva se tamnoj boci.

3.1.5. Pribor i aparatura

Mjerenje pH

- Digitalni pH metar, elektroda HI11310, HANNA instruments (Woonsocket, Rhode Island, SAD)

Mjerenje električne vodljivosti

- Konduktometar, elektroda HI763100, HANNA instruments, (Woonsocket, Rhode Island, SAD)

Mjerenje temperature

- Digitalni infracrveni termometar, InfraRed Thermometar, PCEC-777, PCE Instruments, (Southampton, Engleska)

Priprema agara za uzgoj ječma i rotkvice

- Petrijeve zdjelice θ 90 mm
- Magnetna miješalica s grijačem, K-78HW-1 Magnetic Stirrer Heating Hot Plate Set, Crystal (Texas, SAD)
- Digitalni infracrveni termometar, InfraRed Thermometer, PCEC-777, PCE Instruments, (Southampton, Engleska)
- Pipeta
- Stakleni štapić

Priprema podloge za uzgoj ječma

- Filter papir
- Škare
- Laboratorijske čaše 500 mL
- Najlonska vrećica

Inkubacija

- Laboratorijski inkubator, MyTemp™ Mini Digital Incubator, Benchmark Scientific, (Sayreville, USA)
- Frižider

Određivanje dužine klice ječma i stabljike rotkvice

- Ravnalo

Određivanje ukupnih klorofila u uzorcima ječma i rotkvice

- Spektrofotometar, UviLine 9400, SECOMAM, Aqualabo (Marne, Francuska)
- Centrifuga, Rotina 380 R, Hettick Zentrifugen (Tuttlingen, Njemačka)
- Homogenizator, T18 basic, ULTRA-TURRAX, Ika Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Njemačka)
- Laboratorijska vaga, 9.3.ke EG, Mikrotehna, (Zagreb, Hrvatska)
- mikrofilteri
- Kivete za centrifugiranje
- Kivete za spektrofotometar
- Automatske mikropipete 100-5000 μ L
- Nastavci za mikropipete
- Čaše od 50 mL

Ekstrakcija i određivanje prolina u uzorcima ječma i rotkvice

- Škare
- Pinceta
- Špatula
- Mikropipete 100-1000 μL
- Nastavci za mikropipete
- Tarionik i tučak
- Eppendorf epruvete
- Analitička vaga, 9.5.ke EW-A, Mikrotehna, (Zagreb, Hrvatska)
- Homogenizator, MM 400, Retsch (Haan, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj, Silvercrest (Zagreb, Hrvatska)
- Rotator, Bio RS-24, Mini-Rotator, bioSan (Riga, Latvija)
- Centrifuga 5424 R, Eppendorf (Hamburg, Njemačka)
- Vorteks, EV-102, Tehtnica, (Železnik, Srbija)
- Block Heater, Sample Concentrator, SBHCONC/1, Stuart, Labex (Edenvale, Južna Afrika)
- Posuda s ledom
- Spektrofotometar, BioSpec-1601 E, DNA/Protein/Enzyme Analyzer, Shimadzu (Duisburg, Njemačka)

Tretman hladnom plazmom

- Hibridni reaktor, Spellman, (London, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Plazma JET reaktor, IFS, (Zagreb, Hrvatska)
- Plinska boca dušika, Messer Croatia, (Zaprešić, Hrvatska)
- Plinska boca argona, Messer Croatia, (Zaprešić, Hrvatska)
- Čaša 500 mL

3.2. Metode

3.2.1. Priprema agara

Hranjiva podloga je pripravljena otapanjem 1g agara (Agar Technical, Biolife, Milan, Italija) u 100 mL deionizirane vode polaganim zagrijavanjem na magnetnoj miješalici do vrenja i formiranja viskozne tekućine. Nakon hlađenja do 50 °C, pripremljeni agar razlije se u prethodno sterilizirane Petrijeve zdjelice. Hlađenjem agara formira se čvrsta podloga čija je debljina duplo veća od debljine sjemena rotkvice, odnosno zrna ječma.

3.2.2. Priprema uzoraka

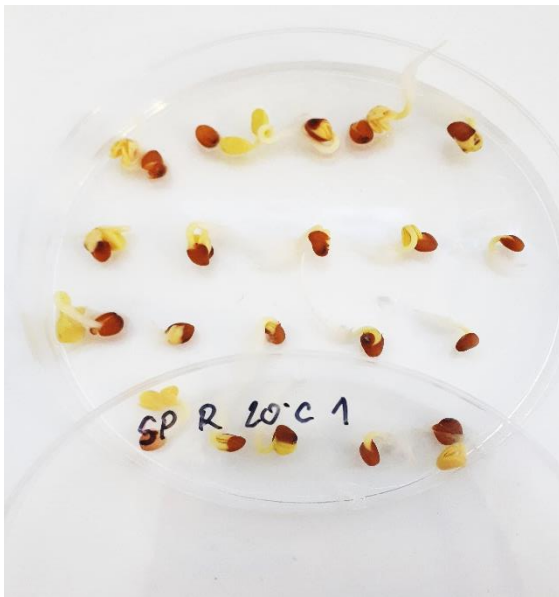
Priprema sjemena rotkvice

Sjeme rotkvice podvrgnuto je tretmanu hladnom plazmom u vodi (direktni), a potom kontinuirano tretirano PAW vodom (indirektni). Rotkvice je uzgajana u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi – agaru (Slika 7). U svaku Petrijevu zdjelicu smješteno je ukupno 20 sjemenki rotkvice poredanih u 4 reda po 5 sjemenki. Tretirane su tj. navodnjavane prethodno generiranom PAW vodom. Sjemenke rotkvice su uzgojene kroz 5 dana na temperaturi od 20 °C ± 1 °C u laboratorijskom inkubatoru. Dio uzoraka najprije je podvrgnut hladnom stres testu uzrokovanom hladnoćom. Uzorci su prva 3 dana inkubirani u frižideru na + 4 °C, a potom prebačeni u laboratorijski inkubator na 20 °C ± 1 °C. Kao slijepa proba koristilo se sjeme rotkvice navodnjavano netretiranom deioniziranom vodom. Slijepa proba provedena je u oba slučaja inkubacije.

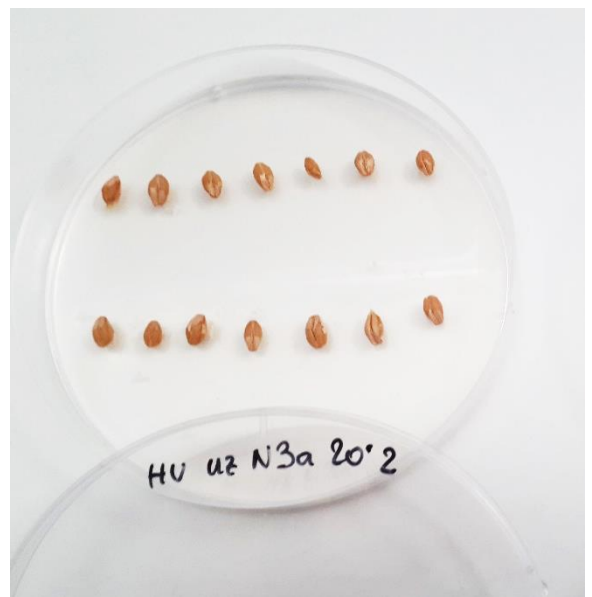
Priprema zrna ječma

Nakon direktnog tretmana zrna ječma hladnom plazmom u vodi, zrna ječma uzgojena su na filter papiru (Slika 9) dimenzija 15 x 40 cm i u Petrijevim zdjelicama na agaru (Slika 8). Uzorak od 25 sjemenki ječma poredan je na filter papir i umotan na način da je svako zrno odvojeno od onog pored sebe slojem filter papira. Filter papir sa sjemenkama postavljen je u Erlenmayerovu tikvicu i zaštićen plastičnom vrećicom. U svaku Petrijevu zdjelicu smješteno je ukupno 14 zrna ječma, poredanih u 2 reda po 7 zrna. Ječam je u oba slučaja uzgojen u laboratorijskom inkubatoru na 20 °C ± 1 °C kroz 5 dana. Kroz navedeni period zrna su tretirana plazmom aktiviranom vodom. Dio uzoraka najprije je izložen hladnom stres testu stavljanjem u frižider na + 4 °C kroz 3 dana, a potom premješten u laboratorijski inkubator na 20 ± 1 °C.

Kao slijepa proba koristila su se zrna ječma navodnjavana netretiranom deioniziranom vodom. Slijepa proba provedena je u oba slučaja inkubacije.



Slika 7. Uzgoj rotkvice na agaru
(*vlastita fotografija*)



Slika 8. Uzgoj ječma na agaru
(*vlastita fotografija*)



Slika 9. Uzgoj ječma na filter papiru
(*vlastita fotografija*)

3.2.3. Tretman uzoraka hladnom plazmom u hibridnom reaktoru

Za generiranje hladne plazme korišten je pulsni visokonaponski generator prikazan na Slici 10 (Spellman, UK). Strujni krug se sastoji od visokonaponskog napajanja, elektrolitskog kondenzatora kapaciteta 0,75 nF, serijski spojenih otpornika od ukupno 9,5 M Ω otpora,

rotirajuće sklopke tzv. „ spark – gap“ komore spojene na elektromotor s regulatorom frekvencije, te kontrolne jedinice napajanja. Napon je mjeran naponskom sondom Tektronix P6015A spojenom na osciloskop Hantek DS05202BM. Hibridni plazma reaktor ukupnog je volumena 300 mL, radnog volumena 200 mL, s gumenim čepom i prilagođenim otvorima za elektrode i upuhivanje plinova. Prilikom tretmana kroz visokonaponsku elektrodu- iglu od nehrđajućeg čelika (Microlance TM 3,81 cm), koja je postavljena s donje strane reaktora, upuhivani su plinovi argon i dušik protoka 6 L min^{-1} . Ostali parametri procesa su: pozitivni polaritet, 25-30 kV, frekvencija 90 Hz. S gornje strane reaktora nalazi se elektroda za uzemljenje od nehrđajućeg čelika, a udaljenost između elektroda je 1,5 cm. Ovaj tip reaktora omogućuje pojavu pražnjenja na vrhu same elektrode koja je uronjena u tretiranu tekućinu te preko mjehurića upuhivanog plina koji se formiraju na površini tekućine. Prethodno pripremljene sjemenke ječma sa 100 mL deionizirane vode podvrgnute su 10-minutnom tretmanu visokog naponskog pražnjenja pri sobnoj temperaturi. Proces se ponovio dva puta jer su se kao radni plinovi koristili argon i dušik. Plinovi su 99,99 % čistoće (Messer Croatia, Hrvatska). Opisani proces ponovljen je i s uzorkom rotkvice na identičan način. Tretirana voda je nakon tretmana odvojena od sjemenki te čuvana u frižideru na $+4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

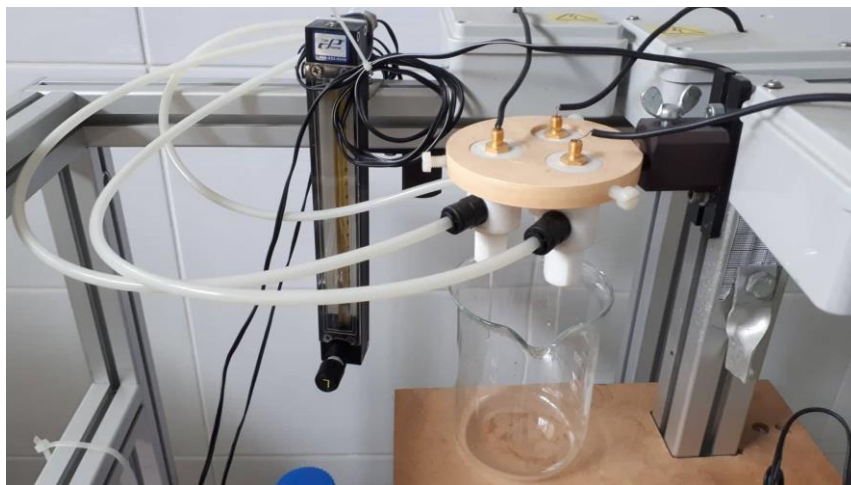


Slika 10. Hibridni plazma reaktor (*vlastita fotografija*)

3.2.4. Tretman uzoraka atmosferskom plazmom JET

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je atmosferska plazma JET s 3 elektrode (Slika 11). Tri kapilarne staklene elektrode duljine 7,5 cm s unutarnjim promjerom od 0,1 cm pričvršćene

su na teflonsko kućište. Bakrena cjevčica smještena unutar staklene elektrode promjera je 100 μm te je pričvršćena na izvor visokog napona. Snaga svakog izvora iznosi 4W dajući ukupnu snagu od 12 W za 3 elektrode. Kao radni plin koristili su se argon i dušik 99,99 % čistoće (Messer Croatia, Hrvatska) te su pri protoku od 70 L h⁻¹ upuhivani u uzorak deionizirane vode. Uzorci (100 mL) deionizirane vode s zrnima ječma, odnosno sjemenkama rotkvice tretirani su 15 minuta pri sobnoj temperaturi.

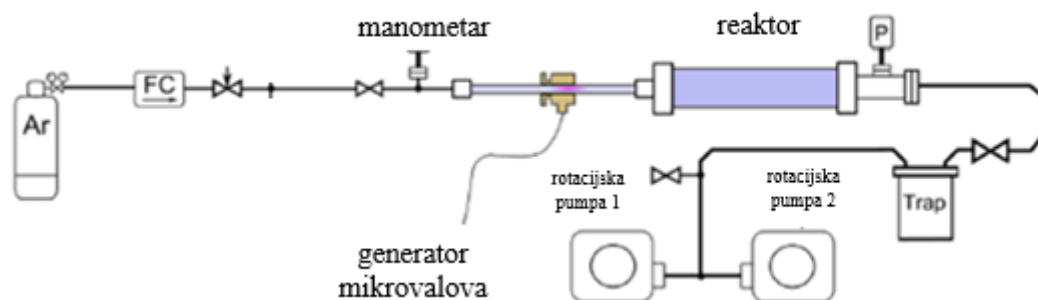


Slika 11. Jet plazma reaktor (*vlastita fotografija*)

3.2.5. Tretman uzoraka modificiranom hladnom plazmom mikrovalovima

Sustav modificirane hladne plazme generirane mikrovalovima sastoji se od kvarcne cijevi unutarnjeg promjera 4 mm, vanjskog 6 mm i dužine 50 cm priključene na procesnu komoru unutarnjeg promjera 44 mm (Slika 12). Kvarcna cijev unutar surfatrona nalazi se na udaljenosti od 16,5 mm od otvora surfatrona. Berzeliusova tikvica volumena 20 mL postavljena je na udaljenosti od 5,5 mm od kraja kvarcne cijevi tj. izvora plazme. Samo pražnjenje mikrovalovima ostvaruje se pomoću surfatrona (Sairem, Surfatron 80) gdje se generiraju elektromagnetski valovi. Rotacijskom pumpom uz regulaciju osiguran je protok plinova. Kao radni plinovi korišteni su argon protoka 1500 L min⁻¹ i smjesa argona i zraka protoka 2000 L min⁻¹. Ulazna snaga izvora pražnjenja iznosi 25 W, a mikrovalnog pražnjenja maksimalno do 1W. Time se osigurava da pri različitim snagama i protocima plina, formirana plazma ostvari

dovoljan broj kontakata s površinom vode. Uzorci (100 mL) deionizirane vode s zrnima ječma, odnosno sjemenkama rotkvice tretirani su 10 minuta pri sobnoj temperaturi.



Slika 12. Shema reaktora modificirane plazme mikrovalovima (Szöke i sur., 2017)

3.2.6. Označavanje uzoraka

U Tablici 1 prikazana je metodologija označavanja uzoraka. Korištene skraćenice opisuju vrstu plazma tretmana i korišteni radni plin. Dodatno je naznačeno radi li se o hladnom stres testu i/ili slijepoj probi.

Tablica 1. Metodologija označavanja uzoraka

Vrsta tretmana	oznaka
jet plazma; radni plin argon	<i>jet Ar</i>
hibridni reaktor (HVED plazma); radni plin argon	<i>HR Ar</i>
hibridni reaktor (HVED plazma); radni plin dušik	<i>HR N2</i>
mikrovalna plazma; radni plin argon+ zrak	<i>MP Ar+Zr</i>
mikrovalna plazma; radni plin argon	<i>MP Ar</i>
slijepa proba	<i>SP</i>
hladni stres test	<i>CT</i>

3.2.7. Određivanje fizikalno-kemijskih parametara u plazmom aktiviranoj vodi

a) Određivanje pH vrijednosti

Vrijednost pH netretirane i deionizirane vode podvrgnute postupku visokonaponskog pražnjenja određena je pomoću digitalnog pH metra. Mjerenje je provedeno uranjanjem prethodno kalibrirane elektrode u uzorak. Nakon stabilizacije očitana je pripadajuća vrijednost na zaslonu uređaja.

b) Određivanje električne vodljivosti

Električna vodljivost netretirane i plazmom aktivirane vode je određena pomoću konduktometra. Mjerenje je provedeno uranjanjem prethodno kalibrirane elektrode u uzorak te je nakon stabilizacije očitana je pripadajuća vrijednost na zaslonu uređaja.

c) Određivanje temperature

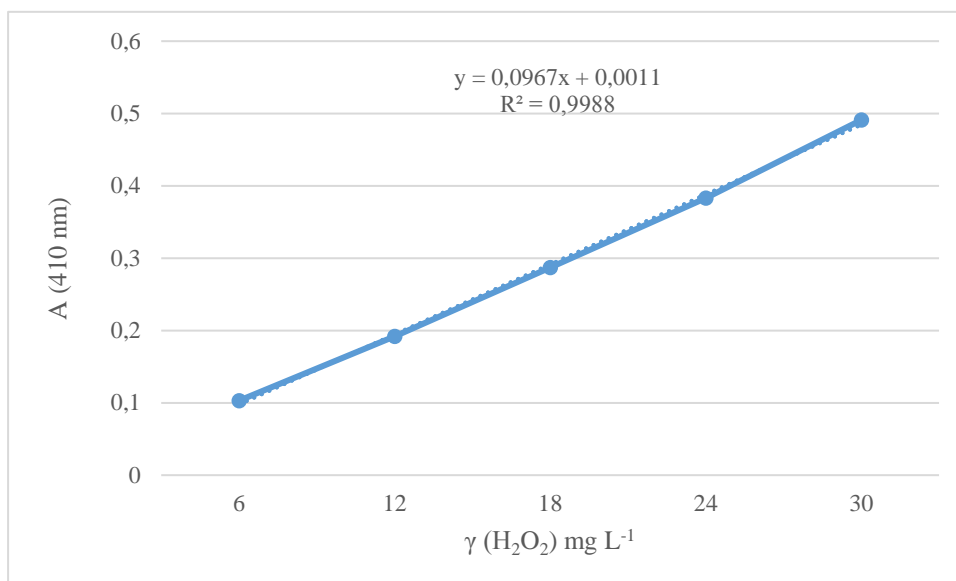
Temperatura je u netretiranoj i plazmom aktiviranoj vodi izmjerena pomoću digitalnog infracrvenog termometra. Mjerenje je provedeno pozicioniranjem termometra iznad uzorka te očitanjem vrijednosti na zaslonu uređaja.

d) Određivanje nitrita i nitrata

Prije i neposredno nakon tretmana hladnom plazmom, određeni su radikali, odnosno spojevi nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-). Koncentracija nitrita i nitrata određena je metodom uranjanja indikatorskih listića (Quantofix Nitrate / Nitrite test strips, Macherey-Nagel Germany).

e) Određivanje vodikova peroksida

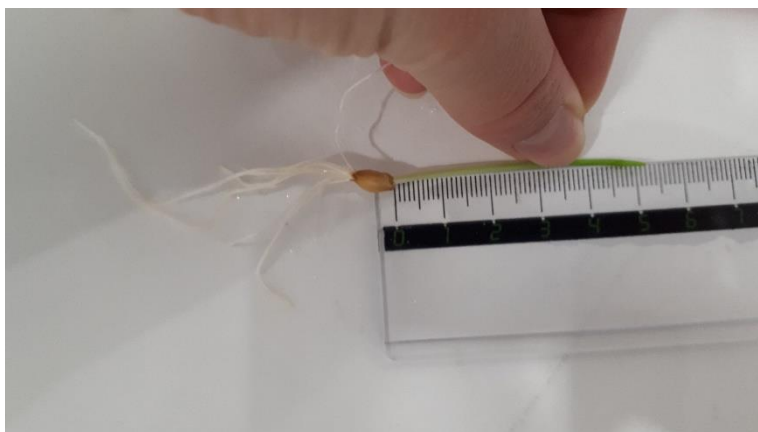
Koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) u plazmom aktiviranoj vodi određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 410 nm. Titanov reagens i uzorak su pomiješani u omjeru 1:2 mL. Iz baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji vodikovog peroksida očita se koncentracija vodikova peroksida izražena u mg L^{-1} (Slika 13). Kao slijepa proba koristila se destilirana voda.



Slika 13. Baždarni dijagram za određivanje vodikovog peroksida

3.2.8. Metoda praćenja klijavosti

Nakon provedenog procesa izlaganja plazmom aktiviranoj vodi i inkubacije zrna ječma, odnosno sjemena rotkvice, proveden je proces praćenja klijavosti. U svrhu praćenja klijavosti izmjerena je duljina klice i korijena ječma te duljina stabljike i korijena rotkvice (Slika 14). Određen je postotak klijavosti. Na temelju dobivenih rezultata donijet je zaključak o utjecaju pojedinih plinova i metoda uzgoja na klijavost ječma i rotkvice.



Slika 14. Postupak mjerenja klice i korijena ječma (*vlastita fotografija*)

3.2.9. Određivanje ukupnog klorofila

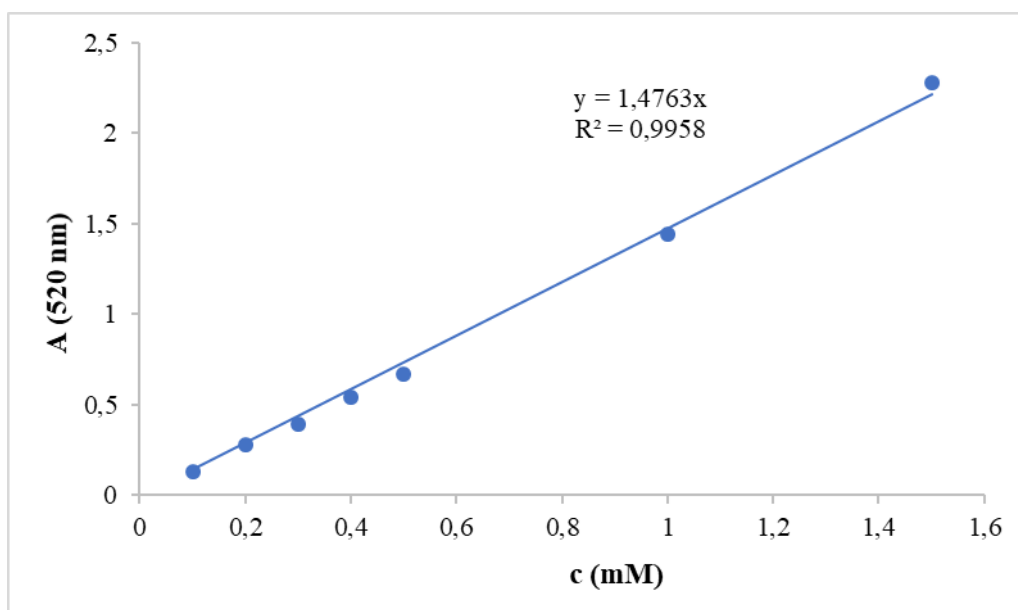
Određivanje ukupnog klorofila temelji se na ekstrakciji u 80 %-tnom acetonu prema modificiranoj metodi Ghnaya i sur. (2009). Nakon pet dana inkubacije na 20 °C, odvoji se stabljika rotkvice, odnosno klica ječma. U tikvicu se odvaže 0,5 g usitnjenog uzorka uzorka i ekstrahira s 10 mL 80 %-tnog acetona. Uzorci se dodatno usitne na laboratorijskom homogenizatoru T18 basic, ULTRA-TURRAX 30 sekundi. Homogenizirani uzorci centrifugiraju (Rotina 380 R) se 15 minuta na 10 °C i 2 500 okretaja u svrhu postizanja bolje separacije i izolacije klorofila. Supernatant se dekantira i profiltrira kroz mini filter. Mjerenjem apsorbancije na 663 nm (maksimum apsorbancije za klorofil a) i 645 nm (maksimum apsorbancije za klorofil b) izračuna se ukupni sadržaj pigmenta klorofila izraženih u mg/100 g prema formuli:

$$\text{Ukupni klorofil (mg (100 g}^{-1}\text{))} = 7,15 * A_{663} + 18,71 * A_{645} \quad [11]$$

Kao slijepa proba koristi se aceton.

3.2.10. Ekstrakcija i određivanje sadržaja slobodnog prolina

Ukupan sadržaj slobodnog prolina određen je prema modificiranoj metodi Bates i sur. (1973). Za određivanje prolina najprije je proveden postupak ekstrakcije. Odvojene stabljike rotkvice, odnosno klice ječma usitnjene su u porculanskom tarioniku, uz dodatak tekućeg dušika, do suhog praha. Uzorak od 10 mg liofiliziranog uzorka ekstrahiran je u 1 mL 70 %-tnog etanola. Postupak se provodio u triplicatu. Pripremljeni uzorak homogeniziran je 30 sekundi brzinom 30 okretaja/sekundi na homogenizatoru MM 400, a potom u ultrazvučnoj kupelji 8 minuta. Uzorci se nakon 10 minutne rotacije na rotatoru (Bio RS-24, Mini-Rotator, bioSan), centrifugiraju (5424 R, Eppendorf (Hamburg, Njemačka) 5 minuta na 23 °C i 12 000 okretaja. Volumen 100 µL supernatanta pomiješan je s 1 mL radne otopine u Eppendorf epruveti i vorteksiran. Slijepa proba pripremljena je u duplikatu, miješanjem 100 µL 70 %-tnog etanola i 1 mL radne otopine. Pripremljeni uzorci zagrijani su u termo bloku (Block Heater, Sample Concentrator, SBHCONC/1) 20 minuta na 95 °C. Ohlađenim uzorcima na spektrofotometru BioSpec-1601 E, DNA/Protein/Enzyme Analyzer određena je apsorbancija na valnoj duljini od 520 nm. Ukupni sadržaj prolina očitao je iz baždarnog dijagrama. Baždarni dijagram konstruiran je koristeći L-prolin kao standard prikazujući ovisnosti apsorbancije o koncentraciji prolina po suhoj tvari izraženoj u mM (Slika 15).



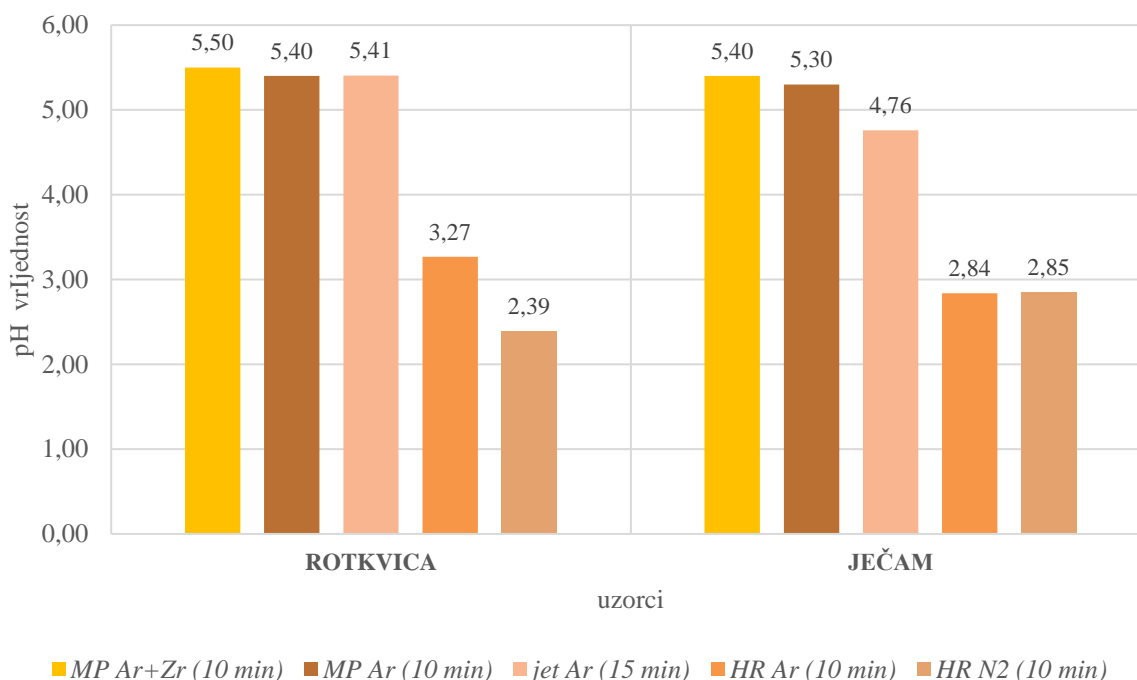
Slika 15. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji prolina izraženih u mM

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je usporediti utjecaj plazmom aktivirane vode (PAW) dobivene visokonaponskim plazma pražnjenjem u tri različita sustava na klijavost i razvoj ukupnog sadržaja klorofila i slobodnog prolina u uzorcima ječma i rotkvice. Biljni materijal je podvrgnut tretmanu hladnom plazmom u vodi (direktni) i kasnije kontinuirano tretiran PAW vodom dobivenom plazma tretmanima (HVED plazma, plazma jet i mikrovalna plazma). Uzorci ječma i rotkvice tretirani su PAW vodom generiranom u hibridnom reaktoru (HVED plazma) s argonom i dušikom kao radnim plinovima, plazmom jet s argonom kao radnim plinom i mikrovalnom plazmom s argonom i smjesom argona i zraka kao radnim plinom. PAW voda dobivena mikrovalovima dostavljena je sa Wigner Research Centre for Physics iz Budimpešte, Mađarska. Ispitan je fizikalno – kemijski sastav PAW vode dobivene različitim plazma tretmanima. U slučaju tretmana sjemenki rotkvice i ječma mikrovalnom plazmom, usporedilo se kako na klijavost, sadržaj klorofila i slobodnog prolina utječe stres uzrokovan niskom temperaturom. Dio uzoraka pohranio se najprije u frižider pa se nakon tri dana tretirao PAW vodom. Kao slijepa proba koristila se destilirana voda koja nije podvrgnuta hladnom stres testu kao ni plazma tretmanu. Dodatno je uspoređeno kako metoda uzgoja ječma na filter papiru i agaru utječe na klijavost te razvoj klice i korijena. U Tablici 1. prikazana je metodologija označavanja uzoraka.

4.1. Utjecaj plazma tretmana na fizikalno-kemijska svojstva plazmom aktivirane vode

4.1.1. pH vrijednost



Slika 16. Prikaz pH vrijednosti PAW vode u ovisnosti o vrsti i duljini tretmana hladnom plazmom u uzorku rotkvice i ječma

Nakon tretmana hladnom plazmom, neovisno o sustavu generiranja kao i radnom plinu, zabilježen je pad pH-vrijednosti (Slika 16) PAW vode. Vrijednost pH destilirane vode (kontrola) je iznosila 6,27, a nakon desetominutnog tretmana mikrovalnom plazmom s argonom i zrakom kao radnim plinom pala je na 5,50 (rotkvica), odnosno na 5,40 (ječam). U slučaju tretmana mikrovalnom plazmom i argonom kao radnim plinom, također je zabilježen pad pH vrijednosti. U hibridnom reaktoru (HVED plazma) s argonom kao radnim plinom pH vrijednost spustila se na 3,27 u slučaju tretmana vode sa sjemenkama rotkvice, odnosno na 2,84 sa sjemenkama ječma. Kod PAW vode dobivene nakon 15 minuta tretmana plazmom jet zabilježen je pad pH vrijednosti na 5,41 u slučaju tretmana s rotkvicom, odnosno na 4,76 u slučaju tretmana s ječmom. Uspoređujući plazma tretmane, može se zaključiti kako generiranjem plazme u hibridnom reaktoru dolazi do zamjetnijih promjena pH vrijednosti PAW vode u kiselo područje.

Uspoređujući ovisnost korištenog radnog plina kod generiranja HVED plazme, može se zaključiti kako i argon i dušik uzrokuju podjednak pad pH vrijednosti PAW vode. Kod tretmana vode sa sjemenkama rotkvice vrijednost pH je niža prilikom korištenja dušika kao radnog plina (2,39) dok je kod tretmana sa sjemenkama ječma pH vrijednost gotovo jednaka, neovisno o radnom plinu. Isti trend uočen je kod tretmana mikrovalnom plazmom s argonom i smjesom argona i zraka kao korištenih radnih plinova. Poznato je da se visokonaponskim pražnjenjem formiraju reaktivne vrste kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), nitriti (NO_2^-) i nitrati (NO_3^-) koje uzrokuju pad pH vrijednosti, odnosno zakiseljavaju otopinu, u ovom slučaju vodu, budući da se formira dušična kiselina iz reaktivnih dušikovih spojeva (Oehmigen i sur., 2010). Lukes i sur. (2014) ističu sinergistički učinak kiselog pH i formiranja reaktivnih vrsta na antimikrobna svojstva plazmom aktivirane vode. Kod PAW vode dobivene mikrovalnom plazmom pH vrijednost ovisi o omjeru nitrita i nitrata. Što je veća koncentracija formiranih nitrata, niža će biti pH vrijednost PAW vode. Dodatna prednost PAW vode dobivene mikrovalnom plazmom leži u tome što za njeno generiranje nije potrebna elektroda pa se time izbjegava onečišćenje nanočesticama s elektroda (Kutasi i sur., 2019).

4.1.2. Električna vodljivost i temperatura



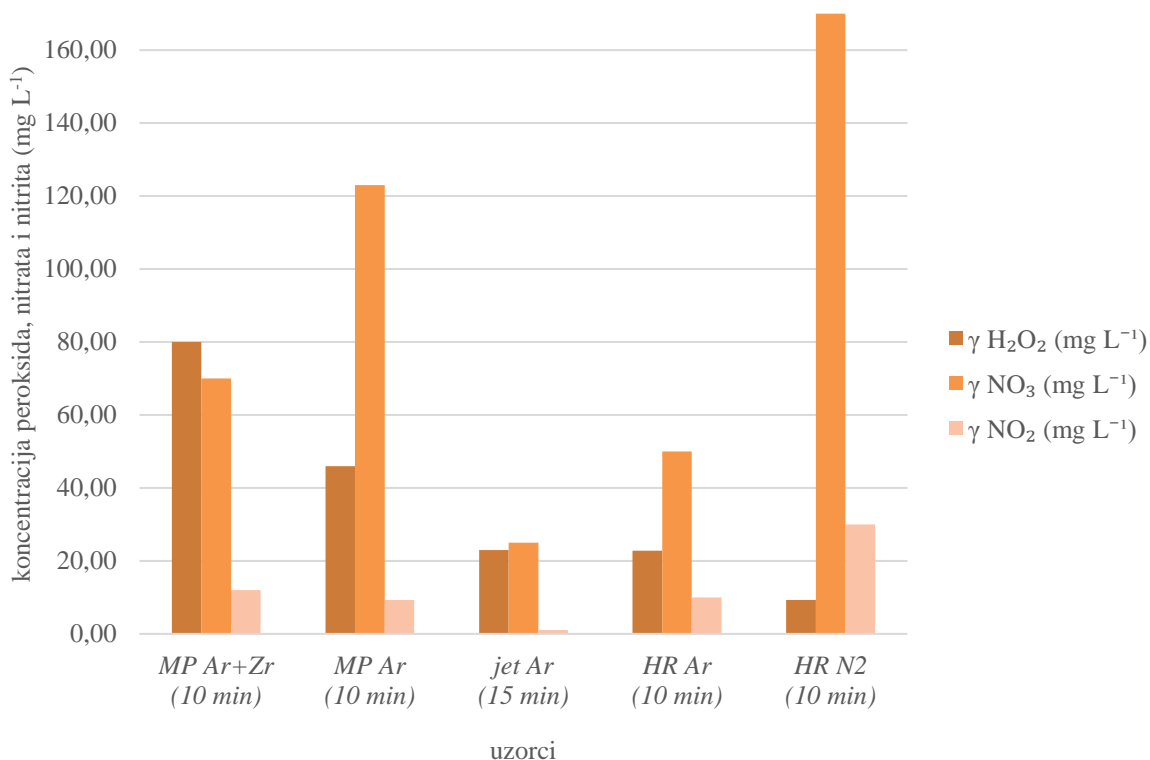
Slika 17. Prikaz vrijednosti temperature i električne vodljivosti PAW vode u ovisnosti o vrsti tretmana hladnom plazmom i tretiranom uzorku

Nakon provedenog tretmana, bilo u hibridnom reaktoru ili plazmom jet, i temperatura i električna vodljivost PAW vode su porasle. Uspoređujući vrstu plazma tretmana, iz Slike 17 može se zaključiti kako je nakon desetominutnog tretmana u hibridnom reaktoru (HVED plazma) temperatura porasla više nego kod tretiranja plazmom jet kroz petnaest minuta. Najveći porast temperature zabilježen je nakon tretmana vode sa sjemenkama rotkvice HVED plazmom s argonom kao radnim plinom, a najmanji porast temperature nakon tretmana sjemenki ječma plazmom jet s argonom kao radnim plinom. S druge strane, porast električne vodljivosti plina obrnuto je proporcionalan porastu temperature. Najmanji porast električne vodljivosti zabilježen je kod tretmana vode sa sjemenkama rotkvice HVED plazmom i argonom kao radnim plinom, a najveći porast električne vodljivosti kod istog tretmana plazmom, ali s dušikom kao radnim plinom. Porast električne vodljivosti može se pripisati korištenom radnom plinu budući da dušik, ili plin koji sadrži dušik u svom sastavu, podvrgavanjem

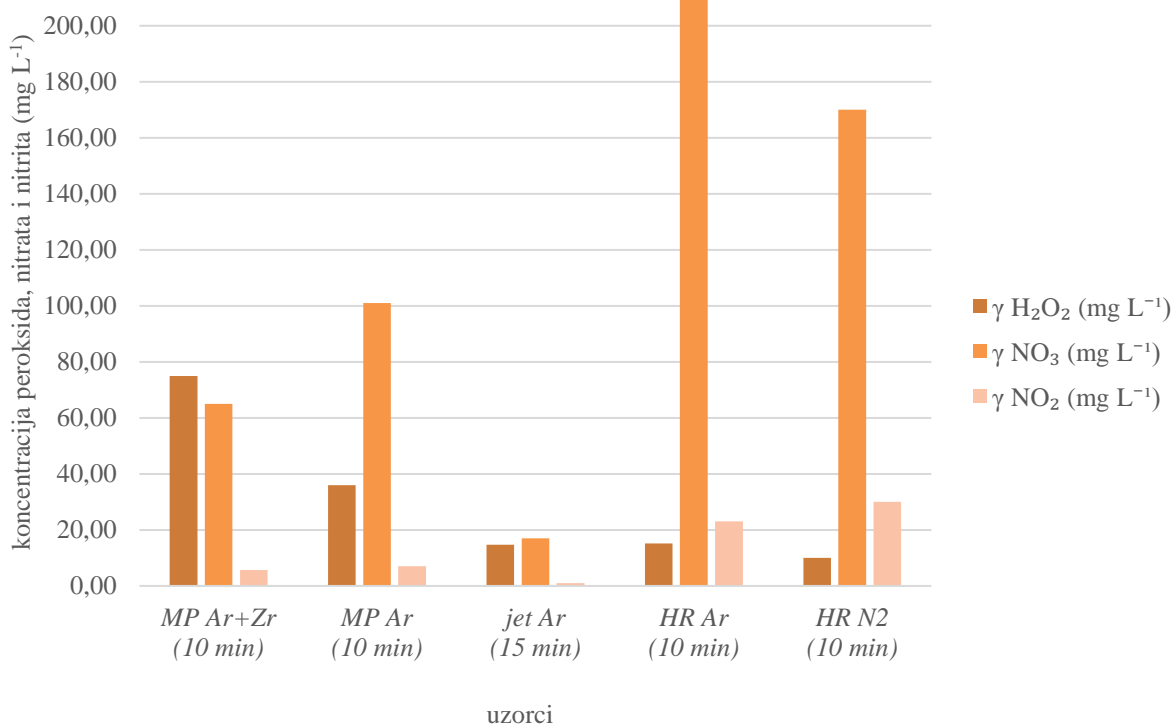
visokonaponskom pražnjenju formira dovoljno energije za disocijaciju molekula dušika sve do dušikovih radikala. Budući da se reakcija odvija u vodi, dolazi do reakcije s kisikom i formiranja kisikovih, dušikovih, vodikovih i hidroksidnih radikala koji doprinose povećanju električne vodljivosti (Jiang i sur., 2014a). Ma i sur. (2015) također su zabilježili značajan porast električne vodljivosti PAW vode nakon tretmana plazmom jet s argonom i kisikom kao radnim plinom.

Uspoređujući tretman HVED plazmom ovisno o radnom plinu, može se zaključiti kako vrsta radnog plina ne utječe znatno na vrijednost temperature. U oba slučaja, temperatura je bila približno jednaka. Iako se radi o hladnoj plazmi, zbog visokonaponskog pražnjenja kojim se fomira, dolazi do formiranja mjehurića pare i električnog pražnjenja unutar tog mjehurića što posljedično dovodi do lokalnih povišenja temperature (Bruggeman i sur., 2007). Povišenjem temperature potiče disocijaciju molekula i stvaranje radikala (Jiang i sur., 2014a).

4.1.3. Slobodni radikali



Slika 18. Određivanje vodikova peroksida, nitrata i nitrita u PAW vodi s uzorkom rotkvice



Slika 19. Određivanje vodikova peroksida, nitrata i nitrita u PAW vodi s uzorkom ječma

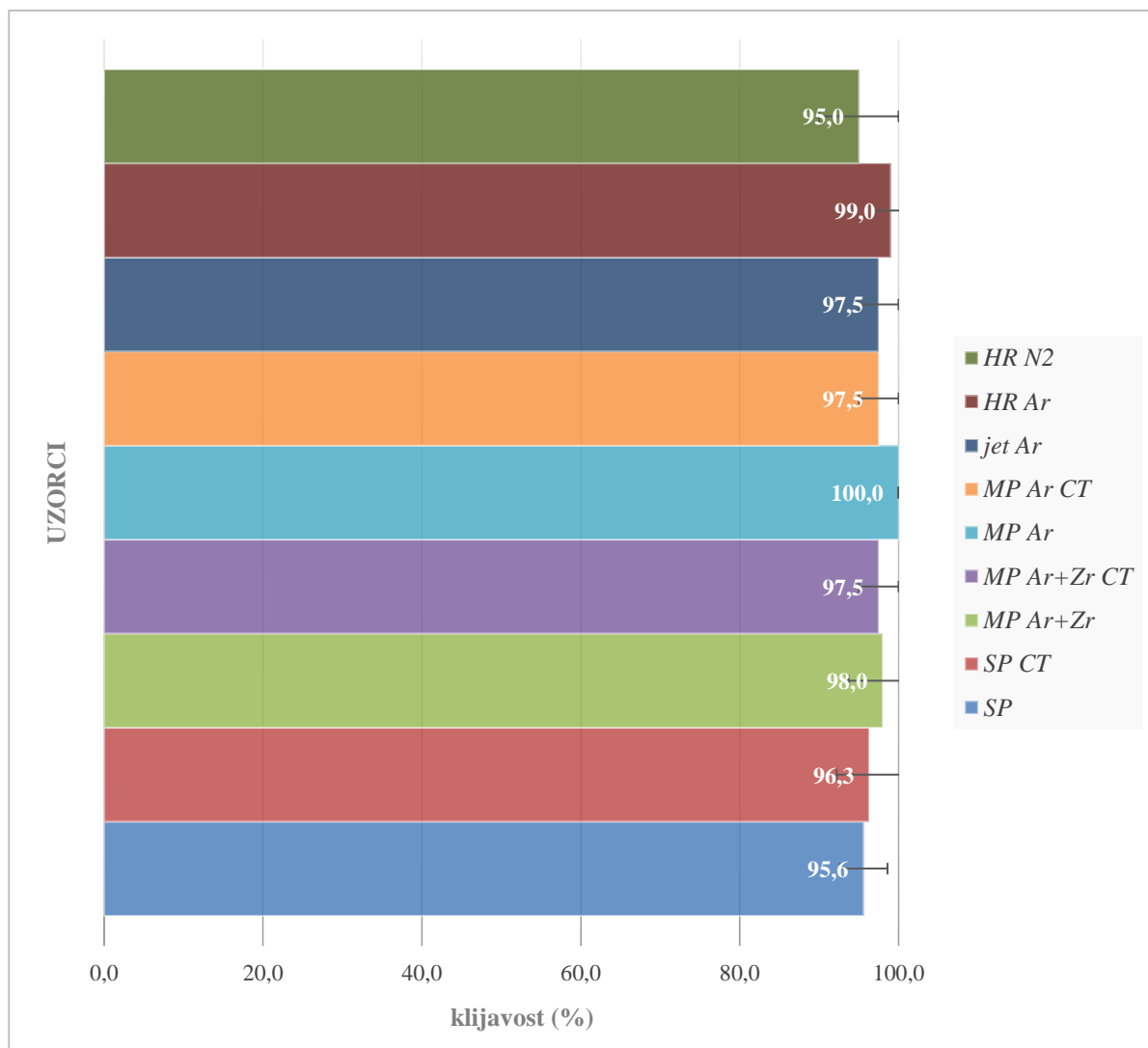
Iz rezultata prikazanih na Slici 18 i Slici 19 može se zaključiti kako nakon tretmana hladnom plazmom dolazi do porasta koncentracije slobodnih radikala. Neposredno nakon tretmana HVED plazmom PAW voda sadrži najveću koncentraciju formiranog nitrata u slučaju tretmana vode sa sjemenkama rotkvice i sjemenkama ječma. Najveća koncentracija vodikova peroksida izmjerena je u uzorcima rotkvice i ječma nakon tretmana mikrovalnom plazmom.

Uspoređujući vrstu plazma tretmana s argonom kao radnim plinom, neposredno nakon tretmana rotkvice mikrovalnom plazmom formirala se puno veća koncentracija NO₃⁻ radikala (123,00 mg L⁻¹) u odnosu na koncentraciju nitrata formiranih nakon tretmana HVED plazmom (50,00 mg L⁻¹) i plazmom jet (rotkvice 25,00 mg L⁻¹). Kod tretmana ječma, najviša koncentracija NO₃⁻ izmjerena je nakon tretmana HVED plazmom (210,00 mg L⁻¹), a najniža također nakon tretmana plazmom jet (17,00 mg L⁻¹). Promatrajući HVED plazmu u ovisnosti o radnom plinu, PAW voda s uzorkom rotkvice podvrgnuta tretmanu s dušikom kao radnim plinom sadrži 3,4 puta veću koncentraciju NO₃⁻ spojeva od koncentracije NO₃⁻ spojeva formiranih u hibridnom reaktoru s argonom kao radnim plinom što nije slučaj kod vode tretirane sa sjemenkama ječma gdje je koncentracija formiranog NO₃⁻ radikala veća neposredno nakon tretmana u hibridnom reaktoru s argonom kao radnim plinom (210,00 mg L⁻¹). Prilikom

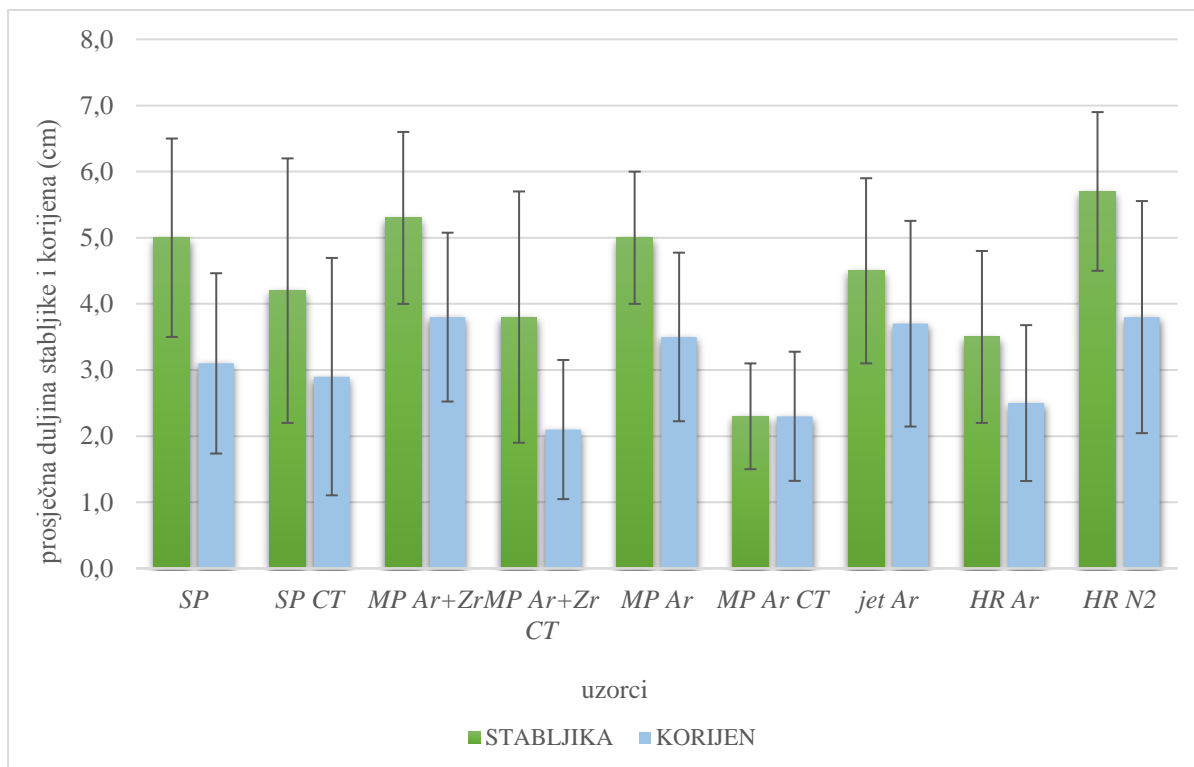
tretmana uzoraka ječma i rotkvice mikrovalnom plazmom, u oba slučaja zabilježena je viša koncentracija formiranih NO_3^- radikala prilikom korištenja argona kao radnog plina. U svim sustavima, koncentracija NO_2^- je vrlo niska, gotovo neznčajna. Ta odsutnost NO_2^- u usporedbi s NO_3^- može se objasniti činjenicom da je transformacija NO_2^- u NO_3^- ubrzana u kiselim uvjetima (Oehmigen i sur., 2010). Dobiveni rezultati poklapaju se s rezultatima Sivachandiranab i Khacefa (2017) koji su istraživali utjecaj PAW vode na klijanje rotkvice. U svojem istraživanju također su izmjerili najveću koncentraciju NO_3^- spojeva nakon plazma tretmana visokonaponskim pražnjenjem. Za anorganske nitrite, nitrate i druge dušične spojeve poznato je da zaustavljaju dormanciju i potiču klijanje sjemena u mnogim vrstama biljaka (Širova i sur., 2011). Utvrđeno je da je NO_3^- , kao najvažniji oblik dušika, jedan od osnovnih hranjivih sastojaka biljke budući da je sastojak aminokiselina, proteina, klorofila i drugih metabolita i staničnih komponenata (Sivachandiranab i Khacef 2017).

Koncentracija vodikova peroksida najveća je kod tretmana mikrovalnom plazmom. U destiliranoj vodi koja se koristila kao kontrola koncentracija vodikova peroksida iznosila je $3,19 \text{ mg L}^{-1}$, a nakon tretmana mikrovalnom plazmom i argonom i zrakom kao smjesom plinova korištenim kao radnim plinom porasla je na $80,00 \text{ mg L}^{-1}$ u uzorku rotkvice, odnosno na $75,00 \text{ mg L}^{-1}$ u uzorku ječma. Veća koncentracija vodikova peroksida formirana je mikrovalnom plazmom s korištenim argonom i zrakom kao radnim plinom nego samo argonom. Tretmanom PAW vode plazmom jet koncentracija vodikova peroksida je porasla na $22,95 \text{ mg L}^{-1}$ u slučaju sa sjemenkama rotkvice, odnosno na $14,70 \text{ mg L}^{-1}$ u slučaju tretmana sa sjemenkama ječma. Nakon tretmana HVED plazmom i argonom kao radnim plinom, koncentracija vodikova peroksida PAW vode tretirane sa sjemenkama rotkvice se popela na $22,78 \text{ mg L}^{-1}$, a vode tretirane sa sjemenkama ječma na $15,14 \text{ mg L}^{-1}$. Uloga reaktivnih kisikovih spojeva je dvojaka. Reaktivni kisikovi spojevi vrlo su bitni i formiraju se tijekom različitih faza razvoja sjemena, uključujući embriogenezu, sazrijevanje sjemena i klijanje, ali ukoliko dođe do prekomjernog nakupljana, mogu izazvati oksidativno oštećenje staničnih komponenti (Širova i sur., 2011). U prihvatljivim količinama djeluju kao signalne molekule, a Bailly i sur. (2008) dokazali su da se povišenjem koncentracije ovih spojeva prekida homeostaza reaktivnih kisikovih spojeva i signalizira stanici da se prekida faza dormancije i započinje faza klijanja.

4.2. Utjecaj plazmom aktivirane vode na rast i razvoj sjemenki rotkvice i ječma



Slika 20. Prikaz kljavosti rotkvice (%) u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode



Slika 21. Prikaz prosječne duljine stabljike i korijena rotkvice u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode

Na Slici 20 prikazan je postotak klijavosti rotkvice iz kojih se može zaključiti da najveći postotak ima uzorak rotkvice tretiran PAW vodom dobivenom mikrovalnom plazmom i argonom kao radnim plinom, dok najniži postotak klijavosti ima uzorak tretiran PAW vodom aktiviranom HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom. Osim potonjeg, svi uzorci pokazuju viši postotak klijavosti u odnosu na slijepu probu. Kao slijepa proba se koristila se destilirana voda. Iako rotkvice tretirane HVED PAW vodom s dušikom kao radnim plinom pokazuje najniži postotak klijavosti, duljina razvijene stabljike i korijena (Slika 21) je najduža u usporedbi s drugim uzorcima. Najmanje razvijenu stabljiku i korijen ima uzorak rotkvice koji je podvrgnut hladnom stres testu, a potom tretiran PAW vodom aktiviranom HVED plazmom i argonom kao korištenim radnim plinom.

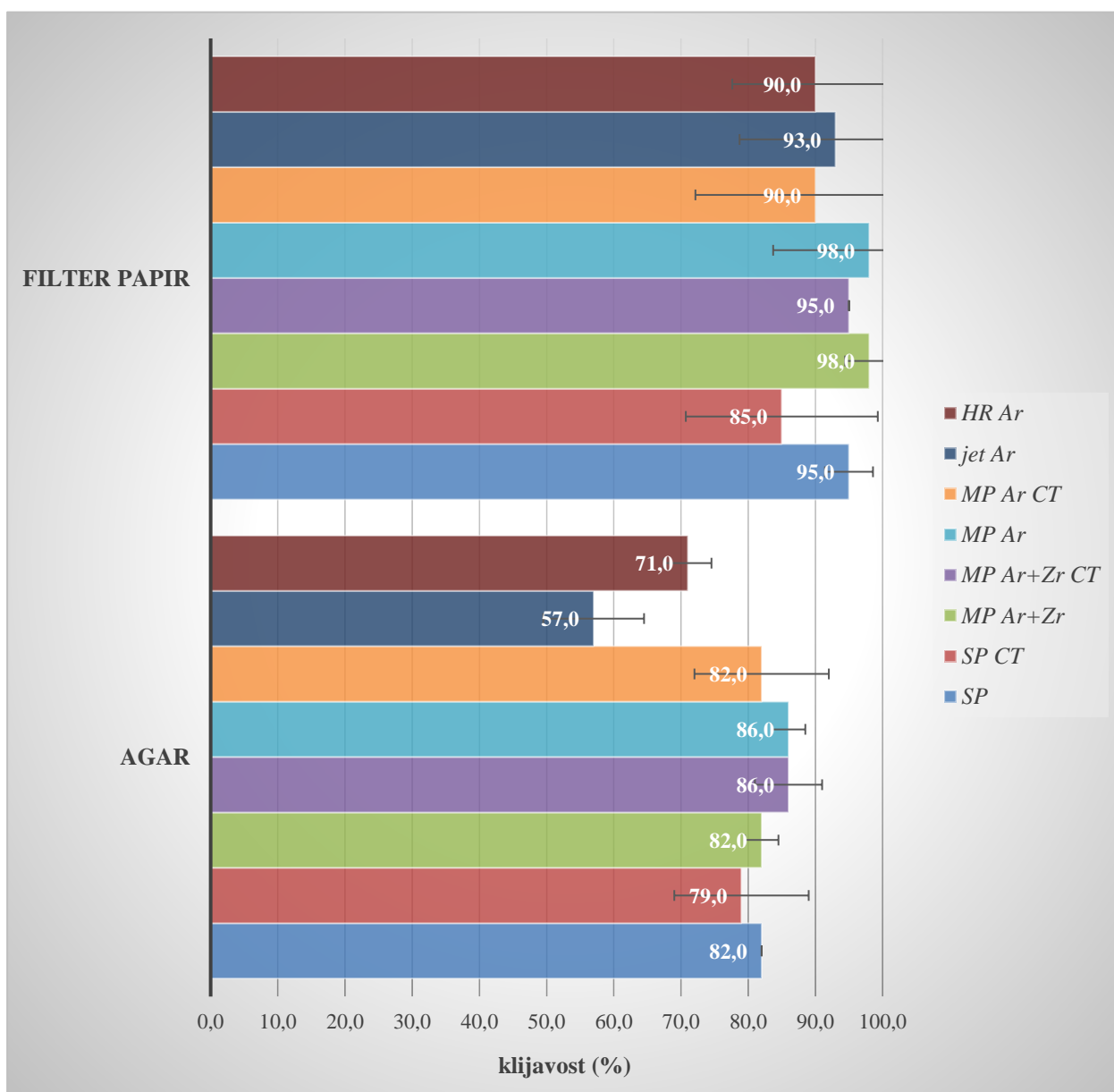
Uspoređujući postotak klijavosti ovisno o argonu kao radnom plinu, najniži postotak klijavosti rotkvice zabilježen je kod tretmana PAW vodom formiranom plazmom jet (97,5 %), nakon koje slijedi tretman HVED plazmom (99,0 %) i mikrovalnom plazmom (100,0 %). Najvišu vrijednost prosječne duljine stabljike također ima uzorak tretiran PAW vodom dobivenom mikrovalnom plazmom (5,0 cm) iza koje slijedi uzorak tretiran plazma jet PAW vodom (4,5 cm) i HVED PAW vodom (3,5 cm). Iako su u svom eksperimentu Sivachandiranab

i Khacef (2017) kao radni plin koristili zrak, duljina stabljike očitane peti dan nakon tretmana plazmom aktiviranom vodom (petnaest minuta tretmana, bez prethodnog tretmana sjemenki) iznosila je 4,6 centimetara.

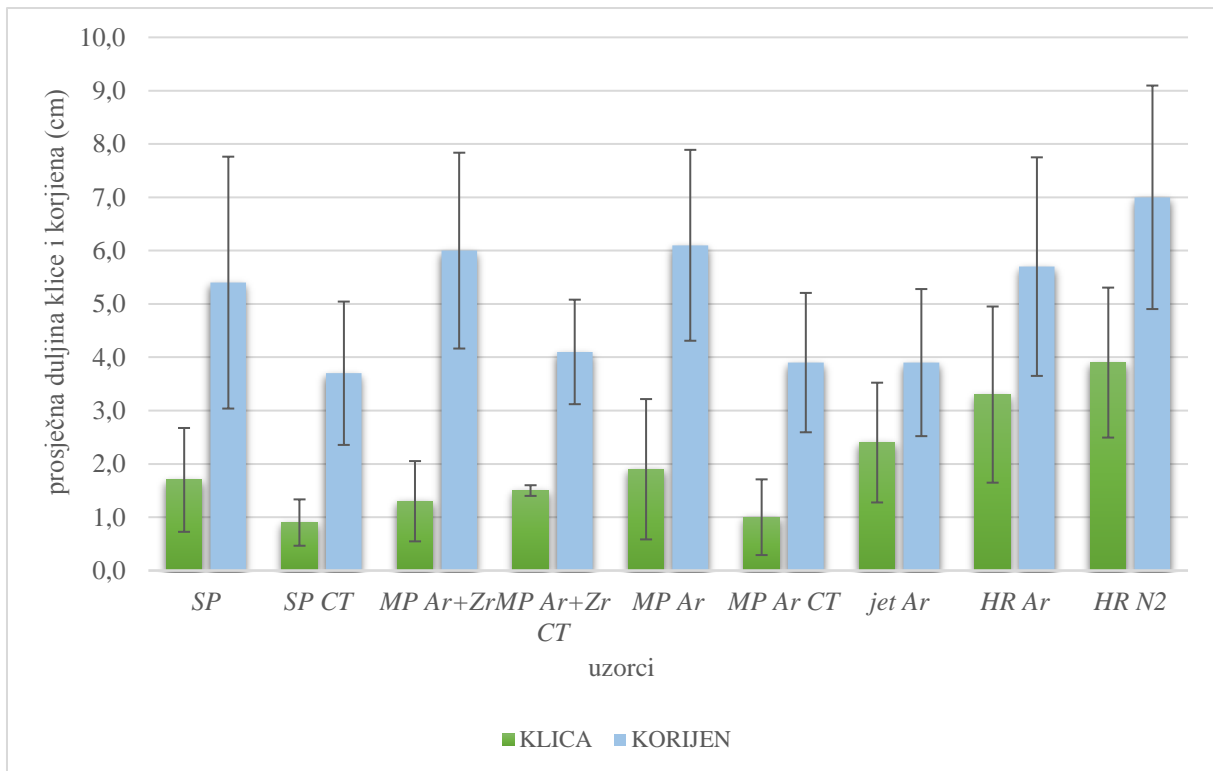
Uzorci rotkvice tretirani PAW vodom formiranom mikrovalnom plazmom s argonom i smjesom argona i zraka kao radnim plinovima, dodatno su izlagani hladnom stres testu što je rezultiralo smanjenjem postotka klijavosti sa 100,0 % na 97,5 % u slučaju argona kao radnog plina, odnosno s 98,0 % na 97,5 % u slučaju smjese argona i zraka kao radnog plina. Duljina formirane stabljike i korijena u odnosu na uzorak koji je uzgajan na sobnoj temperaturi također je niža. Formirana stabljika kod tretmana s argonom kao radnim plinom je 2,2 puta, a korijen 1,5 puta duži od one formirane nakon provedenog hladnog stres testa, dok je kod tretmana sa smjesom argona i zraka kao radnim plinom stabljika 1,4 puta, a korijen 1,8 puta duži kod uzgoja pri sobnoj temperaturi. Statističkom analizom dokazana je statistički značajna razlika u duljini stabljike ($p < 0,05$) i korijena ($p < 0,05$) uzorcima uzgojenim na sobnoj temperaturi i uzorcima prethodno podvrgnutim hladnom stres testu u slučaju tretmana s argonom kao radnim plinom. Isti trend uočen je i kod tretmana sa smjesom argona i zraka kao radnog plina za duljinu stabljike ($p < 0,05$) i za duljinu korijena ($p < 0,05$). Uspoređujući sa slijepom probom može se zaključiti kako tretman hladnom plazmom djeluje pozitivno na klijavost i formiranje stabljike i korijena u slučaju tretmana pri sobnoj temperaturi. Iako je klijavost, u slučaju prvobitno izazvanog stresa hladnoćom, u odnosu na slijepu probu veća, prosječna duljina formirane stabljike i korijena je manja. U ovom slučaju kao slijepa proba, uzorak rotkvice je najprije podvrgnut hladnom stres testu, a potom tretiran destiliranom vodom. Iz ovoga se zaključuje kako dvostruko izazvani stres (hladni stres test i stres plazma tretmanom) djeluje negativno na rast i razvoj rotkvice.

Uspoređujući vrstu plazma tretmana, mikrovalna plazma s argonom kao radnim plinom se pokazala najpogodnijom za formiranje PAW vode u svrhu poticanja procesa klijavosti, no za rast i razvoj stabljike boljom se pokazala PAW voda formirana HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom. Mogući razlog boljeg rasta i razvoja stabljike i korijena rotkvice su NO_3^- spojevi prisutni u PAW vodi dobivenoj HVED plazmom (Slika 18) koji se smatraju glavnim izvorom dušika u različitim biljnim vrstama i za koje je dokazano potiču klijanje. Također, dušikovi spojevi formirani u plazmom aktiviranoj vodi, s dušikom kao radnim plinom, zamjenjuju gnojiva (Takaki i sur., 2013). Muhammad i sur. (2010) su također dokazali kako visoke razine dušika djeluju pozitivno na klijavost i prinos rotkvice. Sivachandiranab i Khacef (2017) u svojem istraživanju dokazali su da se klijavost sjemenki rotkvice nakon

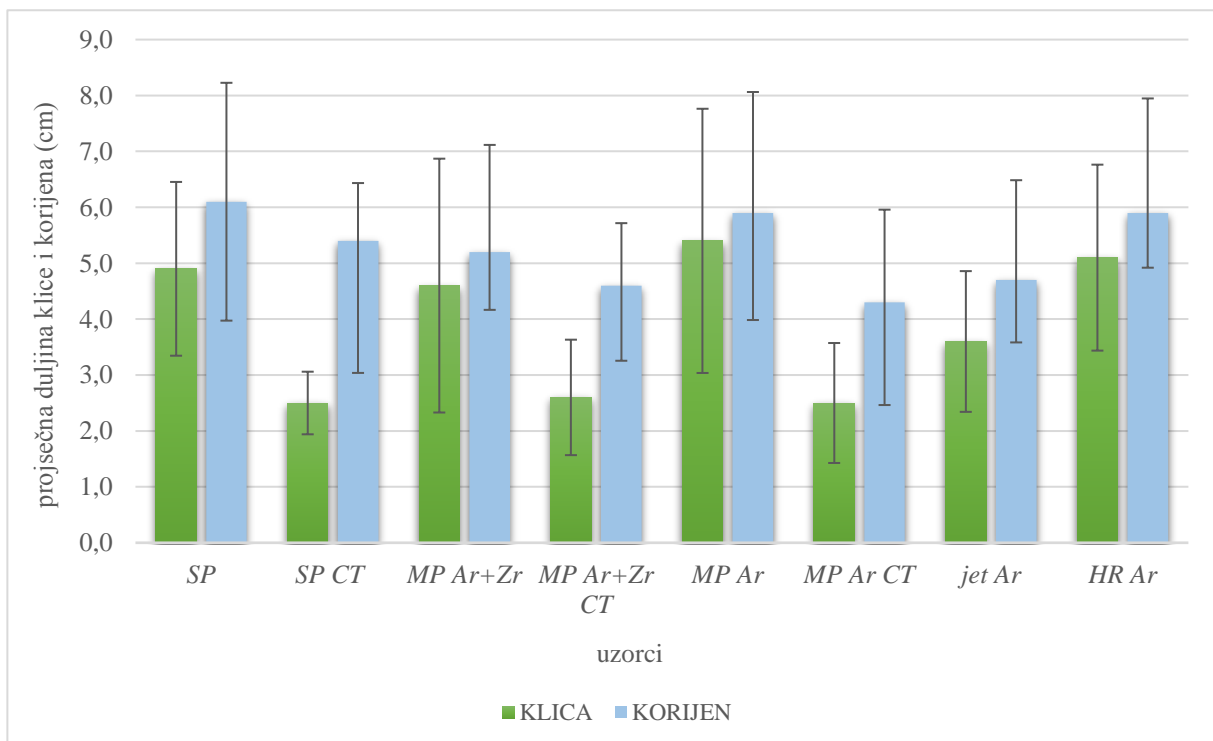
desetominutnog tretmana hladnom plazmom i tretiranjem PAW vodom narednih šest dana, povećala za 80,0 %, odnosno također su postigle stopostotnu klijavost, u odnosu na kontrolu.



Slika 22. Prikaz klijavosti (%) ječma u ovisnosti o primijenjenom PAW tretmanu



Slika 23. Prikaz prosječne duljine klice i korijena ječma uzgojenog na filter papiru u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode



Slika 24. Prikaz prosječne duljine klice i korijena ječma uzgojenog na agaru u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode

Uvidom u rezultate (Slika 22), najveći postotak klijavosti imaju uzorci ječma tretirani PAW vodom aktiviranim mikrovalovima i argonom kao radnim plinom, u oba slučaja uzgoja (filter papir i agar) u odnosu na slijepu probu. U usporedbi sa slijepom probom najmanji postotak klijavosti na filter papiru ima uzorak podvrgnut dvostrukom stresu, odnosno hladnom stres testu i plazmi formiranoj mikrovalovima s argonom kao radnim plinom, dok na agaru najmanji postotak klijavosti pokazuje uzorak tretiran plazmom jet s argonom kao radnim plinom.

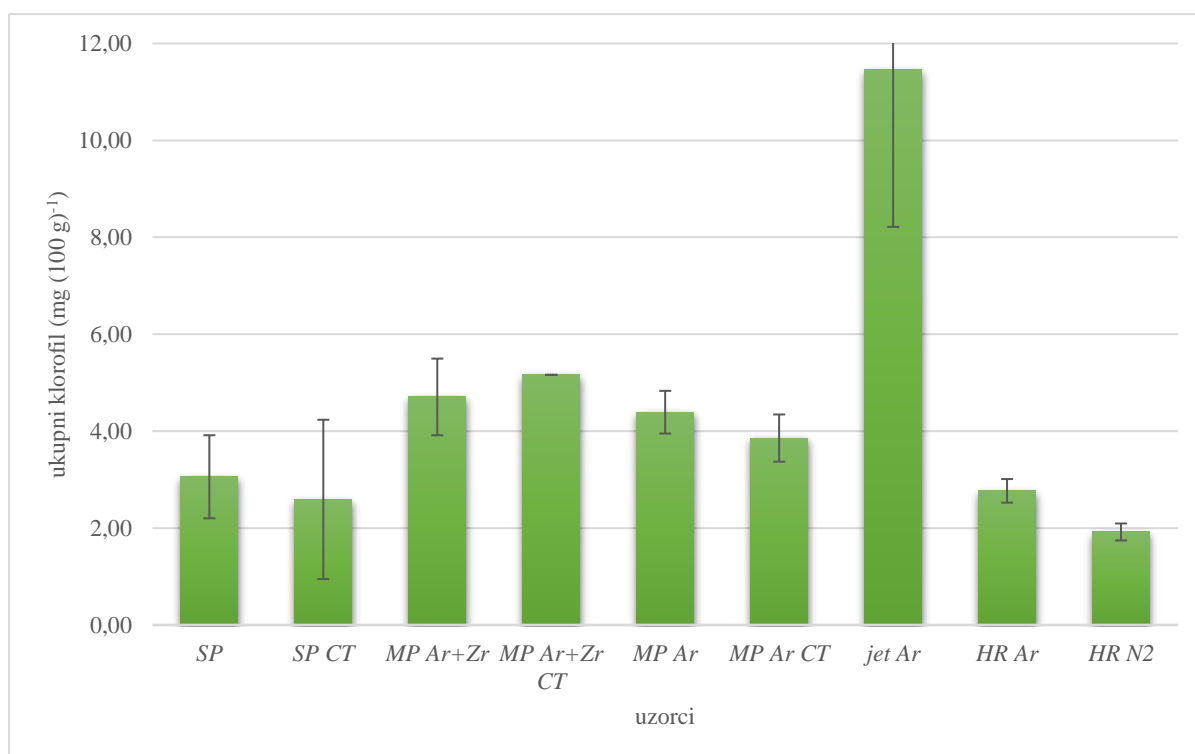
Uspoređujući način uzgoja, filter papir se u svim slučajevima pokazao boljim odabirom za ispitivanje klijavosti. Svi postoci klijavosti zabilježeni na filter papiru, u odnosu na slijepu probu, kreću se od 90,0 % na više, dok postotak klijavosti na agaru, u odnosu na slijepu probu, varira između 57,0 % i 86,0 %. Razlog tome je veća površina i međusobna odvojenost klica slojem papira pri čemu se izbjeglo međusobno interferiranje, a papir se pokazao kao dobra podloga za navodnjavanje klica vodom budući da ima dobra apsorpcijska svojstva koja su omogućila jednoliku raspodjelu vode klicama ječma. Rezultati postotka klijavosti (Slika 22) i prosječne duljine klice i korijena ječma uzgojene na filter papiru (Slika 23) i na agaru (Slika 24) obrnuto su proporcionalni. Dok je postotak klijavosti viši kod uzoraka uzgojenih na filter papiru, prosječna duljina klice i korijena ječma je viša kod uzoraka uzgojenih na agaru. Najviša vrijednost izmjerene prosječne duljine klice ječma na agaru iznosi 5,4 centimetara za uzorak ječma tretiran PAW vodom formiranim mikrovalovima i argonom kao radnim plinom, dok za isti uzorak uzgojen na filter papiru prosječna duljina klice iznosi 1,9 centimetara. Nakon statističke obrade rezultata uočena je statistički značajna razlika u duljini klice između uzoraka uzgojenih na filter papiru i agaru ($p < 0,05$).

Uspoređujući postotak klijavosti u ovisnosti o argonu kao korištenom radnom plinu, najveći postotak klijavosti ječma zabilježen je nakon tretmana PAW vodom formiranim mikrovalnom plazmom i na filter papiru (98,0 %) i na agaru (86,0 %) dok je najniži postotak klijavosti na filter papiru očitao se u uzorku tretiranom PAW vodom formiranim HVED plazmom (90,0 %) dok je na agaru najniži postotak klijavosti (57,0 %) kao i duljinu klice (3,6 cm) pokazao uzorak tretiran plazma jet PAW vodom. Razlika duljine klice ($p = 0,0114$) i korijena ($p = 0,0380$) je statistički značajna u uzorcima ječma uzgojenih na filteru papiru i agaru nakon tretmana jet PAW vodom. Najveću prosječnu vrijednost duljine klice pokazao je također uzorak ječma uzgojen na agaru prethodno tretiran PAW vodom aktiviranim mikrovalovima (5,4 cm), nakon kojeg slijedi uzorak tretiran HVED PAW vodom (5,1 cm), a najkraću prosječnu duljinu klice ima uzorak ječma tretiran plazmom jet PAW vodom (3,6 cm). Također, iz rezultata

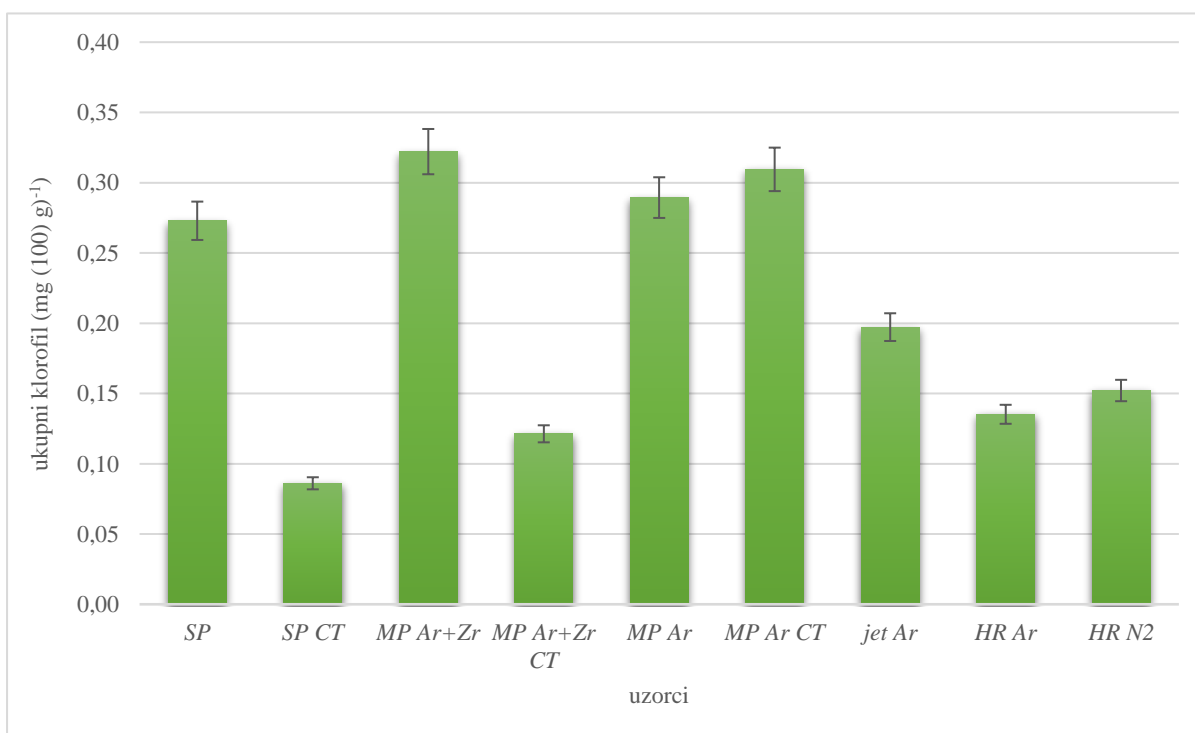
je vidljivo kako je prosječna duljina formirane klice i korijena u uzorku ječma uzgojenog na filter papiru HVED PAW vodom s dušikom kao radnim plinom veća nego s argonom kao radnim plinom. Ji i sur. (2015) su također dokazali da se tretmanom sjemenki korijandera hladnom plazmom i dušikom kao plinom nosačem postiže veća klijavost sjemena nego u slučaju korištenja argona kao radnog plina.

Uzorci tretirani PAW vodom generiranom mikrovalnom plazmom s argonom i smjesom argona i zraka kao radnim plinovima, izloženi su hladnom stres testu što se očituje i u dobivenim rezultatima. Postotak klijavosti ječma izloženog hladnom stres testu niži je od postotka klijavosti ječma koji je uzgajan pri sobnoj temperaturi, i na filter papiru i na agaru s argonom kao radnim plinom. Isti trend zabilježen je i u uzorku ječma uzgojenog na filter papiru sa smjesom argona i zraka, kao radnim plinom. Statistički značajna razlika između uzoraka uzgojenih na agaru i filter papiru potvrđena je za duljinu klice ($p = 0,0015$) i korijen ($p = 0,0010$). Isti trend vrijedi i za uzorke prethodno podvrgnute hladnom stres testu gdje za duljinu klice iznosi $p = 0,0078$, a duljinu korijena $p = 0,0153$. Također, statističkom analizom dokazana je statistički značajna razlika u duljini stabljike i korijena u uzorcima uzgojenim na sobnoj temperaturi i uzorcima prethodno podvrgnutim hladnom stres testu u slučaju tretmana s argonom i smjesom argona i zraka kao radnog plina. Ipak, u odnosu na slijepu probu, postotak klijavosti je viši što dokazuje da tretman hladnom plazmom pospješuje klijavost, rast i razvoj ječma. Tretmanom hladnom plazmom dolazi do lokalnog zagrijavanja za koje se smatra da oštećuje ovojnicu te inducira promjene na površini sjemena i omogućava radikalima da prođu u sjeme i utječu na metabolički proces rasta biljaka što su dokazali Sera i sur. (2010) na uzorku pšenice i zobi. Tretman je inhibirao klijavost u prvim danima, ali se pospješio rast stabljike pšenice. Iako plazma nije utjecala na klijavost zobi, ubrzao se proces rasta korijena. Stolárik i sur. (2015) dokazali su da plazma uzrokuje promjene i modifikacije u strukturi biljnog materijala čime se ubrzava proces klijanja i hormonalne aktivnosti što je povezano s rastom i razvojem sjemena u ranoj fazi rasta graška. Smatra se da tretman hladnom plazmom ima sinergistički učinak na tretirani biljni uzorak, odnosno da djeluje antimikrobno (ima sposobnost inaktiviranja različitih mikroorganizama) čime pospješuje klijavost, rast i razvoj biljke (Thirumdas i sur., 2018).

4.3. Utjecaj plazmom aktivirane vode na razvoj ukupnog klorofila u uzorku rotkvice i ječma



Slika 25. Prikaz ukupnog klorofila razvijenog u stabljici rotkvice u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode



Slika 26. Količina ukupnog klorofila razvijenog u klici ječma u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode

Uvidom u rezultate prikazane na Slici 25 može se zaključiti kako najveći sadržaj klorofila ima uzorak rotkvice tretiran PAW vodom formiranom plazmom jet ($11,46 \text{ mg (100 g)}^{-1}$) dok najmanji sadržaj ukupnih klorofila sadrži uzorak rotkvice tretiran PAW vodom HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom ($1,92 \text{ mg (100 g)}^{-1}$).

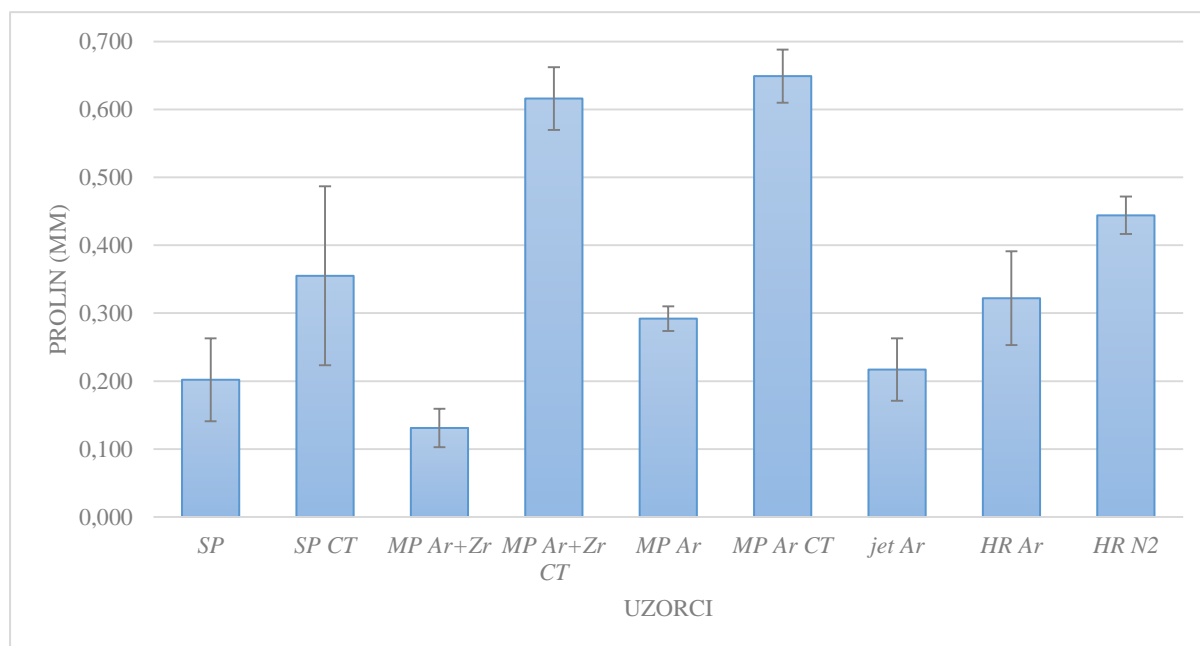
Uspoređujući ukupan sadržaj klorofila u ovisnosti o vrsti tretmana plazmom i argonom kao radnim plinom, najveći sadržaj klorofila sadrži uzorak rotkvice tretiran PAW vodom dobivenom plazmom jet ($11,46 \text{ mg (100 g)}^{-1}$), potom slijedi uzorak tretiran mikrovalnom plazmom ($4,39 \text{ mg (100 g)}^{-1}$), a najmanji sadržaj klorofila sadrži uzorak rotkvice tretiran PAW vodom HVED plazmom ($2,77 \text{ mg (100 g)}^{-1}$). Uzorci rotkvice tretirani PAW vodom dobivenom mikrovalnom plazmom podvrgnuti su hladnom stres testu što se očituje u smanjenom sadržaju ukupnog sadržaja klorofila u odnosu na uzorak uzgajan u optimalnim uvjetima s argonom kao radnim plinom. Međutim, u odnosu na slijepu probu sadrže veći sadržaj ukupnog klorofila, u oba uvjeta uzgoja.

U slučaju uzorka ječma, iz Slike 26 može se očitati najveći sadržaj ukupnog klorofila uzorka podvrgnut tretmanu mikrovalnom plazmom sa smjesom argona i zraka kao radnim plinom ($0,32 \text{ mg (100 g)}^{-1}$). Najmanji sadržaj ukupnih klorofila izmjeren je u uzorku ječma dodatno podvrgnutom hladnom stres testu, ali istom plazma tretmanu ($0,12 \text{ mg (100 g)}^{-1}$).

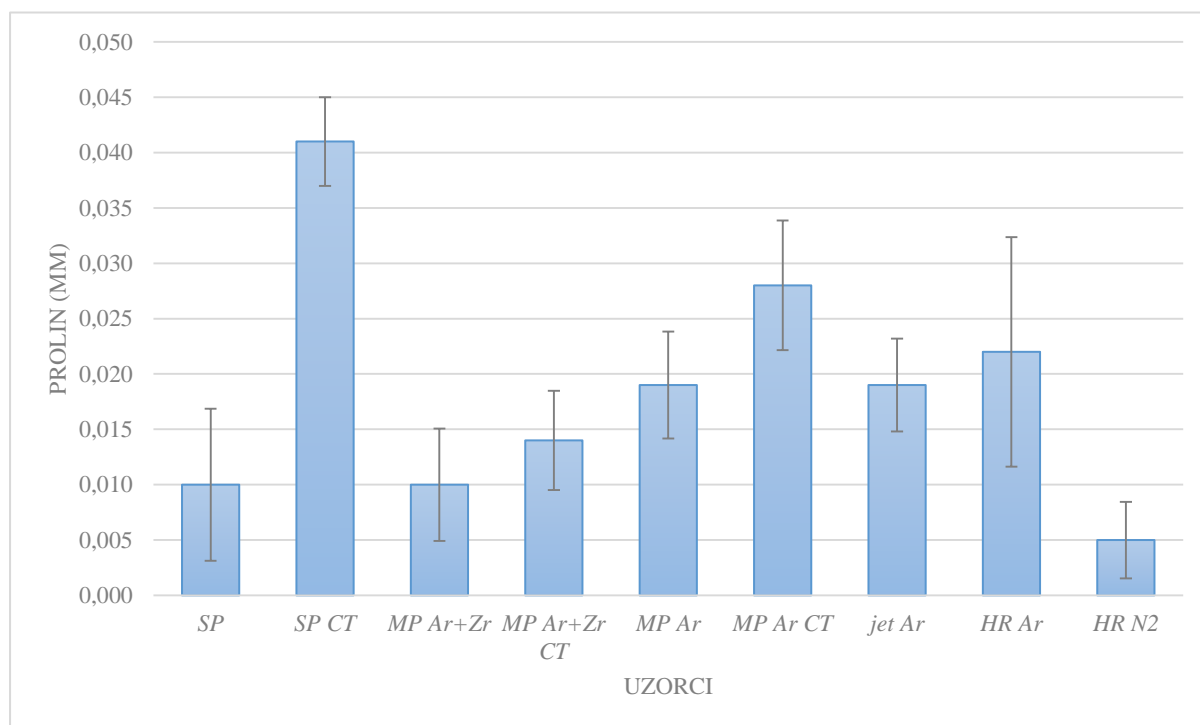
Uspoređujući ukupan sadržaj klorofila ovisno o sustavu generiranja plazme i argonom kao radnom plinom, najboljim se pokazao tretman mikrovalnom plazmom ($0,29 \text{ mg (100 g)}^{-1}$) iza koje slijede tretman plazmom jet ($0,20 \text{ mg (100 g)}^{-1}$) i tretman HVED plazmom ($0,14 \text{ mg (100 g)}^{-1}$). U svim slučajevima, tretman HVED plazmom pokazao se kao najnepovoljniji glede ukupnog sadržaja klorofila. Uzorku HVED PAW vode s dušikom kao radnim plinom je izmjerena visoka koncentracija NO_3^- spojeva nastalih plazma pražnjenjem (Slika 18) pa se može zaključiti ovaj tip tretmana djeluje najnepovoljnije na ukupni sadržaj razvijenog klorofila u uzorku rotkvice. Dokazano je da reaktivne vrste formirane hladnom plazmom utječu na bioaktivne komponente bilja i povrća te mijenjaju nutritivna i funkcionalna svojstva (Annor, 2019). Također, do degradacije klorofila može doći zbog prisutnosti kisikovih radikala formiranih generiranjem hladne plazme. Smatra se da formirani kisikovi radikali prilikom tretmana plazmom dovode do oksidacije klorofila (Ramazzina i sur., 2015). Sera i sur. (2010) dokazali su da se sadržaj fenolnih spojeva u uzorcima pšenice i zobi promijenio nakon tretmana plazmom što su pripisali prodiranju aktivnih vrsta plazme u sjeme što posljedično utječe na metaboličke procese.

Uzorak ječma podvrgnut dvostrukom stresu (hladni stres test i tretman PAW vodom formiranom mikrovalnom plazmom) sadrži 3,6 puta više klorofila u odnosu na slijepu probu u slučaju tretmana s argonom kao radnim plinom, odnosno za 1,4 puta viši u slučaju tretmana sa smjesom argona i zraka kao radnim plinom. Kao slijepa proba koristila se netretirana destilirana voda, a uzorak je također izložen hladnom stres testu. Koncentracija klorofila govori u kojem stadiju rasta se biljka nalazi s time da se udio klorofila jer pruža važne informacije o tome da li je biljka izložena stresu i u kakvoj su vezi stanje biljke i okoliša u kojem se uzgaja (Annor, 2019).

4.4. Utjecaj plazmom aktivirane vode na razvoj ukupnog sadržaja slobodnog prolina u uzorku rotkvice i ječma



Slika 27. Prikaz ukupnog sadržaja slobodnog prolina u uzorku rotkvice u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode



Slika 28. Prikaz ukupnog sadržaja slobodnog prolina u uzorku ječma u ovisnosti o primijenjenom tretmanu PAW vode

Prema rezultatima prikazanim na Slici 27 može se zaključiti da uzorak rotkvice koji je podvrgnut dvostrukom stresu, hladnom stres testu i tretmanu PAW vodom formiranom mikrovalnom plazmom s argonom kao radnim plinom, sadrži najviši udio slobodnog prolina (0,649 mM). Najniži sadržaj slobodnog prolina zabilježen je u uzorku rotkvice tretiranom PAW vodom formiranom mikrovalovima sa smjesom argona i zraka kao radnim plinom i uzgojenoj pri sobnoj temperaturi (0,131 mM).

Isti trend zabilježen je i u uzorku ječma (Slika 28). Najveći sadržaj slobodnog prolina razvio je uzorak ječma podvrgnut hladnom stres testu i tretmanu PAW vodom generiranom mikrovalnom plazmom i argonom kao radnim plinom (0,028 mM), dok je najniži sadržaj slobodnog prolina očit u uzorku ječma tretiranom PAW vodom dobivenom HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom (0,005 mM). Uspoređujući rezultate razvijenog slobodnog prolina, uzorak rotkvice je razvio čak 23 puta više slobodnog prolina u odnosu na uzorak ječma u uvjetima dvostrukog stresa pa se može zaključiti da je rotkvica kao biljka otpornija na ekološke nepovoljne uvjete kao što je hladnoća.

Uspoređujući sustav generiranja plazme s argonom kao radnim plinom, najveći sadržaj prolina razvijen je u uzorku rotkvice tretirane PAW dobivenom HVED plazmom (0,322 mM), pa slijedi tretman rotkvice PAW vodom aktiviranom mikrovalnom plazmom, a najmanji sadržaj ukupnog prolina očit u uzorku rotkvice tretirane plazma jet PAW vodom.

Uzorak ječma tretiran HVED PAW vodom također sadrži najveći sadržaj slobodnog prolina (0,022 mM) dok je sadržaj prolina očit u uzorku ječma tretiranom plazma jet PAW vodom i PAW vodom aktiviranom mikrovalnom plazmom jednak. Tretman HVED PAW vodom pokazao se najinanzivnijim. PAW voda formirana HVED plazmom sadrži visoku koncentraciju radikala NO_3^- i H_2O_2 koji u prekomjernoj količini stvaraju svojevrsni stres biljci. U stresnim uvjetima dolazi do akumulacije slobodnog prolina budući da je njegova uloga „gašenje“ slobodnih radikala i puferiranje staničnog redoks potencijala u stresnim uvjetima (Hayat i sur., 2012). Vodikov peroksid, kao jedan od formiranih radikala, dovodi do peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u sastavu membrana čime se mijenja permeabilnost i selektivnost membrane (Valizadeh-Kamran i sur., 2017). Uloga prolina je, između ostalog, sprječavanje istjecanja elektrolita iz stanične membrane te održavanje ravnoteže reaktivnih kisikovih radikala kako bi se izbjegao oksidativni stres (Hayat i sur, 2012).

U uzorcima rotkvice podvrgnutima dvostrukom stresu (hladni stres test i tretman PAW vodom formiranom mikrovalnom plazmom), u odnosu na slijepu probu i rotkvicu tretiranu istim plazma tretmanom, ali uzgojenom u optimalnim uvjetima, izmjeren je viši sadržaj

slobodnog prolina, neovisno o primijenjenom radnom plinu. U uzorcima ječma izmjereni udio slobodnog prolina također je veći u uzorcima podvrgnutima dvostrukom stresu u odnosu na uzorke ječma uzgojene u optimalnim uvjetima, neovisno o vrsti radnog plina. Budući da je prolin glavna aminokiselina odgovorna za održavanje osmotske ravnoteže u stanici u stresnim uvjetima uzrokovanim niskim temperaturama dolazi do akumulacije prolina što su dokazali i Javadian i sur. (2010) na uzroku pšenice.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja zaključeno je sljedeće:

1. PAW voda formirana je mikrovalnom plazmom, HVED plazmom i plazmom jet. u odnosu na slijepu probu. Primijenjenim plazma tretmanima formirale su se reaktivne vrste s kisikom i dušikom koje su uzrokovale pad pH vrijednosti dok povišenje temperature potiče disocijaciju molekula i stvaranje radikala čime se posljedično utječe na povećanje električne vodljivosti PAW vode. Najagresivnijim tretmanom pokazao se desetominutni tretman HVED plazmom gdje je zabilježena najniža pH vrijednost, najviša temperatura te najveća koncentracija nitrata u PAW vodi neposredno nakon tretmana. Najveća koncentracija vodikova peroksida izmjerena je u uzorcima PAW vode nakon tretmana mikrovalnom plazmom.
2. Mikrovalna plazma s argonom kao radnim plinom se pokazala najpogodnijom za formiranje PAW vode u svrhu poticanja procesa klijavosti rotkvice i ječma, no za rast i razvoj stabljike boljom se pokazala PAW voda formirana HVED plazmom i dušikom kao radnim plinom zahvaljujući formiranim nitratima za koje je dokazano da zaustavljaju dormanciju i potiču klijanje sjemena u mnogim vrstama biljaka.
3. Nakon petnaest minuta tretmana plazmom jet, u uzorcima ječma i rotkvice formirana je najniža koncentracija nitrata i vodikova peroksida u odnosu na druge tretmane te ovaj tretman nije utjecao na smanjenje ukupnog klorofila. I kod rotkvice i ječma, tretman HVED plazmom uzrokovao je razgradnju klorofila zahvaljujući reaktivnim spojevima formiranim hladnom plazmom, posebice kisikovih radikala koji uzrokuju oksidaciju klorofila.
4. U uzorcima rotkvice i ječma podvrgnutima dvostrukom stresu (hladni stres test i tretman PAW vodom formiranom mikrovalnom plazmom), u odnosu na slijepu probu, izmjeren je najviši sadržaj slobodnog prolina, neovisno o primijenjenom radnom plinu. Uspoređujući rezultate razvijenog slobodnog prolina, uzorak rotkvice je razvio čak 23 puta više slobodnog prolina u odnosu na uzorak ječma u uvjetima dvostrukog stresa pa se može zaključiti da je rotkvica kao biljka otpornija na ekološke nepovoljne uvjete kao što je hladnoća.

6. LITERATURA

Annor, G.A. (2019) Cold Plasma Effects on the Nutritional, Textural and Sensory Characteristics of Friut and Vegetables, Meat and Diary Products. U: Effect of Emerging Processing Methods on the Food Quality, (Roohinejad, S., Koubaa, M., Greiner, R., Mallikarjunan, K., ured.), Springer Nature, Švicarska, str. 163-164.

Anonymus 1 <<https://myecobin.in/vegetable-seeds/25-radish-micro-greens.html>> pristupljeno 14. kolovoza 2019.

Anonymus 2 <<https://www.mtpr.org/post/recipe-baked-apples-barley-chorizo-pilaf>> pristupljeno 14. kolovoza 2019.

Anonymus 3 <<https://www.westcoastseeds.com/products/barley-organic>> pristupljeno 14. kolovoza 2019.

Anonymus 4 < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:L-und_D-Prolin_V1.png > pristupljeno 4. rujna 2019.

Bailly, C., El-Maarouf Bouteau, H., Corbineau, F. (2008) From intracellular signaling network stocell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology, *C.R.Biol.* **331**, 806-814.

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.D. (1973) Rapid Determination of Free Prolin For Water-Stress Studies. *Plant Soil.* **39**, 205-207.

Bogaerts, A., Neyts, E., Gijbels, R., Mullen van der, J. (2002) Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim. acta B.* **57**, 609-658.

Bruggeman, P., Degroote, J., Leys, C., Vierendeels, J. (2007) Plasma characteristics in air and vapor bubbles in water. 28th ICPIG, Prag, str. 859-862.

Bulgari, R., Baldi, A., Ferrante, A., Lenzi, A. (2017) Yield and quality of basil, Swiss chard and rocket microgreens grown in a hydroponic system. *Crop Hortic Sci.* **45**, 119-29.

Chang, X. (2013) Developments of surface-wave excited plasma sources using 915 MHz ultra high frequency wave and 2.45 GHz microwave. PhD Thesis. Shizuoka University.

- Chizoba Ekezie, F.G., Sun, D., Cheng, J.(2017) A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: Current applications and future trends. *Trends Food Sci. Tech.* **69**, 46-58.
- Di Gioia, F., Renna, M., Santamaria, P. (2017) Sprouts, Microgreens and “Baby Leaf” Vegetables. U: Minimally Processed Refrigerated Fruits and Vegetables, (Yildiz, F., Wiley, R. C., ured.), Springer Science Business Media LLC, New York, str. 403-432.
- Gadžo, D. (2014) Značaj i uloga plodoreda. U: Organska proizvodnja, (Mirecki, N., ured.), Univerzitet Crne Gore, Biotehnički fakultet, Podgorica, str. 51.
- Gagro, M. (1997) Ratarstvo obiteljskog gospodarstva-žitarice i zrnate mahunarke, 1.izd., Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb.
- Hayat, S., Hayat, Q., Nasser Alyemeni, M., Shafi Wani, A., Pichtel, J., Ahmad, A. (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav.* **7**, 1456-1466.
- Hörtensteiner, S., Kräutler, B. (2011) Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **8**, 977-988.
- Javadian, N., Karimzadeh, G., Mahfoozi S., Ghanat, F. (2010) Cold Induced Changes of Enzymes, Proline, Carbohydrates, and Chlorophyll in Wheat. *Russ. J. Plant. Physiol.* **57**, 540-547.
- Ji, S. H., Kim, T., Panngom, K., Hong, Y. J., Pengkit, A., Park, D. H., Kang, M.H., Lee, S.H., Im, J.S., Kim, J.S., Uhm, H.S., Choi, E.H., Park, G. (2015) Assessment of the Effects of Nitrogen Plasma and Plasma-Generated Nitric Oxide on Early Development of *Coriandrum sativum*. *Plasma Process. Polym.* **12**, 1164-1173.
- Jiang, B., Zheng, J., Qiu, S., Wu, M., Zhang, Q., Yan, Z., Xue, Q. (2014a) Review on electrical discharge plasma technology for wastewater remediation. *Chem. Eng. J.* **236**, 348-368.
- Jiang, J., He, X., Li, L., Li, J., Shao, H., Xu, Q., Ye, R., Dong, Y. (2014b) Effect of Cold Plasma Treatment on Seed Germination and Growth of Wheat. *Plasma Sci. Technol.* **16**, 54-58.
- Kantoci, D. (2009) Povrće u zaštićenom prostoru. *Glasnik zaštite bilja.* **32**, 105.
- Kutasi, K., Popović, D., Krstulović, N., Milošević, S. (2019) Tuning the composition of plasma-activated water by a surface-wave microwave discharge and a kHz plasma jet. *Plasma Sources Sci. Technol.* **28**, 1-12.

- Kyriacou, M.C., Roupael, Y., Di Gioia, F., Kyrtziz, A., Serio, F., Renna, M., De Pascale, S., Santamaria, P. (2016) Micro-scale vegetable production and the rise of microgreens. *Trends Food Sci. Tech.* **57**, 103-115.
- Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Čustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002) Rotkvica. U: Povrćarstvo, (Lešić R., Borošić J., Buturac I., Čustić M., Poljak M., Romić D., ured.), Zrinski d.d., Čakovec, str. 660.
- Lieberman, M.A., Lichtenberg, A.J. (2005) Principles of Plasma Discharges and Materials Processing, 2.izd., John Wiley & Sons. Inc., New Jersey, str. 207.
- Linić, I., Šamec, D., Grúz, J., Vujčić Bok, V., Strnad, M., Salopek-Sondi, B. (2019) Involvement of Phenolic Acids in Short-Term Adaptation to Salinity Stress is Species-Specific among Brassicaceae. *Plants.* **8**, 155.
- Lukes, P., Clupek, M., Babicky, V., Sunka, P. (2008) Ultraviolet radiation from the pulsed corona discharge in water. *Plasma Sources Sci. Technol.* **17**, 1-11.
- Lukes, P., Dolezalova, E., Sisrova, I., Clupek, M. (2014) Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂ Plasma Sources. *Sci. Technol.* **23**, 15-19.
- Ma, R., Wang, G., Tian, Y., Wang, K., Zhang, J., Fang, J. (2015) Non-thermal plasma activated water inactivation of food-borne pathogen on fresh produce. *J. Hazard. Mater.* **300**, 643-651.
- Misra, N.N. (2015) The contribution of Non-thermal and Advanced Oxidation Technologies towards Dissipation of Pesticide Residues. *Trends Food Sci. Tech.* **45**, 229-244.
- Misra, N.N., Schluter, O.K., Cullen ,P.J. (2016) Plasma in Food and Agriculture. U: Cold Plasma in Food and Agriculture, (Misra N.N., Schluter O.K., Cullen P.J. ,ured.), Fundamentals and Applications Elsevier Inc., London, str. 8-12.
- Misra, N.N., Tiwari, B., Raghavarao, K., Cullen, P. (2011) Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Eng. Rev.* **3**, 159-170.
- Muhammad, S.J., Burki, T., Waseem, K. (2010) Effect of Nitrogen on Growth and Yield of Radish. *J. Agric. Res.* **48**, 219-224.

Niemira, B.A, Gutsol, A. (2010) Nonthermal plasma as a Novel Food Processing Technology. U: Nonthermal Processing Technologies for Food, (Zhang, H.Q., Barbosa-C´anovas, G., Balasubramaniam, V.M., Dunne P., Farkas, D., Yuan, J., ured.), John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, str. 311-325.

Niemira, B.A. (2012) Cold Plasma Decontamination of Foods. *Annu.Rev. Food Sci. Technol.* **3**, 125-420.

Oehmigen, K., Hahnel, M., Brandenburg, R., Wilke, C., Weltmann, K.D., von Woedtke, T. (2010) The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids. *Plasma Processes Polym.* **7**, 250-257.

Ohta, T. (2016) Plasma in Agriculture. U: Cold Plasma in Food and Agriculture, (Misra, N.N., Schluter, O.K., Cullen, P.J. ,ured.), Fundamentals and Applications Elsevier Inc., London, str. 205-216.

Pankaj, S. K., Bueno-Ferrer, C., Misra, N. N., Milosavljević, V., O'Donnell, C. P., Bourke, P., Cullen, P. J. (2014). Applications of cold plasma technology in food packaging. *Trends Food Sci. Tech.* **35**, 5-17.

Pankaj, S.K., Keener, K.M. (2017) Cold plasma: background, applications and current trends. *Curr. Opin. Food Sci.* **16**, 49-52.

Paradiso, V.M., Castellino, M., Renna, M., Leoni, B., Caponio, F., Santamaria, P. (2018) Simple tools for monitoring of chlorophyll in broccoli raab and radish microgreens on their growing medium during cold storage. *Progr. Nutr.* **20**, 415-422.

Park, D.P., Davis, K., Gilani, S., Alonzo, C.A., Dobrynin, D., Friedman, G., Fridman, A., Rabinovich, A., Fridman, G. (2013) Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. *Curr. Appl. Phys.* **13**, 19-29.

Poljoprivredni fakultet Osijek (2015) Podrijetlo ječma i područje uzgoja, <http://www.bilje.hr/POLJOPRIVREDA/AgBase_1/HTM/jecam.htm>. Pristupljeno 13.kolovoza 2019.

Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P. (2015) Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biol. Tec.* **107**, 55-65.

Sera, B., Spatenka, P., Sery, M., Vrchotova, N., Hruskova, I. (2010) Influence of plasma treatment on wheat and oat germination and early growth. *Plasma Sci.* **38**, 2963-2968.

Serna Salvidar, S.O. (2010) Cereal grains: Properties, Processing and Nutritional Attributes. 1.izd., CRC Press, Boca Raton, str. 81-102.

Sivachandiran, L., Khacef, A. (2017) Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Adv.* **7**, 1822-1832.

Stolárik, T., Henselová, M., Martinka, M., Novák, O., Zahoranová, A., Černák, M. (2015) Effect of Low-Temperature Plasma on the Structure of Seeds, Growth and Metabolism of Endogenous Phytohormones in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plasma Chem. Plasma Process.* **35**, 659-676.

Szabados, L., Savouré, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**, 89-95.

Šakić Bobić, B. (2014) Isplativa proizvodnja rotkvice. *Gospodarski list.* **1**, 8-9.

Šírová, J., Sedlářová, M., Piterková, J., Luhová, L., Petřivalský, M. (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci.* **181**, 560-572.

Takaki, K., Takahata, J., Watanabe, S., Satta, N., Yamada, O., Fujio, T., Sasaki, Y. (2013) Improvements in plant growth rate using underwater discharge. *J. Phys.* **418**, 1-7.1

Thirumdas, R., Kothakota, A., Annapure, U., Siliveru, K., Blundell, R., Gatt, R., Valdramidis, V.P. (2018) Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture. *Trends Food Sci. Tech.* **77**, 21-31.

Tonks, L. (1967) The birth of 'plasma. *Amer. J. Phys.* **35**, 857-858.

Turner, M. (2016) Physics of Cold Plasma. U: Cold Plasma in Food and Agriculture, (Misra N.N., Schluter O.K., Cullen P.J. ,ured.), Fundamentals and Applications Elsevier Inc., London, str.17-48.

Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H., Pessarakli, M. (2017) Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. *J. Plant Nutr.* **41**, 102-111.

Verbruggen, N., Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino acids*. **35**, 753-759.

Voloshin, R.A., Kreslavski, V.D., Zharmukhamedov, S.K., Bedbenov, V.S., Ramakrishna, S., Allakhverdiev, S.I. (2015) Photoelectrochemical cells based on photosynthetic systems: a review. *Biofuel Res. J.* **6**, 227-235.

Von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., Weltmann, K.D. (2013) Plasmas for medicine. *Phys. Rep.* **530**, 291-320.

Vukušić, T. (2016) Primjena hladne plazme pri obradi voćnih sokova. Disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet. str. 22-23.

Whitehead, J.C. (2016) The Chemistry of Cold Plasma. U: Cold Plasma in Food and Agriculture, (Misra, N.N., Schluter, O.K., Cullen, P.J., ured.), Fundamentals and Applications Elsevier Inc., London, str. 53-76.

Willows, R.D., Li, Y., Scheer, H, Chen, M. (2013) Structure of Chlorophyllf. *Org. Lett.* **20**, 1588-1590.

Xiao, Z., Gene, E., Lester, Y. L., Wang, O. (2012) Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 31.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Televa Vojvoda

Ime i prezime studenta