

Procjena utjecaja atmosferskoga taloženja i ozona na mediteranske šumske ekosustave

Lovreškov, Lucija

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:159:988449>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Lucija Lovreškov

**PROCJENA UTJECAJA
ATMOSFERSKOGA TALOŽENJA I OZONA
NA MEDITERANSKE ŠUMSKE
EKOSUSTAVE**

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Lucija Lovreškov

**PROCJENA UTJECAJA
ATMOSFERSKOGA TALOŽENJA I OZONA
NA MEDITERANSKE ŠUMSKE
EKOSUSTAVE**

DISERTACIJA

Mentorice:

Dr. sc. Tamara Jakovljević, znanstvena savjetnica

Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

Lucija Lovreškov

**ASSESSMENT OF ATMOSPHERIC
DEPOSITION AND OZONE IMPACTS IN
MEDITERRANEAN FOREST
ECOSYSTEMS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Tamara Jakovljević, PhD, Scientific Advisor

Full Professor Ivana Radojčić Redovniković, PhD

Zagreb, 2022.

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za fizikalno-kemijska ispitivanja Hrvatskog šumarskog instituta pod mentorstvom dr.sc. Tamare Jakovljević, znan. sav. te u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije Zavoda za biokemijsko inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković, red.prof. Istraživanje je financirano HRZZ projektom (IP-2016-06-3337) „Procjena utjecaja atmosferskoga taloženja i ozona na mediteranske šumske ekosustave (DepOMedFor)“ voditeljice dr.sc. Tamare Jakovljević, znan. sav.

Tamara Jakovljević
Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko
Tel.: +385 1 6273 025
email: tamaraj@sumins.hr
Matični broj znanstvenice: 311200

Tamara Jakovljević diplomirala je 2000. godine na Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer biokemijsko inženjerstvo. Magistrirala je 2008. godine na temu „Validacija analitičkih metoda određivanja fosfora i amonijakalnog dušika u površinskim i oborinskim vodama“ na istom Fakultetu. Doktorat znanosti iz znanstvenog područja Biotehničke znanosti, znanstveno polje Biotehnogija stekla je 2010. godine također na Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu na temu „Assessing the fluxes of ions from the atmosphere to the lowland forest ecosystem of Croatia following the UN-ECE ICP Forests methodologies (Procjena tijeka iona iz atmosferskih oborina u nizinski šumski ekosustav Hrvatske prema metodologiji UN-ECE ICP Forests)“. U 2009. godini dobila je stipendiju za izradu doktorata na talijanskom institutu, Institute of Ecosystem study, CNR ISE, Verbania Pallanza, Italija.

Znanstvena je savjetnica i zaposlena je na Hrvatskom šumarskom institutu, na Zavodu za ekologiju šuma. Voditeljica je laboratorija za fizikalno-kemijska ispitivanja te je odgovorna za monitoring šumskih ekosustava, praćenje kemije okoliša (analize tla, biljnog materijala i vode), obradu rezultata analiza, kontrolu i osiguranje kvalitete, monitoring utjecaja atmosferskoga taloženja i ozona na šume te obradu prikupljenih podataka monitoringa. Organizatorica je Međulaboratorijskih ispitivanja za EU laboratorije uključene u UN-ECE ICP Forests program. Objavila je 26 znanstvenih radova, 28 objavljenih sažetaka sa skupova te 6 radova objavljeni u zbornicima radova. Sudjelovala je kao Neposredni voditelj pri izradi i obrani pet 5 diplomskih radova i 1 disertacije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je na međunarodnim konferencijama od kojih su dva predavanja bila pozivna predavanja. Također, bila je predsjednica Znanstvenog odbora i potpredsjednica organizacijskog odbora u organizaciji četiri međunarodne konferencije „GREEN-Natural resources, green technology and sustainable development“. Bila je voditeljica HRZZ projekta IP-2016-06-3337 „Procjena atmosferskog taloženja i razine ozona u mediteranskim šumskim ekosustavima (DepOMedFor)“. Članica je ICP Forests međunarodnih ekspertnih grupa za atmosfersko taloženje, ozon i suvoditeljica ekspertne grupe za osiguranje i kontrolu kvalitete u laboratorijima, članica je Hrvatskog šumarskog društva, Hrvatskog društva biotehnologa te je članica Upravnog vijeća CroLab - Hrvatskih laboratorija.

Ivana Radojčić Redovniković
Pierottijeva 6, 10000 Zagreb
Tel.: + 385 1 46 05 015
email: irredovnikovic@pbf.hr
Matični broj znanstvenice: 266812

Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković rođena je 01.10.1977. godine u Beogradu. Visokoškolsko obrazovanje iz područja biotehnologije završila je 2001. godine na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorski studij na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu smjer Biotehnologija-bioproceno inženjerstvo upisala je 2003. godine. Akademski stupanj doktora znanosti stekla je obranom disertacije pod naslovom „Localization of aliphatic glucosinolate biosynthesis and their potential role in plant defence” 05. travnja 2007. godine. Trenutno radi kao redovito profesor u Laboratoriju za primjenu i tehnologiju stanica i biotransformacija na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2003. sudjeluje u nastavi na dodiplomskim studijima na nekoliko kolegija, a od uvođenja Bolonjskog programa sudjeluje u nastavi kao suradnica i nositeljica na kolegijima preddiplomskih i diplomskih studija: „Biotehnologija 4”, „Tehnologija vitamina i hormona”, „Tehnologija životinjskih i biljnih stanica”, „Biološki aktivne komponente u hrani i mehanizmi djelovanja”, „HPLC niskomolekulskih spojeva”, „Fitoremedijacija” i „Biotransformacije”. Na poslijediplomskom doktorskom studiju nositelj je dva modula „Biotehnologija biljaka” i „Stereoselektivne biotransformacije”. Pristupnica je bila mentor 33 diplomska radova i 18 završnih radova te je i objavila je preko 10 radova u koautorstvu sa studentima. Trenutno je mentor dvaju doktorskih radova.

Tijekom svog znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković objavila je preko 70 znanstvenih radova. Ukupna citiranost prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković iznosi prema Web of Science (All databases) 2539; prema Scopus bazi podataka 3376; prema Google Scholar 4354, a h-indeks iznosi 26 prema Web of Science, 24 prema Scopus bazi podataka i 27 prema Google Scholar. Osim značajnih znanstvenih publikacija, je sudjelovala je i na 35 međunarodna i 3 domaća znanstvena skupa, a od toga je održala četiri pozivna predavanja i jedno plenarno predavanje. U okviru znanstveno-istraživačkog rada prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković aktivno je sudjelovala na 15 znanstvenih projekata od toga je bila voditeljica njih devet.

Recenzirala je preko 70 znanstvenih radova u međunarodnim časopisima i zbornicima radova. Također je bila angažirana kao recenzentica za preko 30 različitih međunarodnih znanstvenih projekata uključujući Bio-Based Industries Joint Undertaking Call 2016., 2019. i 2020. European Commission. Tajnica je Hrvatskog društva za biotehnologiju te je član Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista i European Biotechnology Thematic Network Association (EBTNA).

Dobitnica je nekoliko nagrada: Srebrna medalja za rad “Racionalan dizajn prirodnih eutektičkih otapala za pripremu i formulaciju kiralnih lijekova” na 18. međunarodnoj izložbi inovacija, novih ideja, proizvoda i tehnologija ARCA 2020, Nagrade Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta za ukupni znanstveni doprinos – za postignutu visoku kvalitetu u znanstvenom radu 2019., Međunarodne nagrade za inovativnost u zelenoj ekstrakciji prirodnih proizvoda za mlade znanstvenike, Nagrade GENP2018, potpore. Aktivno se služi engleskim i španjolskim jezikom.

Zahvalila bih se mentorici dr.sc. Tamari Jakovljević na pruženoj prilici i bezuvjetnoj podršci. Hvala Vam na strpljenju, vremenu i konstruktivnim komentarima koji su mi omogućili da napredujem iz dana u dan tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i mentorici prof.dr.sc. Ivani Radojčić Redovniković na dragocjenim savjetima i vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se i članicama komisije, izv. prof. dr.sc. Marini Cvjetko Bubalo, doc. dr.sc. Ani Jurinjak Tušek, dr.sc. Lukreciji Butorac, viša znan. sur., koje su svojim komentarima unaprijedile ovaj rad. Hvala vam na uloženom vremenu i savjetima.

Hvala svim suradnicima na projektu DepOMedFor koji su svojim trudom i znanjem pridonijeli izradi ovog rada.

Zahvaljujem i dragim kolegama, Renati, Moniki i Draganu, koji su također pridonijeli izradi ovog rada.

Hvala kolegama, Miji, Sanji, Mladenu i Ivanu, koji su bili bezuvjetna podrška tijekom cijelog ovog putovanja. Hvala vam na slušanju i smijehu. Uz vas je ovo putovanje bilo jednostavnije.

Posebno hvala Martini i Ivani. Sve znate.

Hvala Marici, Mirjani, Heleni, Lei, Tomislavu, Ines i Ivani na tihoj podršci i slavljenju svake male pobjede.

Hvala svima koji ovdje nisu spomenuti, a koji su svojim zalaganjem pridonijeli u izradi ovog rada.

Neizmjerne hvala mojim roditeljima, bratu i posebno sestri na pruženoj podršci, razumijevanju i što ste vjerovali u mene čak i u trenucima kada ja nisam.

Hvala Mati na nesebičnoj podršci, motivaciji i razumijevanju i onda kada je bilo najteže.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Disertacija

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 543.272.37:582.623.2:630*12:661.94:674.032.475.4(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarne biotehničke znanosti

PROCJENA UTJECAJA ATMOSFERSKOGA TALOŽENJA I OZONA NA MEDITERANSKE ŠUMSKE EKOSUSTAVE

Lucija Lovreškov, mag.ing.cheming.

Rad je izrađen na Hrvatskom šumarskom institutu, Jastrebarsko i Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Zagreb

Mentorice: dr.sc. Tamara Jakovljević, znanstvena savjetnica, dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković, red.prof.

Kratki sažetak

Mediterranski šumski ekosustavi u Hrvatskoj su od velike važnosti zbog ekoloških funkcija koje pružaju. Zbog velike osjetljivosti ove regije na onečišćujuće tvari prisutnih u atmosferi, bitno je pratiti stanje šumskih ekosustava te kako oni reagiraju na njih. Cilj je bio uspostaviti ekološko praćenje u mediteranskim šumama, odrediti koncentracije iona prispjelih atmosferskim taloženjem, koncentracije prizemnog ozona i fiziološke parametre stabla, odrediti biokemijske pokazatelje oksidativnog stresa te utvrditi uzročno-posljedične veze između fizioloških parametara stabala i atmosferskih unosa. Sva mjerenja, uzorkovanja i analize rađena su prema priručnicima Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume (UNECE - ICP Forests). Najveće količine atmosferskoga taloženja utvrđena su u šumi hrasta crnike. Opterećenja dušikovim spojevima nisu prošla literaturne granice. Koncentracija ozona na svim plohama bila su blizu ili dosegla 100 ppb. Najmanja osutost utvrđena je na plohi hrasta crnike s < 10 % dok je na ostale tri bila > 40 %. Najveći postotak prirasta bio na plohi alepskog bora. Ispitivanjem odnosa okolišnih varijabli i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma (osutost i prirast) utvrdilo se da je osutost značajno povezana sa sadržajem vode u tlu, dok je prirast bio povezan s sunčevim zračenjem, vlagom i sa parametrima ozona. Korištenjem metode analize slučajne šume (eng. *Random forest analysis*) naglasile su da su parametri ozona bili najvažniji prediktori koji utječu na rast stabala. Utvrđene su značajno manje količine klorofila u hrastovim vrstama u značajno osutim stablima (osutost > 25 %), dok je za borove vrste utvrđeno bilo obrnuto. Akumulirani H₂O₂ odrazio se na prisutnost lipidne peroksidacije u svim vrstama. Značajne razlike utvrđene su za značajno osuta stabla hrasta crnike i alepskog bora dok je za hrast medunac utvrđeno za stabla male osutosti. Utvrđene su aktivacije antioksidativnih enzima u svim vrstama. Aktivacija enzima askorbat peroksidaze mogla bi se smatrati kao indikatorom stresa za ispitivane vrste. Iako nisu uočena vidljiva oštećenja, utvrđeno je da su biljke bile pod stresom.

Broj stranica: 141

Broj slika: 27

Broj tablica: 15

Broj literaturnih navoda: 148

Broj priloga: 2

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: hrast medunac, hrast crnika, alepski bor, crni bor, taloženje dušikovih spojeva, ozon, prirast, osutost, oksidativni stres, indikatori stresa

Datum obrane: 20. listopada 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1.Dr.sc. Marina Cvjetko Bubalo, izv. prof.

2.Dr.sc. Ana Jurinjak Tušek, doc.

3.Dr.sc. Lukrecija Butorac, viša znan. sur.

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23. u knjižnici Hrvatskog šumarskog instituta, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko te u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb., te u Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Ph.D. thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 543.272.37:582.623.2:630*12:661.94:674.032.475.4(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Interdisciplinary biotechnical sciences

ASSESSMENT OF ATMOSPHERIC DEPOSITION AND OZONE IMPACTS IN MEDITERRANEAN FOREST ECOSYSTEMS
Lucija Lovreškov, MSc

Thesis performed at Croatian Forest Research Institute, Jastrebarsko and Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb

Supervisor: Tamara Jakovljević, PhD, Scientific Advisor, Full Professor Ivana Radojčić Redovniković, PhD

Short abstract

Mediterranean forest ecosystems in Croatia are of very high significance because of ecological functions they provide. Due to the high sensitivity of this region to air pollutants present in the atmosphere, it is important to monitor the state of forest ecosystems and how they react to them. The aims of this research were to establish environmental monitoring in Mediterranean forest ecosystems, to determine the concentrations of atmospheric deposition and ground-level ozone, the physiological parameters of trees, to determine biochemical indicators of oxidative stress caused by abiotic sources of stress and finally to establish cause-and-effect relationships between physiological parameters of trees and atmospheric inputs. All measurements, sampling and analysis were done according to International co-operative programme on assessment and monitoring of air pollution effects on forests (ICP Forests) manuals. The highest amount of atmospheric deposition was in the holm oak forest. Nitrogen critical loads did not cross literature limit. Ozone on all four plots was found to be close to or reached 100 ppb. The lowest defoliation was determined on the holm oak plot with < 10% while on the other three it was > 40%, and the highest growth percentage was on Aleppo pine plot. The relationship between environmental variables and forest health indicators (defoliation and growth) was found that defoliation was significantly correlated with soil water content at different depths, while growth was correlated with solar radiation, moisture and with all ozone parameters. Using random forest analysis highlighted that ozone parameters were the most important predictors influencing the tree growth. Significantly lower contents of chlorophyll were found in oak species in significantly defoliated trees (defoliation > 25%) and for pine species was vice versa. Accumulated H₂O₂ was reflected in the presence of lipid peroxidation in all species. Significant differences were found for significantly defoliated holm oak and Aleppo pine trees, while for pubescent oak it was found for low defoliated trees. Activation of all examined antioxidative enzymes in all species was determined. Ascorbate peroxidase enzyme activity could be considered as an indicator of stress in trees for examined species. The plants were found to be under stress although no visible damage was observed.

Number of pages: 141

Number of figures: 27

Number of tables: 15

Number of references: 148

Original in: Croatian

Key words: pubescent oak, holm oak, Aleppo pine, black pine, nitrogen deposition, ozone, growth, defoliation, oxidative stress, stress indicators

Date of the thesis defense: 20th October 2022

Reviewers:

1. PhD. Marina Cvjetko Bubalo, Associate Professor
2. PhD. Ana Jurinjak Tušek, Associate Professor
3. PhD. Lukrecija Butorac, Senior scientific associate

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23., Library of Croatian Forest Research Institute, Cvjetno naselje 41, Jastrebarsko and University of Zagreb, Trg maršala Tita 14.

Tema doktorskog rada pod naslovom „Procjena utjecaja atmosferskoga taloženja i ozona na mediteranske šumske ekosustave“ prihvaćena je na sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj 27. siječnja 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 16. ožujka 2021.

SAŽETAK

Mediterranski šumski ekosustavi u Hrvatskoj su od velike važnosti zbog ekoloških funkcija koje pružaju. Mediteranska regija poznata je kao izvor bioraznolikosti, ali je i jedna od najosjetljivijih regija na klimatske promjene i atmosferske utjecaje. Zbog velike osjetljivosti ove regije na onečišćivače prisutne u atmosferi, bitno je pratiti stanje šumskih ekosustava te kako oni reagiraju na njih. Ciljevi ovog istraživanja bili su uspostaviti ekološko praćenje u mediteranskim šumama, odrediti koncentracije iona prispjelih atmosferskim taloženjem, koncentracije prizemnog ozona i fiziološke parametre stabla, odrediti biokemijske pokazatelje oksidativnog stresa te utvrditi uzročno-posljedične veze između fizioloških parametara stabala i atmosferskih unosa. Sva mjerenja, uzorkovanja i analize rađena su prema priručnicima Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume (UNECE - ICP Forests). Najveće količine atmosferskoga taloženja utvrđena su u šumi hrasta crnike. Opterećenje dušikovim spojevima bila su visoka, ali nisu prošla literaturne granice. Utvrđena su visoka opterećenja i kiselim spojevima. Koncentracije ozona na sve četiri plohe bile su blizu ili dosegle 100 ppb, gornju vjerodostojnu granicu za pasivno praćenje ozona. Najmanja osutost krošnja ispitivanih vrsta utvrđena je na plohi hrasta crnike s < 10 % dok je na ostale tri bila > 40 %. Najveći postotak prirasta stabala bio je na plohi alepskog bora. Ispitivanjem odnosa okolišnih varijabli i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma (osutost i prirast) utvrdilo se da je osutost značajno povezana sa sadržajem vode u tlu na različitim dubinama, dok je prirast ispitivanih vrsta bio povezan sa sunčevim zračenjem i vlagom te s parametrima ozona. Korištenjem metode slučajne šume (eng. *Random forest analysis*) analize su naglasile da su parametri ozona, AOT40, bili najvažniji prediktori koji utječu na rast stabala hrasta medunca i hrasta crnike, dok je drugi parametar ozona, POD0, bio za crni bor. Utvrđene su značajno manje količine klorofila u hrastovim vrstama u značajno osutim stablima (osutost > 25 %), dok je za borove vrste utvrđeno obrnuto. Akumulirani H₂O₂ odrazio se na prisutnost lipidne peroksidacije u svim vrstama. Značajne razlike utvrđene su za značajno osuta stabla hrasta crnike i alepskog bora dok je za hrast medunac utvrđeno za stabla male osutosti. Utvrđene su aktivacije antioksidativnih enzima u svim vrstama. Aktivacija enzima APX u stablima male osutosti mogla smatrati kao indikatorom stresa. Iako nisu uočena vidljiva oštećenja, utvrđeno je da su biljke bile pod stresom.

Ključne riječi: hrast medunac, hrast crnika, alepski bor, crni bor, taloženje dušikovih spojeva, ozon, prirast, osutost, oksidativni stres, indikatori stresa

SUMMARY

Mediterranean forest ecosystems in Croatia are of very high significance because of ecological functions they provide. The Mediterranean region is known as a source of biodiversity, but it is also one of the most sensitive regions to climate change and atmospheric influences. Due to the high sensitivity of this region to air pollution, it is important to monitor the state of forest ecosystems and how they react to them. The aims of this research were to establish environmental monitoring in Mediterranean forest ecosystems, to determine the concentrations of atmospheric deposition, concentrations of ground-level ozone and the physiological parameters of the trees, to determine biochemical indicators of oxidative stress caused by increased concentrations of air pollutants and finally to establish cause-and-effect relationships between physiological parameters of trees and atmospheric inputs using various statistical tools. All measurements, sampling and analysis were done according to International co-operative programme on assessment and monitoring of air pollution effects on forests manuals. The highest amount of atmospheric deposition was in the holm oak forest. Nitrogen critical loads were high but did not cross literature limit. High loads of acidic compounds were also found. Ground-level ozone concentrations on all four plots was found to be close to or reached 100 ppb, the upper plausible limit for passive ozone monitoring. Furthermore, the relationship between environmental variables and forest health indicators (defoliation and growth) was found that defoliation was significantly correlated with soil water content at different depths, while growth was correlated with solar radiation and moisture and positively correlated with all ozone parameters. Using random forest analysis highlighted that AOT40 parameters were the most important predictors influencing the growth of pubescent oak and holm oak, while POD0 was for black pine. Significantly lower amounts of chlorophyll were found in oak species in significantly defoliated trees (defoliation > 25 %) and for pine species higher amounts of chlorophyll were found in significantly defoliated trees (defoliation > 25 %). Accumulated H₂O₂ was reflected in the presence of lipid peroxidation in all species. Significant differences were found for significantly defoliated holm oak and Aleppo pine trees, while for pubescent oak it was found for low defoliated trees. Antioxidative enzymes in all species were determined. Ascorbate peroxidase enzyme activity could be considered as an indicator of stress in trees with low defoliation. The plants were found to be under stress although no visible damage was observed.

Key words: pubescent oak, holm oak, Aleppo pine, black pine, nitrogen deposition, ozone, growth, defoliation, oxidative stress, stress indicators

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Atmosfersko taloženje i izvori onečišćujućih tvari	4
2.1.1. Utjecaj atmosferskoga taloženja dušikovih i kiselih spojeva na šume	6
2.1.2. Onečišćenje prizemnim ozonom	7
2.1.2.1. Parametri za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma.....	8
2.2. Motrenje stanja mediteranskih šuma u RH i u Europi.....	11
a) Šume hrasta medunca (<i>Quercus pubescens</i> Willd.)	12
b) Šume hrasta crnike (<i>Quercus ilex</i> L.)	13
c) Šume alepskog bora (<i>Pinus halepensis</i> Mill.)	14
d) Šume crnog bora (<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold.)	15
2.2.1. Stanje atmosferskoga onečišćenja u Hrvatskoj	16
2.2.2. Dosadašnja istraživanja o utjecaju atmosferskoga taloženja i prizemnog ozona u mediteranskim šumskim ekosustavima	17
2.2.3. Europski program za dugotrajno praćenje atmosferskog onečišćenja na šumske ekosustave	18
2.3. Oksidativni stres i njegov utjecaj na biljke.....	19
2.3.1. Uzročnici abiotičkog stresa	21
2.3.2. Nastanak reaktivnih kisikovih čestica (ROS).....	23
2.3.3. Prilagodba biljaka na abiotičke izvore stresa	26
3. MATERIJALI I METODE	29
3.1. Materijali	29
3.1.1. Oprema	29
3.1.2. Kemikalije	29
3.2. Metode.....	32
3.2.1. Uspostava ekološkog praćenja stanja mediteranskih šuma	32
3.2.2. Mjerenje atmosferskoga taloženja i procjena opterećenja kiselim spojevima.....	35
3.2.2.1. Analiza pH i provodljivosti	36
3.2.2.2. Analiza alkaliteta.....	37
3.2.2.3. Provjera valjanosti analitičkih rezultata atmosferskoga taloženja.....	37
3.2.3. Utvrđivanje razine prizemnog ozona (O ₃).....	38
3.2.3.1. Parametri za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma.....	38

3.2.4.	Vizualna procjena oštećenosti od ozona.....	41
3.2.5.	Određivanje hranjivih tvari u tlu	42
3.2.6.	Određivanje mehaničkog sastava tla	42
3.2.7.	Određivanje pH tla u vodi (H ₂ O) i kalcijevom kloridu (CaCl ₂)	44
3.2.8.	Određivanje sadržaja karbonata (CaCO ₃) u tlu	44
3.2.9.	Određivanje dušika (N) i ugljika (C) u tlu.....	44
3.2.10.	Određivanje sadržaja fosfora (P ₂ O ₅) i kalija (K ₂ O) u tlu.....	45
3.2.11.	Određivanje hranjivih tvari u lišću i iglicama	45
3.2.12.	Određivanje dušika (N), ugljika (C) i sumpora (S) u lišću i iglicama	46
3.2.13.	Određivanje kalcija (Ca), kalija (K) i magnezija (Mg) u lišću i iglicama	46
3.2.14.	Utvrđivanje rasta stabla i stanja krošnji.....	46
3.2.14.1.	Utvrđivanje rasta stabla	46
3.2.14.2.	Utvrđivanje stanja krošnji	47
3.2.15.	Određivanje biokemijskih pokazatelja oksidativnog stresa.....	48
3.2.15.1.	Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	48
3.2.15.2.	Određivanje količine vodikovog peroksida (H ₂ O ₂) i lipidne peroksidacije (LPO)	49
3.2.15.3.	Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu i aktivnosti antioksidativnih enzima.....	50
3.3.	Statistička obrada podataka	52
4.	REZULTATI	54
4.1.	Atmosfersko taloženje	54
4.2.	Koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeračima	64
4.2.1.	Određivanje parametara za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma	65
4.3.	Odnosi između okolišnih varijabli i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma	66
4.4.	Hranjive tvari u lišću i iglicama	73
4.5.	Hranjive tvari u tlu.....	75
4.6.	Osutost.....	77
4.7.	Prirast.....	79
4.8.	Određivanje indikatora oksidativnog stresa i antioksidativnih enzima.....	80
5.	RASPRAVA	87
5.1.	Procjena utjecaja atmosferskoga taloženja te utvrđivanje stvarnih i kritičnih opterećenja dušikovim i kiselim spojevima u mediteranskim šumskim ekosustavima	87
5.2.	Utjecaj prizemnog ozona na mediteranske šumske ekosustave	95
5.3.	Odnosi između varijabli okoliša i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma.....	97
5.4.	Status hranjivih tvari u tlu i lišću i iglicama.....	101

5.5. Utjecaj abiotičkog stresa na mediteranske šumske vrste.....	103
6. ZAKLJUČCI	111
7. LITERATURA	113
8. PRILOZI.....	133

1. UVOD

Mediteranske šume pružaju široku lepezu usluga za zaštitu okoliša i proizvoda. Usprkos njihovoj važnoj ulozi primarne zelene infrastrukture u regiji, mediteranske šume podliježu brojnim prijetnjama, poput šumskih požara, iskorištavanja šuma, krčenja šuma i degradacije. Među bioklimatskim regijama, mediteranska regija čini se najosjetljivija na globalne promjene. Osjetljivost mediteranske regije na klimatske promjene odnosi se na trend povećanja temperature, degradaciju vodnih resursa, čestim požarima i povećanu potražnju za vodom. Također, negativan utjecaj atmosferskoga onečišćenja na ekosustave, kao dio klimatskih promjena, zahtijeva sve veću svijest u istraživanjima (Sicard i sur., 2016a).

U glavne atmosferske onečišćivače ubrajaju se amonijak (NH_3), dušikovi oksidi (NO_x), sumporov dioksid (SO_2) i ozon (O_3). Ioni prisutni u atmosferi koji pridonose kiselim kišama poput sulfata (SO_4^{2-}), nitrata (NO_3^-), amonijaka (NH_4^+) (kiselu ioni) nastaju u kontaktu s vodom prisutnoj u zraku, a dolaze uglavnom ispuštanjem onečišćujućih plinova u atmosfera. Nadalje, bazični ioni natrija (Na^+), kalcija (Ca^{2+}), magnezija (Mg^{2+}), kalija (K^+) i klorida (Cl^-), koji su uglavnom prirodnog porijekla (zračne mase s mora, prašina podignuta s tla), pristižu atmosferskim taloženjem u šumske ekosustave i pridonose ekološkoj neravnoteži cijelog ekosustava. Kemijski sastav atmosferskog taloženja (osobito dušikovi i sumporovi spojevi) ima utjecaj na šumski ekosustav kroz eutrofikaciju dušikom i zakiseljavanjem tla, mijenjajući svojstva tla i procese u tlu (Clark i sur., 2007; Bobbink i sur., 2010; Jakovljević i sur., 2013; Schaub i sur., 2020). Zakiseljavanje tla taloženjem kiselih spojeva (NH_3 , NO_x , SO_2) uzrokuje gubitak bazičnih kationa iz tla te time dovodi do nedostatka hranjivih tvari i smanjenja pH što može dovesti do povećanja pokretljivosti teških metala (de Vries i sur., 2014; Ferretti i sur., 2014). Neravnoteža hranjivima dovodi biljku u stanje stresa te utječe na fotosintezu, a posljedično dolazi do smanjenja vitaliteta šuma (de Vries i sur., 2014; Rautio i sur., 2020).

Nakon uvedenih ograničenja ispuštanja onečišćujućih tvari u atmosferu Direktivom 2008/50/EC (EC, 2008) u Europi je došlo do smanjenja prekograničnog onečišćenja spojevima sumpora, a NO_x spojeva neznatno povećan (EEA, 2019). Onečišćujuće tvari prenose se zračnim masama na velike udaljenosti te se određivanjem kemijskog sastava taloženja utvrdilo da su onečišćujuće tvari koje dolaze iz udaljenih područja u postotku sljedeće: 80 % sumpor, 70 % dušik i amonijak oko 50 %. Ove količine štetnih tvari na našem području uglavnom dolaze iz susjednih zemalja dok je najveći doprinos emisije amonijaka (NH_3), koji kao takav ne opstaje dugo u zraku (0,9 dana), dolazi iz poljoprivrednog sektora kao rezultat primjene i rukovanja prirodnim gnojivima (HAOP, 2019). U Hrvatskoj u 2017.

godini emisija NH_3 je prešla gornju graničnu vrijednost utvrđenu Direktivom o smanjenju nacionalnih emisija određenih atmosferskih onečišćujućih tvari (EU, 2016; EEA, 2019).

Ozon kao prateći agens klimatskih promjena također je među ključnim faktorima koji rezultira prostornim i vremenskim promjenama na stanje krošnja i produktivnost stabala (Sicard i sur., 2016b). Rezultati koncentracija prizemnog ozona (O_3) pokazuju da srednje dnevne vrijednosti ozona mogu biti visoke i da postoji rastući gradijent koncentracije koji ide od kontinentalnog dijela prema Mediteranu. Mediteranska regija je područje s najvećim rizikom od utjecaja ozona jer formiranje ozona nastaje pri visokim temperaturama uz prisutnost prekursora (NO_x , NH_3 , SO_2 , CH_4 , hlapljivih organskih spojeva (VOC)) i sunčevog zračenja koji je povišen u mediteranskim ekosustavima (Sicard i sur., 2013; Sicard i sur., 2016a). Izvori onečišćenja ozona mogu biti prirodni ili nastaje kao produkt kemijske reakcije. Također, transport onečišćujućih tvari (prekursora) bitan su izvor ozona (HAOP, 2019). Prema EMEP (eng. *European Monitoring and Evaluation Programme*) modelima i kartama rizika za procjenu koncentracije ozona na Mediteranu u periodu od travnja do rujna utvrđene su vrijednosti bile više od kritične razine za očuvanje šuma (5000 ppb h) (EEA, 2019). Karte ozona napravljene su na temelju mjerenja pozadinskih koncentracija i ne predstavljaju realne koncentracije ozona u šumskim ekosustavima gdje te vrijednosti mogu biti mnogo veće stoga su presudne za istraživanje u šumskim ekosustavima (Sicard i sur., 2016c).

Biljka zbog biotičkih i abiotičkih utjecaja može doći u stanje oksidativnog stresa. Onečišćujuće tvari iz zraka su jedni od glavnih abiotičkih čimbenika koji uzrokuju oksidativni stres. Biljka u stanju oksidativnog stresa proizvodi povećane količine reaktivnih kisikovih čestica (ROS) koje čine slobodni radikali (superoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$)) ili neradikalne molekule (vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3) i singlet kisik ($^1\text{O}_2$)). U normalnim uvjetima molekule ROS-a sintetiziraju se kao produkt biljnog metabolizma te služe kao signalne molekule dok u slučaju povećane koncentracije ROS-a biljka aktivira niz fizioloških i biokemijskih promjena te se biljka nalazi u stanju oksidativnog stresa (Gill i Tuteja, 2010). Glavni biokemijski pokazatelji oksidativnog stresa su promjene u sadržaju fotosintetskih pigmenata, količini malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije i količini H_2O_2 . Također, promjene u aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su enzimi superoksid-dismutaze, nespecifičnih peroksidaza, katalaze i askorbat-peroksidaze pokazatelji su potencijalne zaštite biljke od oksidativnog stresa. Prateći biokemijske pokazatelje oksidativnog stresa moguće je utvrditi nalazi li se stablo u stanju stresa i prije nego nastupi vizualno oštećenje. Biokemijske promjene javljaju se prije morfoloških i anatomskih

promjena što ih čini korisnijima za rana upozorenja na stanje ekosustava (Sharma i sur., 2012).

Mediterranski šumski ekosustavi u Hrvatskoj su od velike važnosti zbog općekorisnih funkcija koje pružaju. Rizični faktori, poput onečišćenja zraka, erozije tla, požara, klizišta i poplava, uz klimatske promjene utječu na izmjenu i dostupnost hranjiva, vlažnost tla, te na rast i primarnu proizvodnju šuma hrvatskog Mediterana. Ovi šumski ekosustavi prostiru se gotovo na polovici ukupne površine šuma Hrvatske i vjerojatno su najugroženiji ekosustavi u našoj zemlji (Prpić i sur., 2011a). Ova regija je ekološki vrlo osjetljiva, zbog svog geografskog položaja, složene orografije, specifičnih meteoroloških uvjeta i mnogih izvora onečišćenja (Skevin-Sovic i sur., 2012). Zbog gospodarskih i općekorisnih posebnosti i vrijednosti mediteranskih šuma, potrebna su intenzivna i multidisciplinarna istraživanja i praćenja promjena nastalih pod utjecajem onečišćenja na šumske ekosustave.

Do sada su u mediteranskim šumskim ekosustavima Hrvatske korištene samo najjednostavnije metode za procjenu stanja šumskih ekosustava koje uključuju različite vizualne pokazatelje na temelju boje lišća, stupnja oštećenja lišća i stupnja osutosti krošnje (Potočić i Seletković, 2011). Određivanjem kemijskog sastava atmosferskog taloženja, koncentracije ozona te njihovih utjecaja na zdravstveni status stabla, rast, stanje krošnje, koncentraciju hranjiva u tlu i lišću/iglicama dobit će se uvid u zdravstveno stanje tipičnih mediteranskih šumskih ekosustava kako bi se pridonijelo njihovom sustavnom očuvanju.

Ciljevi ovog istraživanja bili su uspostavljanje ekološkog praćenja u mediteranskim šumama, određivanje koncentracija iona prispjelih atmosferskim taloženjem, koncentracije prizemnog ozona i fiziološke parametre stabla, odrediti biokemijske pokazatelje oksidativnog stresa te utvrditi uzročno-posljedične veze između fizioloških parametara stabala i atmosferskih unosa koristeći različite statističke alate. Pretpostavke su da će povećane koncentracije onečišćujućih tvari utjecati na zdravstveno stanje šuma, da promjene u kemiji tla dovode do neravnoteže u opskrbi hranjivima te smanjenju vitaliteta šuma. Posljednja pretpostavka je da će povećane koncentracije onečišćujućih tvari uzrokovati oksidativni stres u biljkama i oštećenje na ispitivanim vrstama. Ovo istraživanje je prvo kao takvo provedeno u ovom dijelu Mediteranske regije. Ovo istraživanje doprinosi novim saznanjima o utjecajima atmosferskog onečišćenja zraka na biogeokemijske cikluse elemenata u mediteranskim šumskim ekosustavima. Rezultati istraživanja daju informacije o zdravstvenom statusu odabranih mediteranskih šumskih vrsta kao i informacije o mogućem nastanku oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i prije nego dođe do vizualnog oštećenja. **OPĆI DIO**

2.1. Atmosfersko taloženje i izvori onečišćujućih tvari

Onečišćenje zraka je definirano kao odstupanje od njegova normalnoga sastava zbog prisutnosti onečišćujućih tvari u koncentraciji u kojoj one mogu imati negativne posljedice na okoliš i živa bića te ugroziti ljudsko zdravlje (De Marco i sur., 2019). Atmosferskom onečišćenju pridonose prirodni i antropogeni uzročnici. Neki od prirodnih uzročnika onečišćenja su prirodni izvori, uključujući vulkanske erupcije, prašinu nanesenu vjetrom, aerosoli i emisije hlapljivih organskih spojeva koje biljke prirodno ispuštaju u atmosferu (EEA, 2021). Antropogeni izvori uključuju ljudski utjecaj a najčešći izvori onečišćenja su industrija, prijevoz, poljoprivreda, upravljanje otpadom, domaćinstva, rudarenje i drugo. Ovim aktivnostima u atmosferu se ispuštaju različiti onečišćivači koji mogu imati negativne posljedice na šumske ekosustave poput eutrofikacije i zakiseljavanja tla (Skevin-Sovic i sur., 2012).

Onečišćivači zraka mogu se podijeliti u dvije skupine: primarne i sekundarne onečišćivače. Primarni onečišćivači se direktno ispuštaju u atmosferu. Najčešće su to takozvane lebdeće čestice prisutne u zraku (eng. *particulate matter*, PM) aerodinamičnog promjera manjeg od 2,5 μm (PM_{2,5}) (morska sol, crni ugljen, prašina i zgusnute čestice određenih kemikalija) ili manjeg od 10 μm (PM₁₀), čađa, sumporov dioksid (SO₂), dušikovi oksidi (NO_x), amonijak (NH₃), ugljični monoksid (CO), metan (CH₄), nemetanski hlapljivi organski spojevi i drugi (Pacyna, 2008). Sekundarni onečišćivači se ne emitiraju direktno u atmosferu, već nastaju kemijskom reakcijom između plinovitih prekursora, a među glavnim sekundarnim onečišćivačima su ozon (O₃), NO₂ i oksidirani hlapljivi organski spojevi (eng. *Volatile Organic Compounds*, VOC). Ključni plinoviti prekursori za ozon i sekundarne PM su CH₄, SO₂, NO_x, NH₃ i VOC (Pacyna, 2008).

Onečišćivači iz zraka dopijevaju u različite ekosustave na dva načina: suhim taloženjem koje se odvija kontinuirano pod utjecajem gravitacije te mokrim taloženjem uslijed oborina. Prijenos onečišćujućih tvari atmosferskim putem je značajan i često dominantan put kojim se prirodne i antropogene tvari prenose zračnim masama s kopna na morsko područje obrnuto. Jednom unesene putem procesa suhog i mokrog taloženja, atmosferske lebdeće čestice ili aerosoli postaju vanjski izvor hranjivih, ali i toksičnih tvari za kopnene i vodene ekosustave (De Marco i sur., 2022). Dakle, atmosfersko taloženje je vrlo bitan proces prijenosa plinova, čestica, padalina i aerosol iz atmosfere na tlo.

Posljedice atmosferskoga taloženja na okoliš mogu biti štetne ili korisne. S jedne strane, atmosfersko taloženje je izvor onečišćujućih spojeva poput sumporovih i dušikovih spojeva koji mogu pridonijeti zakiseljavanju i eutrofikaciji različitih ekosustava (Clark i sur., 2007). Također, utječe na kruženje elemenata, na sekvestraciju ugljika u šumskim ekosustavima, proizvodnju, efikasnost i obnovljivosti prirodnih resursa (de Vries i sur., 2014). S druge strane, atmosfersko taloženje je prijenos dodatnih hranjivih tvari u šumske ekosustave (de Vries i sur., 2014). Na primjer spojevi sumpora (S) i dušika (N) mogu djelovati ili kao hranjive tvari ili kao izvori stresa za šumske ekosustave, iako su dospjeli u atmosferu antropogenim djelovanjem (De Marco i sur., 2022). Onečišćujuće tvari i/ili hranjiva pristižu u ekosustave mokrim taloženjem, kišom, susnježicom, snijegom ili maglom, koje ispiru čestice i plinove prisutne u zraku. Suhim taloženjem plinovi i čestice prašine talože se pod utjecajem gravitacije. Čestice prisutne u atmosferi nošene su zračnim masama ponekad i na vrlo velike udaljenosti (Pacyna, 2008). Različiti meteorološki, hidrološki, fizikalni, kemijski i biološki procesi uključeni su u atmosfersko taloženje, što ga čini složenim dijelom biogeokemijskog kruženja različitih spojeva u Zemljinom sustavu (Pacyna, 2008).

Onečišćujuće tvari puštene u atmosferu smanjuju pH kiše između 4,20 i 4,40, dok je pH kiše u uvjetima bez prisutnih onečišćujućih tvari 5,50. Ti onečišćivači zovu se i kiselim spojevima, a najzastupljeniji kiselu spojevi su SO_2 i NO_x spojevi (NO i NO_2) i u kontaktu s vodom u zraku tvore sumpornu i nitratnu kiselinu. Dušikovi oksidi pridonose i stvaranju prizemnog ozona kao i lebdećih čestica prisutnih u zraku (Skevin-Sovic i sur., 2012). Među kisele spojeve ubraja se i amonijak koji uglavnom potječe iz poljoprivrede (Karavoltsos i sur., 2017; Kozłowski i sur., 2020).

Uz kisele spojeve u atmosferi se nalaze bazični ioni. Izvor bazičnih iona (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) u atmosferi je različit. Uglavnom potječu s mora ili s površine tla, a talože se, kao i kiselu spojevi, suhim i mokrim taloženjem (Mosello i sur., 2002; Araujo i sur., 2015; Karavoltsos i sur., 2017). Glavni izvor Ca^{2+} je prašina s površine tla. U proljeće saharski pijesak ima značajan doprinos u taloženju ovog iona (Díaz-Hernández i Párraga, 2008; Michel i Seidling, 2016). Glavni izvor Mg^{2+} u mediteranskoj regiji su zračne mase s mora ili izgaranje biomase (Araujo i sur., 2015; Jakovljević i sur., 2019). Kalij se može naći u atmosferi, kao i Mg^{2+} , uslijed spaljivanja biomase, ali i u prašini podignutoj s tla, dok Na^+ uglavnom dolazi zračnim masama s mora (Šiljković i Mamut, 2016; Keresztesi i sur., 2019).

2.1.1. Utjecaj atmosferskoga taloženja dušikovih i kiselih spojeva na šume

Ioni prispjeli atmosferskim taloženjem uzrok su, uz eutrofikaciju dušikom i zakiseljavanjem tla, mijenjanja svojstava tla kao i procesa u tlu što može uzrokovati gubitak bazičnih kationa (npr. K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) iz tla koji su glavne hranjive tvari, sprječavanje vezanja ovih kationa (Clark i sur., 2007). Zakiseljavanjem tla taloženjem sumporovih i dušikovih spojeva smanjuje se pH tla. Smanjenjem pH tla dolazi do povećane pokretljivosti teških metala koji se vežu na mjesta gdje su prije bili vezani hranjivi bazični kationi. Promjene u kemiji tla mogu uzrokovati neuravnoteženu ishranu biljaka, što posljedično uzrokuje manju produktivnost, manji rast, povećanu osutost, te u krajnjem slučaju, smrt biljke (Rautio i sur., 2020). Ako dođe do ove faze, mogući su negativni utjecaji na zdravstveno stanje šume i njen razvoj (de Vries i sur., 2014). Neravnoteža hranjivim tvarima u kombinaciji s raznim izvorima stresa poput suše, visokih temperatura, ozona mogu utjecati na prirast stabla, na fotosintezu i uzrokovati oksidativni stres te posljedično smanjiti vitalitet šuma (de Vries i sur., 2014; Proietti i sur., 2016; Paoletti i sur., 2019; Rautio i sur., 2020). Dakle, šumski ekosustav može biti doveden u neravnotežu ako biljkama nije dostupna dovoljna količina hranjivih tvari ili je prisutna prekomjerna količina od optimalne (Ferretti i sur., 2014; Taiz i sur., 2015).

Jedan od ograničavajućih elementa za rast biljaka u mnogim prirodnim ekosustavima, posebno oligotrofnim (niska razina sadržaja hranjivih tvari) i mezotrofnim (srednja razina sadržaja hranjivih tvari) staništima je dušik (Bobbink i Hettelingh, 2011). Dušik prvenstveno potiče rast biljaka u regijama koje oskudijevaju hranjivima poput Mediterana. Veće količine dušika od optimalnih potiču neravnomjerni rast što može uzrokovati osjetljivost na klimatske promjene te biljke postaju podložnije na biotičke i abiotičke faktore iz okoline (De Marco i sur., 2014).

Spojevi dušika pretežito pristižu u šumske ekosustave suhim taloženjem (60 - 80 %) (Aguillaume i sur., 2017). Taloženje dušika u mediteranskim šumskim ekosustavima je sezonski proces uvjetovan mediteranskom klimom. Iako je ova regija prepoznatljiva po velikoj biološkoj raznolikosti, potencijalni ekološki učinci taloženja dušika na šume manje su istraženi (Anatolaki i Tsitouridou, 2007; Bobbink i Hettelingh, 2011; De Marco i sur., 2014; Ferretti i sur., 2014; Aguillema i sur., 2017;). Među manje istražene mediteranske regije može se svrstati i jadranska regija (Jakovljević i sur., 2019; Lovreškov i sur., 2021).

Gubitak hranjivih tvari povećanjem kiselosti tla (smanjenjem pH tla) na području Mediterana koje oskudijeva hranjivima može imati negativne posljedice na razvoj biljke (de Vries i sur., 2014). Neravnoteža hranjivima utječe na fiziološke procese, kao na primjer fotosintezu, smanjen prinos što se odražava na vitalitet šuma (de Vries i sur., 2014; Proietti i sur., 2016). Zbog potencijalnih prijetnji koje predstavljaju, bitno je praćenje atmosferskih onečišćivača, osobito dušikovih oksida (NO_x). Oni su, kao primarni onečišćivači, prekursori za nastajanje prizemnog ozona (O₃). Budući da je ozon sekundarni onečišćivač nije ga moguće izravno kontrolirati, već neizravno prateći prekursore. S toga nije uključen u praćenje EU direktivom 2016/2284/EU (eng. *National Emission Ceilings Directive 2016/2284/EU*, NECD) jer je ovisan o koncentraciji prekursora u atmosferi kao i o vanjskim uvjetima (De Marco i sur., 2019).

2.1.2. Onečišćenje prizemnim ozonom

U posljednjem desetljeću povećale su se koncentracije ozona uslijed ispuštanja onečišćujućih tvari u atmosferu (Monks i sur., 2015). Praćenje onečišćenja prizemnim ozonom jedan je od parametara kvalitete zraka koji se prati na europskoj i svjetskoj razini jer utječe na ljudsko zdravlje, vegetaciju i klimu (De Marco i sur., 2019; De Marco i sur., 2022). Prizemni ozon sekundarni je onečišćivač zraka i jedan od stakleničkih plinova nastao fotokemijskom reakcijom uzrokovanom primarnim onečišćivačima (fosilna goriva, izgaranje biomase), prekursorima, kao što su metan (CH₄), dušikovi oksidi (NO_x), ugljikov monoksid (CO) i hlapljivi organski spojevi (eng. *Volatile organic compound*, VOC) pri visokim temperaturama i sunčevoj svjetlosti (Monks i sur., 2015). Ozon, budući da je jako oksidativno sredstvo, direktno oštećuje tkivo biljke te je jedan od glavnih uzročnika oksidativnog stresa u mediteranskoj regiji (de Vries i sur., 2014, Sicard i sur., 2013).

Osjetljivost šuma na ozon je promjenjiva te reakcije biljke na visoke koncentracije ozona variraju ovisno o vrsti, genotipu i fenologiji biljke (Sicard i sur., 2016a). Što se tiče osjetljivosti šumskih vrsta, listopadne vrste pokazale su veću osjetljivost na ozon nego zimzelene vrste (Büker i sur., 2015). S druge strane, istraživanjima je utvrđeno kako su borovi osjetljiviji na utjecaj ozona od ostalih četinjača poput jele ili smreke (Sicard i Dalstein-Richier, 2015; Sicard i sur., 2016).

Ozon može uzrokovati osutost, to jest gubitak lišća (Araminienè i sur., 2019; De Marco i sur., 2017; Sicard i Dalstein-Richier, 2015). Povećane koncentracije ozona mogu uzrokovati i smanjenje prirasta te ukupne biomase drveća (Wittig i sur., 2009). Utjecaj ozona na prirast odraslih stabala slabo je istražen u vanjskim uvjetima već su istraživanja uglavnom rađena na mladim biljkama u kontroliranim uvjetima. Stoga su neophodna istraživanja u prirodnim uvjetima kako bi se dobila stvarna slika mogućih utjecaja ozona na šume (Matyssek i sur., 2010; Paoletti i sur., 2019). Ovo istraživanje daje nove informacije za do sad malo ili nikako istražene vrste u terenskim uvjetima u Hrvatskoj.

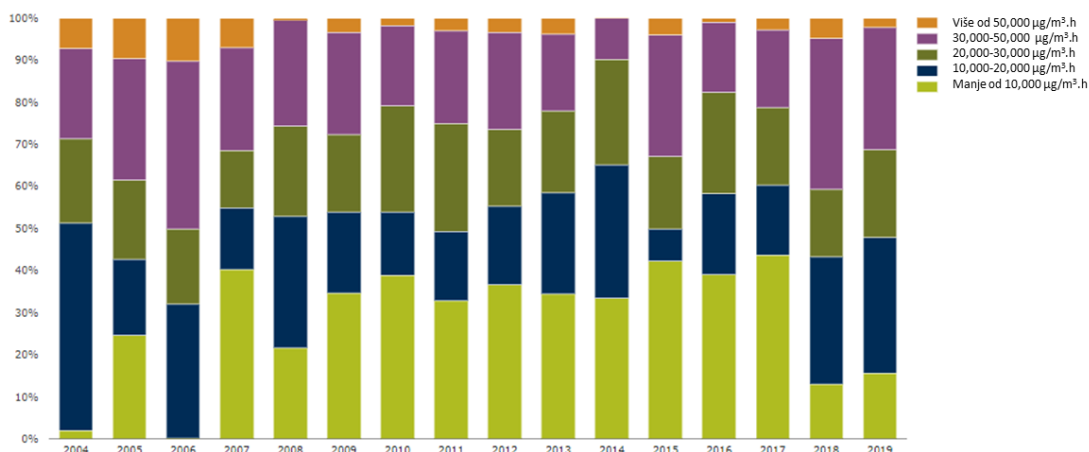
Biljke imaju kompleksan odgovor na visoke koncentracije prizemnog ozona. Na primjer, kao odgovor biljke na sušno razdoblje, dolazi do zatvaranja puči kao posljedica pada turgorskog tlaka u biljci. Kao rezultat dolazi do smanjenog unosa ozona (Taiz i sur., 2015; Pellegrini i sur., 2019). Posljedično, dolazi i do manje transpiracije (Hoshika i sur., 2015). Zatvorene puči ograničavaju unos ozona, i time je biljka zaštićena od njegovog negativnog utjecaja (Guidi i sur., 2017). Nasuprot tome, izloženost visokim koncentracijama ozona također uzrokuje i sporu ili manje učinkovitu kontrolu puči (ozonom inducirana tromost puči), što rezultira njihovim nepotpunim zatvaranjem. Rezultat nepotpunog zatvaranja dovodi do daljnjeg unosa ozona i gubitka vode time i oštećenja tkiva biljke (Hoshika i sur., 2015). Uzimajući u obzir visoku koncentraciju ozona u mediteranskoj regiji, u rasponu od 30 do 45 ppb kao godišnji prosjek, te visoku ekološku vrijednost šuma u ovoj regiji, vrlo bitno je pratiti potencijalne utjecaje ozona na mediteranske šumske ekosustave (Sicard i sur., 2013; De Marco i sur., 2019).

2.1.2.1. Parametri za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma

Šume imaju značajne funkcije u gospodarstvu, očuvanju prirode, zaštiti okoliša i pohrane ugljika (Sicard i sur., 2013.). Stoga je bilo potrebno uvesti odgovarajuće mjere za zaštitu šuma od onečišćenja ozonom. Zbog navedenih negativnih utjecaja ozona, u Europi su uvedeni parametri za zaštitu vegetacije i šuma (De Marco i sur., 2019). Primjenjuju se dvije vrste parametara; akumulirani ozon, AOT40, je parametar koji se temelji na procjeni utjecaja ozona na biljke na temelju okolne koncentracije ozona te doza fitotoksičnog ozona, PODY, koji u obzir uzima unos ozona u puči pod utjecajem okolišnih uvjeta (sunčevo zračenje, temperatura i dr.) (CLRTAP, 2017).

Trenutačno, europski standard (EC, 2008) koji se koristi za zaštitu vegetacije i šuma od negativnih utjecaja ozona je akumulirani ozon iznad praga od 40 ppb (AOT40). AOT40 je parametar koji označava zbroj razlike između jednosatnih koncentracija prizemnog ozona viših od 40 ppb ($80 \mu\text{g m}^{-3}$) određenog razdoblja (od 1. svibnja do 31. srpnja svake godine za zaštitu vegetacije, i od 1. travnja do 30. rujna za zaštitu šuma), uzimajući u obzir samo jednosatne vrijednosti izmjerene svaki dan između 8:00 h i 20:00 h po srednjoeuropskom vremenu.

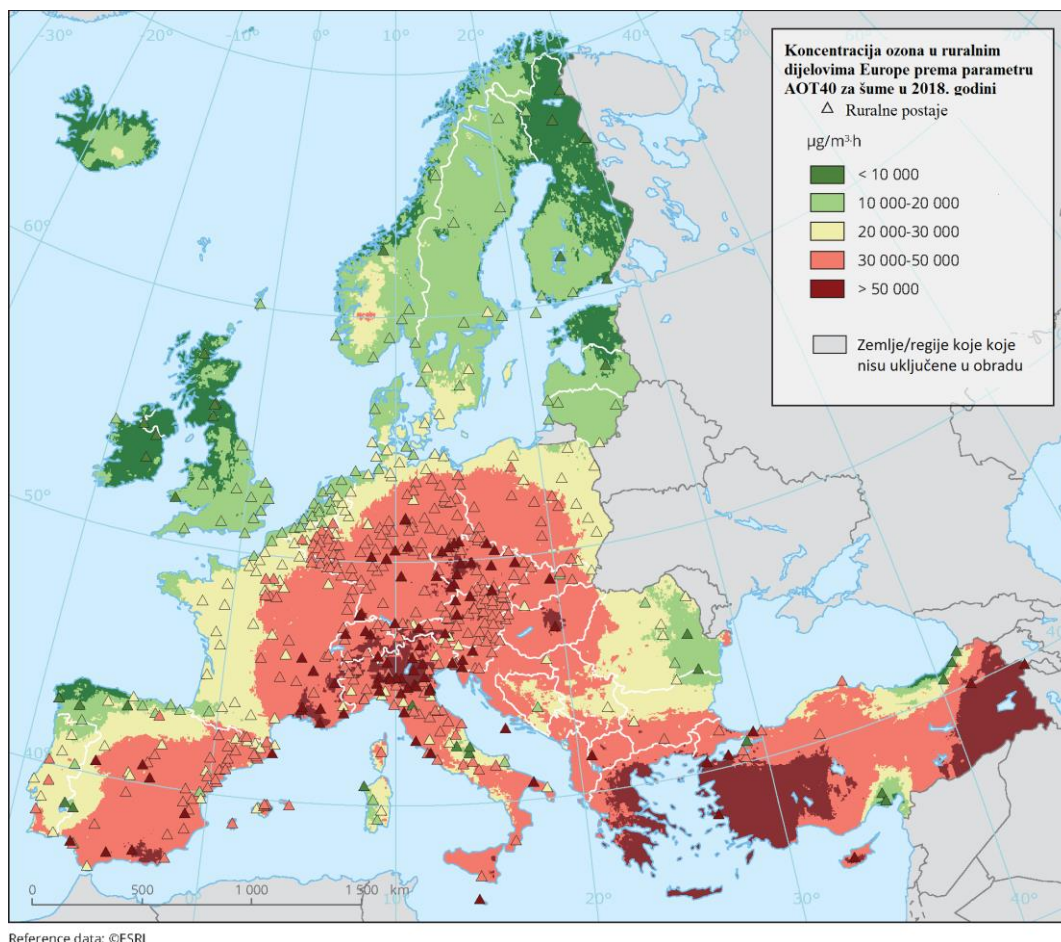
Parametar AOT40 ne daje informacije o unosu ozona u biljku i količine koje biljka može neutralizirati a da ne nastane oštećenje, već samo okolne koncentracije, stoga može dati precijenjene kritične vrijednosti. Također, u mjerenom periodu ne uključuje da mediteranske vrste mogu biti aktivne tijekom cijele godine (Anav i sur., 2016; Anav i sur., 2019; Paoletti i sur., 2019). Na Slici 1. prikazana je izloženost šuma ozonu (AOT40) u zemljama članicama EEA-32 i Ujedinjenom Kraljevstvu od 2004. do 2019 (EEA, 2021).



Slika 1. Izloženost šuma ozonu (AOT40) u zemljama članicama EEA-32 i Ujedinjenom Kraljevstvu od 2004. do 2019. Podaci za Hrvatsku uključeni su od 2011. godine (EEA, 2021)

Rezultati praćenja prizemnih koncentracija ozona u 2017. i 2018. godini na ruralnim meteorološkim postajama u mediteranskim regijama Hrvatske, koje je proveo Državni hidrometeorološki zavod, pokazali su da su dnevne srednje vrijednosti ozona od 9 000 ppb h, mjerene u periodu od svibnja do srpnja, premašile ciljanu vrijednost za zaštitu vegetacije od ozona (HAOP, 2018; HAOP, 2019). Nadalje, EMEP (eng. *European Monitoring and Evaluation Programme*) modeli procjene pokazali su da su u vegetacijskoj sezoni od 1. travnja do 30. rujna vrijednosti AOT40 bile veće od kritične razine 5000 ppb h koju je predložio UNECE za zaštitu šuma (Slika 2) (CLRTAP, 2017). Dobivene karte rizika od

utjecaja ozona (Slika 2) odgovaraju regionalnim pozadinskim koncentracijama i ne predstavljaju mjerenja lokalnih točaka u šumskim ekosustavima (EMEP, 2018). Stoga je ključno istražiti razinu ozona u šumskim ekosustavima.



Slika 2. Koncentracija ozona u ruralnim dijelovima Europe prema parametru AOT40 za šume u 2018. godini (EEA, 2020)

S obzirom da štetan utjecaj ozona na biljke ne ovisi samo o okolnoj koncentraciji već i o koncentraciji koja uđe u biljku kroz puči (CLRTAP, 2017). Prikladniji parametar za zaštitu vegetacije i šuma je PODY (eng. *Phytotoxic O₃ Dose above a threshold flux of Y*), doza fitotoksičnog ozona, koji se temelji na unosu ozona kroz puči. Prag Y predstavlja kritičnu razinu ozona ispod koje se očekuje da će se razgraditi svaka molekula ozona koja uđe kroz puči bez štetnog utjecaja (Musselman i sur., 2006). Najčešće korišteni pragovi Y za šume u Europi su $1 \text{ nmol ozona m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i $0 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ prema regionalnim modelima temeljenim na terenskim istraživanjima (Anav i sur., 2016; Sicard i sur., 2016b; CLRTAP, 2017;

Araminienè i sur., 2019). Ovaj parametar integrira učinke više klimatskih čimbenika, karakteristike vegetacije te lokalnih i fenoloških učinaka na biljke (CLRTAP, 2017). Neka su istraživanja sugerirala da je POD0 ($Y = 0 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) prikladniji za predviđanje odgovora stabala na ozon od praga POD1 ($Y = 1 \text{ nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) jer što je veći prag, dobiva se veća kumulativna greška modeliranjem protoka ozona kroz lišće (De Marco i sur., 2016).

Za izračun navedenih parametara u Europi koriste se različiti pristupi (EC, 2008; CLRTAP, 2017). Međutim, izračun parametara ozona na temelju stvarnog trajanja vegetacijskog perioda pojedine vrste, promatranjem na terenu, predstavlja realniju sliku stanja pojedine vrste. i daje točniju procjenu PODY-a vezanog za specifičnu lokaciju kao i za vegetacijsko razdoblje pojedine vrste (Paoletti i sur. 2019).

Ozon se smatra jednim od najštetnijih fitotoksičnih onečišćujućih tvari te može negativno utjecati na šume diljem svijeta, a pogotovo na mediteranske šumske ekosustave (Agathokleous i sur., 2020; Sicard i sur., 2016a). Štetni učinci ozona na različite vrste šuma na području Mediterana nisu dovoljno istraženi. NEC direktiva, eng. *National Emission Ceilings*) preporučuje se praćenje protoka ozona (POD1) i procjena njegovih prekoračenja u realnim uvjetima (De Marco i sur., 2019).

2.2. Motrenje stanja mediteranskih šuma u RH i u Europi

Mediteranske šume u Hrvatskoj su od velike važnosti te pokrivaju više od 30 % površine Hrvatske (FAO, 2018.). Oni su vjerojatno najugroženiji šumski ekosustavi u Hrvatskoj zbog klimatskih uvjeta koji vladaju na Mediteranu. U ovom istraživanju praćene su četiri najzastupljenije šumske vrste: hrast medunac, hrast crnika, alepski bor i crni bor.

U Hrvatskoj klimatogena mediteranska šumska vrsta je hrast crnika (*Quercus ilex* L.) na eumediteranu i hrast medunac (*Quercus pubescens* Willd.) na submediteranu. Uz njih, na navedenim područjima rastu dvije pionirske crnogorične vrste drveća, alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) u eumediteranu i crni bor (*Pinus nigra* J. F. Arnold.) u submediteranu (Prpić i sur., 2011a). Središnji i južni dio hrvatskog priobalja (područje Dalmacije) najvećim dijelom prekrivaju šume alepskog i crnog bora dok su šume hrasta crnike i hrasta medunca zastupljene u različitim degradacijskim oblicima. Sjevernim dijelom priobalja (područje Istre) dominiraju šume hrasta medunca i crnike u odnosu na alepski i crni bor.

a) Šume hrasta medunca (*Quercus pubescens* Willd.)

Hrast medunac je listopadno kserofitno, termofilno drvo od oko 15 do 20 m visine, promjera debla 40-50 cm. Medunac je vrsta svjetla, osrednje guste krošnje (Slika 3) koja preferira dobro drenirana vapnena tla, ali raste i na kiselim tlima u toplijim područjima (Prpić i sur., 2011b).



Slika 3. Šuma hrasta medunca (*Quercus pubescens* Willd.),(autor: T. Dubravac)

Kao rezultat velike prilagodljivosti ima širok raspon rasprostranjenosti. U Hrvatskoj zauzima submediteran od Savudrije do najjužnije granice hrvatskog priobalja u različitim šumskim zajednicama. U reljefu toga prostora uzdiže se najviše do 750 m n. v.

Dugogodišnja praćenja zdravstvenog stanja šuma u RH ukazuju na značajnu osutost koja se mijenja ovisno o godini. U periodu od 2007. do 2016. godine zabilježena je prosječna značajna osutost stabala od 39 %. U 2007. godini zabilježen je najveći postotak značajno osutih stabala od 53 %, dok je najmanja zabilježena osutost bila u 2010. godini (30 %) (Potočić i sur., 2018).

U navedenim godinama, koncentracija biogenih elemenata (N, P, K, S) u lišću hrasta medunca kreće se u optimalnom rasponu, izuzev Ca, kojeg ima iznad optimalne vrijednosti te Mg koji je ispod optimalne vrijednosti.

Prosječni godišnji debljinski prirast hrasta medunca u 2016. iznosio je 0,165 cm (Potočić i sur., 2018).

b) Šume hrasta crnike (*Quercus ilex* L.)

Hrast crnika je 8-10 m visoko zimzeleno, kserofilno, termofilno stablo, kratkog debla prsnog promjera i preko 1,5 m. Ima gustu razgranatu, široku krošnju (Slika 4.) Nema velike zahtjeve prema tlima, preferira duboka tla. Može podnijeti različite klimatske uvjete, od toplih do vrlo toplih (Prpić i sur., 2011b).



Slika 4. Šuma hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) (autor: T. Dubravac)

Crnika je najznačajnija vrsta šumskih ekosustava toplijeg područja hrvatskog priobalja. U Hrvatskoj zauzima uski priobalni pojas jugozapadne i južne Istre, najjužniji dio otoka Cres, Lošinja, Raba, Paga i susjedne manje otoke. Na kopnu se proteže od Zadra prema jugu te na Braču, Hvaru, Korčuli, Mljetu i ostalim otocima južne Dalmacije (Prpić i sur., 2011b).

Prosjek značajno osutih stabala u od 2007. do 2016. godine u šumi hrasta crnike bio je 19 %. Prema utvrđenim vrijednostima značajne osutosti, može se utvrditi da je hrast crnika najmanje osuta vrsta među ispitivanim vrstama.

Za navedenu vrstu u 2017. godini, koncentracija biogenih elemenata (N, Ca, Mg, S) u lišću hrasta crnike kreće se u optimalnom rasponu. Vrijednosti P i K bile su ispod optimalne vrijednosti (Mellert i Göttlein, 2012).

Prosječan godišnji debljinski prirast u 2017. godini svih praćenih stabala iznosio je 0,068 cm.

c) Šume alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.)

Alepski bor je 10-20 m visoka brzo rastuća četinjača često nepravilnog zakrivljenog debla, prsnog promjera do 80 cm, s rijetkom krošnjom (Slika 5). Izrazita je vrsta svijetla, kserofit i podnosi visoke temperature. Alepski bor raste na svim podlogama i svim vrstama tla (Prpić i sur., 2011b).



Slika 5. Alepski bor (*Pinus halepensis* Mill.) (autor: I. Limić)

U Hrvatskoj prirodno dolazi na dalmatinskim otocima južno od Krapnja te obalom južnije od Splita. S obzirom na ekološke uvjete, alepski bor je pionirska vrsta i koristi se za pošumljavanje degradiranih površina diljem hrvatskog Sredozemlja, od Istre do Prevlake.

Prosjek značajno osutih stabala alepskog bora na području Hrvatske za period od 2007. do 2016. iznosio je 50 %. Značajna osutost se smanjila u odnosu na mjerenje izvršeno 2009. godine (80 %), kada je zabilježena najveća osutost. Iako su prisutne varijacije ovisne o godini, u 2011. godini zabilježeno je najmanje osutih stabala (25 %) (Potočić i sur., 2018).

Koncentracija biogenih elemenata (N, P, K, Mg, S) za period 2014.-2016. u iglicama alepskog bora kreće se u optimalnom rasponu, izuzev kalcija (Ca) kojeg ima iznad optimalne vrijednosti te fosfora koji je na gornjoj granici optimalne vrijednosti (Potočić i sur., 2018).

d) Šume crnog bora (*Pinus nigra* J. F. Arnold.)

Crni bor je brzorastuća četinjača visine 30 do 40 m, prsnog promjera do 1 m ili i više. Uspijeva na visinama od 200 do 1400 m n. v. Kserofilna je vrsta koja dobro podnosi temperaturne ekstreme kao što su ljetne vrućine i suša, mraz i zimske hladnoće, te je otporna na vjetar. Crni bor podnosi umjerenu zasjenu te ima osrednje gustu krošnju (Slika 6.). S obzirom na njegov diskontinuiran areal crni bor u Hrvatskoj nalazimo uzduž Dinarida, ali i na otocima Braču, Hvaru, Korčuli i na poluotoku Pelješcu (Prpić, i sur., 2011b).

Za period od 2007. do 2016. godine prosječna vrijednost značajno osutih stabala crnog bora na području Hrvatske bila je 60 %. U 2010. godini zabilježen je najveći postotak značajno osutih stabala (79 %). Iako su prisutne varijacije ovisno o godini, u 2007. i 2008. godini zabilježeno je najmanje osutih stabala (50 %). Prema utvrđenim vrijednostima značajne osutosti, može se utvrditi da je crni bor najoštećenija vrsta drveća u Hrvatskoj (Potočić i sur., 2018).

Koncentracija biogenih elemenata (N, K, Mg) u 2017., godini u iglicama crnog bora kreće se u optimalnom rasponu. Vrijednosti P, K i S bile su ispod optimalne vrijednosti, dok su vrijednosti Ca bile iznad optimalne vrijednosti.



Slika 6. Crni bor (*Pinus nigra* J. F. Arnold.) (autor: I. Limić)

2.2.1. Stanje atmosferskoga onečišćenja u Hrvatskoj

Potencijalni ekološki utjecaji atmosferskoga taloženja, osobito taloženja dušika, na području hrvatskog Mediterana, ali i Mediterana općenito, nedovoljno su istraženi unatoč važnosti ove regije poznate po velikoj biološkoj raznolikosti (Ferretti i sur., 2014; Aguilhaume i sur., 2017; García-Gómez i sur., 2018). Šumski ekosustavi na Mediteranu su pod utjecajem raznih okolišnih faktora poput visokih temperatura, suše te oskudijevaju vodom što pogoduje čestim požarima izazvanim prirodnim ili antropogenim djelovanjem. Zbog navedenog u ovim ekosustavima često dolazi do akumulacije suhog taloženja. Važno je posvetiti se razumijevanju funkcioniranja ovih ekosustava u svrhu njihove zaštite te na koji način reagiranja ovi sustava na povećano taloženje dušikovih spojeva. Stoga se nameće potreba za opsežnijim i detaljnijim istraživanjima za pojedinu regiju i svaki tip vegetacije. Ovim istraživanjem donijet će se nova saznanja za četiri najzastupljenije vrste na istočnom dijelu Jadrana.

Onečišćujuće tvari u atmosferu prenose se zračnim masama iz drugih dijelova Hrvatske kao i susjednih zemalja te dolaze i do udaljenih područja koja su smještena daleko od izvora onečišćenja (Skevin-Sović i sur., 2012, HAOP, 2018). Od uvođenja Zakona o zaštiti zraka mijenja se trend prekograničnog onečišćenja kiselim spojevima što je rezultiralo smanjenjem onečišćenja spojevima sumpora, dok je NO_x spojevima neznatno je povećan (EEA, 2019). Određivanjem kemijskog sastava taloženja utvrdilo da onečišćujuće tvari koje dolaze iz udaljenih područja su u postotku 80 % sumpor, 70 % dušik i amonijak (NH₃) oko 50 %. Ove količine štetnih tvari na našem području uglavnom dolaze iz susjednih zemalja, dok je najveći doprinos emisije amonijaka poljoprivredni sektor kao rezultat primjene i rukovanja prirodnim gnojivima (HAOP, 2018). U Hrvatskoj je u 2017. godini emisija amonijaka prešla gornju graničnu vrijednost za 25 %, vrijednost postavljenu Direktivom o smanjenju nacionalnih emisija atmosferskih onečišćujućih tvari (EEA, 2019). Druga država koja je prešla gornju graničnu vrijednost bila je još jedna mediteranska zemlja, Španjolska, i to za 47 %. Ove dvije zemlje su konstantno premašivale gornju granicu za amonijak u razdoblju od 2013. do 2016. (EEA, 2019). Što se tiče gornje granice za NO_x tijekom 2017. i 2018. u mediteranskom dijelu Hrvatske, nisu izmjerene dovoljno visoke koncentracije koje uzrokuju onečišćenje zraka (HAOP 2018; HAOP 2019; EEA 2019).

Budući da se onečišćujuće tvari mogu transportirati stotinama, pa čak i tisućama kilometara, istraživanja o utjecaju atmosferskoga onečišćenja u mediteranskim šumskim ekosustavima od iznimne su važnosti.

2.2.2. Dosadašnja istraživanja o utjecaju atmosferskoga taloženja i prizemnog ozona u mediteranskim šumskim ekosustavima

Posljednjih desetljeća atmosfersko onečišćenje raste u mnogim područjima u svijetu kao posljedica kontinuiranog povećanja antropogenih emisija u industrijaliziranim regijama (De Marco i sur, 2022). Posljedično, posljednjih godina sve je više radova na području Mediterana posvećeno utjecajima onečišćujućih spojeva, dušika i ozona na šumske ekosustave (De Marco i sur., 2014; Aguilhouette i sur., 2016; Izquieta-Rojano i sur., 2016; Proietti i sur., 2016; Jakovljević i sur., 2019; Paoletti i sur., 2019; Jakovljević i sur., 2021; Lovreškov i sur., 2021). U pojedinim šumskim ekosustavima zabilježena su velika taloženja dušika kao posljedica atmosferskoga onečišćenja (Aguilhouette i sur., 2016; Izquieta-Rojano i sur., 2016). Iako taloženje dušika može imati pozitivan utjecaj na rast šuma, u uvjetima koji oskudijevaju hranjivima ubrzani rast dovodi do neravnoteže hranjivim tvarima, smanjuje otpornost na

druge izvore stresa te može utjecati i na bioraznolikost (Bobbink i sur., 2010; Bobbink i Hettelingh, 2011; Ochoa-Hueso i sur., 2011; De Marco i sur., 2014). Spojevi dušika su jedni od prekursora ozona te s njihovim povećanjem ili smanjenjem dolazi do povećanja ili smanjenja ozona. Izloženost visokim koncentracijama ozona i povišenim temperaturama utječe na prirast stabla odnosno na smanjenje njegovog rasta i produktivnosti (Hoshika i sur., 2015; Proietti i sur., 2016; Paoletti i sur., 2019). Nadalje visoke koncentracije ozona mogu uzrokovati vizualna oštećenja na lišću i osutost (Sicard i sur., 2016; Sicard i Dalstein-Richier, 2015).

S obzirom na važnost mediteranske regije kao izvora bioraznolikosti od iznimne je važnosti pratiti stanje šuma na tom području s obzirom na njihovu ranjivost i podložnost okolišnim izvorima stresa (Myers i sur., 2000; Paoletti, 2006). Zahvaljujući uspješnom provođenju politika o smanjenju onečišćenja dolazi do postepenog smanjenja primarnih onečišćujućih tvari u Europi, osobito dušikovih i sumporovih spojeva. Bez obzira na primijenjene mjere zaštite, visoke koncentracije ozona i dalje su prisutne (Proietti i sur., 2016; Araminienè i sur., 2019; De Marco i sur., 2019; Jakovljević i sur., 2021).

2.2.3. Europski program za dugotrajno praćenje atmosferskog onečišćenja na šumske ekosustave

Prekograničnim prijenosom onečišćujućih tvari, onečišćenje zraka može uzrokovati štetu u područjima koja su daleko od izvora emisija. S ciljem smanjenja atmosferskog onečišćenja te procjene njegovih utjecaja na razne ekosustave, osnovana su tijela i doneseni zakoni na razini Europe koji provode politiku smanjenja onečišćenja. Međunarodni program za procjenu i motrenje štetnih utjecaja onečišćenja zraka na šume (eng. *International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests*, ICP Forests) pokrenut je 1985. u skladu s Konvencijom o dalekosežnom prekograničnom onečišćenju zraka iz 1979. godine (eng. *Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution*, CLRTAP), kako bi se provodilo višenamjensko dugoročno praćenje utjecaja onečišćenja zraka na šume. Godine 1986. države Europe dogovorile su shemu o zaštiti šuma od atmosferskog onečišćenja. Danas, praćenje stanja šuma u Europi predstavlja jedan od najvećih svjetskih sustava biomonitoringa. Sustav praćenja i rezultati koji se njime postižu nisu važni samo za provođenje politike smanjenja onečišćenja, već i za druge procese međunarodnih

politika zaštite okoliša, poput onih usmjerenih na biološku raznolikost, održivo gospodarenje šumama i klimatske promjene (De Marco i sur, 2022).

Smanjenje zakiseljavanja, eutrofikacije i stvaranja prizemnog ozona postavljanjem nacionalnih emisija za onečišćujuće tvari koje bi mogle dovesti do tih pojava (SO_2 , NO_2 , VOS i NH_3) glavni je cilj Gothenburškog protokola. Polazeći od kritičnih opterećenja koji predstavljaju kvantitativne vrijednosti iznad kojih bi moglo doći do neželjenih učinaka na okoliš i zdravlje ljudi, Gothenburški protokol uvodi: (i) kritična opterećenja kiselosti s učinkom zakiseljavanja, (ii) kritična opterećenja ekosustava hranjivim dušikom (s učinkom eutrofikacije) i (iii) kritične razine ozona (s učinkom prizemnog ozona). Kritična opterećenja i kritične razine utvrđuju se u skladu s Priručnikom o metodologijama i mjerilima za kartiranje kritičnih razina/opterećenja, zemljopisnih područja i vrsta ekosustava u kojima su oni prijedeni (Uredba, 2009).

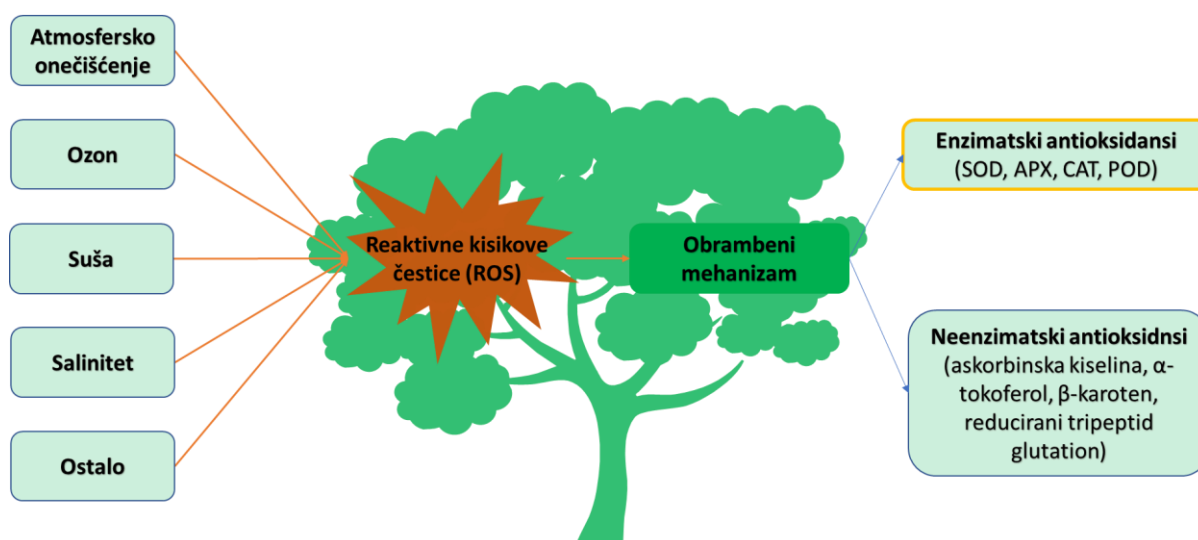
Praćenje u okviru Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume (UNECE – ICP Forests) zahtjeva implementaciju harmoniziranih metoda i dodatnih mjera kontrole kvalitete što osigurava usporedivost prikupljenih podataka na razini Europe. Međunarodna standardizacija metoda dovela je do konzistentnih praksi uzorkovanja širom Europe i čini ICP Forests jedinstvenim u svijetu. Ciljevi ICP Forests-a su osigurati periodični pregled prostornih i vremenskih varijacija stanja šuma te njihovih uzročno-posljedičnih veza između stanja šumskih ekosustava i antropogenih i prirodnih čimbenika stresa (ponajprije zračnog onečišćenja), putem intenzivnog motrenja šuma na sustavno postavljenoj mreži točaka širom Europe. Na ovaj način prikupljaju se podaci o kvaliteti zraka, atmosferskom taloženju, stanju ishrane drveća, kemijskom i fizikalnom sastavu tala, fenologiji, bioraznolikosti, rastu i prirastu stabala i klimi (Michel i Seidling, 2016). Pomoću prikupljenih podataka prati se zdravstveno stanje šuma te uvidom u navedene podatke može se dobiti uvid u potencijalne izvore oksidativnog stresa na biljke.

2.3. Oksidativni stres i njegov utjecaj na biljke

Klimatske promjene uz razne rizične faktore poput atmosferskog onečišćenja, ozona, dušikovih spojeva dovode biljke u stanje stresa (Allen i sur., 2010). U takvim uvjetima vrlo bitnu ulogu ima obrambeni mehanizmi, osobito u održavanju normalne funkcionalnosti kao i samom preživljavanju biljke. Budući da su biljke organizmi koji se ne kreću, tijekom

evolucije morale su razviti razne obrambene mehanizme protiv raznih izvora stresa (Hasanuzzaman i sur., 2020).

Stres se definira kao bilo koji vanjski čimbenik koji narušava ravnotežu unutar biljke i time je sprječava u njenom razvoju u odnosu na optimalne uvjete (Taiz i sur., 2015). Razni izvori stresa ističu se posebno u osjetljivim bioklimatskim regijama i dovode do povećanih rizika uzrokovanih raznim biotičkim i abiotičkim faktorima (Sicard i sur., 2013). Jedna od posebno osjetljivih bioklimatskih regija je i Mediteranska regija. Neki od glavnih abiotičkih faktora na području Mediteranske regije su atmosfersko onečišćenje, visoka temperatura, ozon, suša, salinitet i drugi (Slika 7). Biotički izvori stresa uključuju razne štetnike poput borovog četnjaka, nematode drva, cvilidrete, potkornjaci, gljive uzročnici osipanja iglica i dr. (Pernek i sur., 2012). U slučaju kratkotrajnih epizoda stresa (minute/sati) dolazi do fizioloških i metaboličkih prilagodbi, dok kod dugotrajnih izlaganja dolazi do preraspodjele resursa i morfoloških promjena.



Slika 7. Utjecaj različitih čimbenika abiotičkog stresa na biljku

Biljke su u svrhu zaštite od izvora stresa, biotičkog i/ili abiotičkog, razvile razne mehanizme kako osjetiti promjenu u okolini i kako se zaštititi. Vanjski izvori stresa uzrokuju poremećaje u normalnom funkcioniranju biljaka što uzrokuje veću proizvodnju reaktivnih kisikovih čestica koje stvaraju oštećenja unutar biljke (Sharma i sur., 2012; Gull, 2019; Landi i sur., 2019; Xie i sur., 2019). Stoga promjene u okolini daju do znanja biljci za potrebom aktivacije obrambenih mehanizama, s ciljem uklanjanja nepoželjnih produkata nastalih kao posljedica oksidativnog stresa.

2.3.1. Uzročnici abiotičkog stresa

Biljke su nerijetko izložene raznim kombinacijama biotičkih i abiotičkih izvora stresa koji utječu na njihov rast, produktivnost i distribuciju. Sve su češći nepovoljni vanjski uvjeti uzrokovani klimatskim promjenama i antropogenim učincima, poput suše, visokih temperatura, ozona, atmosferskog onečišćenja, saliniteta koji biljku dovode u stanje stresa. Istraživanja su pokazala da biljke imaju različit odgovor ovisno radi li se o jednom ili više izvora stresa te ovisno o vrsti biljke (Cotrozzi i sur., 2016, Cotrozzi i sur., 2017; Fusaro i sur., 2017; Landi i sur., 2019; Pellegrini i sur., 2019).

Atmosfersko onečišćenje

Jedan od abiotičkih uzročnika stresa je i atmosfersko onečišćenje. Među najznačajnije uzročnike atmosferskog onečišćenja spadaju dušikovi spojevi, kiseli spojevi i ozon te su istovremeno i jedni od uzročnika oksidativnog stresa (Zhang, i sur., 2018a; Zhang, i sur., 2018b).

Dušik je jedan od ograničavajućih elemenata u mediteranskoj regiji koja je poznata po tome da oskudijeva hranjivim tvarima. S povećanjem industrijalizacije, povećala se i količina dušika u atmosferi. Taložeći se na vegetaciji, dušikovi spojevi ispiranjem dolaze u tlo gdje mogu uzrokovati eutrofikaciju i pretjeran rast biljaka. Pretjerani i prebrzi rast biljke dovodi do neravnoteže s ostalim hranjivima te takva biljka je podložnija vanjskim negativnim utjecajima (Bobbink i sur., 2011). Učinci taloženja dušika mogli bi imati pozitivan efekt u obrani biljke od stresa. U Italiji ispitivao se učinak dušika, ozona i njihova interakcija na dvije mediteranske vrste drveća, *Fraxinus ornus* L. (crni jasen, listopadno) i *Quercus ilex* L. (hrast crnika, zimzeleno), koje imaju različite karakteristike lišća i strategije korištenja hranjivih tvari i vode. Dodavanje dušika sadnicama rezultiralo je većom koncentracijom dušika u listu u crnog jasena, dok je blago povećanje uočeno u vrsti hrasta crnike. Hrast crnika je razvio mehanizam izbjegavanja ozona zatvaranjem puči, potvrđujući značajnu toleranciju ove vrste na ozon. Dušik je umanjio štetne učinke ozona u crnom jasenu: hipotetički mehanizam djelovanja uključivao je proizvodnju dušikovog oksida kao prve antioksidacijske barijere, nakon čega je uslijedio enzimski antioksidativni odgovor. Antioksidativna enzimska aktivnost bila je niža u biljkama tretiranim i s ozonom i s dušikom iako se proizvodnja reaktivnih kisikovih čestica nije razlikovala između tretmana (Fusaro i sur., 2017). Budući da je ozon fitotoksičan i oštećuje tkivo biljke, praćenjem njegovih koncentracija može značajno pridonijeti u proučavanju mehanizmima obrane biljka u vanjskim uvjetima.

Ozon

Biljke izložene štetnim razinama ozona aktiviraju svoje antioksidativne obrambene mehanizame u svrhu smanjenja negativnog učinka oksidativnog stresa. Posljedice zbog povećanih koncentracija prizemnog ozona vidljive su kao smanjena stopa fotosinteze, povećana osutost, smanjeni rast, smanjeni prinos te nastanak vidljivih oštećenja (Schaub i Calatayud, 2013; De Marco i sur., 2014; Sicard i sur., 2016b; Mills i sur., 2018; Zhang, i sur., 2018a).

Velike količine sunčevog zračenja i visoke temperature koji prevladavaju u mediteranskoj regiji vrlo su pogodni za stvaranje ozona te dovode ekosustave u opasnost od stvaranja oksidativnog stresa i mogućih oštećenja (Paoletti, 2006). Biljke se na više načina mogu nositi s visokim koncentracijama ozona u okolišu. Brane se na način da aktiviraju mehanizme tolerancije zatvaranjem puči kako bi se spriječio unos ozona ili aktiviranjem antioksidativnog mehanizma obrane i raznih mehanizama koji uklanjaju nastalu štetu (Hasanuzzaman i sur., 2013). Ulaskom ozona u biljku kroz puči nastaju šetni ROS-ovi koji uzrokuju štetu na lipidnoj membrani, smanjuje se membranski potencijal, povećava unos kalcija, inhibira protonska pumpa (održava pH homeostazu) i povećava membranska permeabilnost (Hoshika i sur., 2015). Također, može oštetiti i proteine, ugljikohidrate i nukleinske kiseline što u krajnjem slučaju dovodi do smrti stanice. Oštećenje uzrokovano ozonom manifestira se kao promjena boje lista, nekroza, a stupanj oštećenja ovisit će o njegovoj koncentraciji kao i o biljnoj vrsti (Landi i sur., 2019).

Suša

Utjecaji ozona i visokih temperatura koje uzrokuju suše vrlo često su zajedno istraživani (Alonso i sur., 2001, Alonso i sur., 2014; Landi i sur., 2019; Pellegrini i sur., 2019; Zalloni i sur., 2019). Kada nastupi dehidracija stanice dolazi do pada turgorovog tlaka, povećane toksičnosti iona i inhibicije fotosinteze. Tijekom sušnog razdoblja biljke adaptiraju svoju morfološku strukturu raspodjelom više ugljika u korijenov sustav te smanjivanjem veličine listova što, u konačnici, uzrokuje povećanu osutost (De Marco i sur., 2014). Na primjer, u slučaju promjene dostupnosti količine vode jedan od načina kako biljka regulira gubitak vode je zatvaranjem puči što sprječava gubitak vode transpiracijom (Landi i sur., 2019). Posljedično, zatvaranjem puči dolazi do smanjenja unosa CO₂ u list time smanjujući fotosintezu i smanjen rast (Hoshika i sur., 2015; McDowell i sur., 2008; Proietti i sur., 2016).

Salinitet

Salinitet tla predstavlja globalnu prijetnju svjetskoj poljoprivredi zbog pretjerane količine kloridnih i natrijevih iona u tlu, osobito u sušnim krajevima a rezultira smanjenjem prinosa usjeva i produktivnosti biljaka (Xie i sur., 2019). Salinitet na mnogo načina smanjuje rast biljaka i prinos. Dva primarna izvora stresa koja djeluju na biljku, a posljedica je velike koncentracije soli, su osmotski stres i toksičnost iona (Taiz i sur., 2015; Xie i sur., 2019). Potencijal osmotskog tlaka u otopini tla premašuje osmotski tlak u biljnim stanicama zbog prisutnosti više soli, pa time ograničava sposobnost biljaka da preuzmu vodu i minerale poput K^+ i Ca^{2+} (Gull, 2019; Xie i sur., 2019). Visoke količine soli uzrokuju denaturaciju proteina i nestabilnost membrane što dovodi do smanjenja rasta nadzemnog dijela biljke te inhibicije fotosinteze. Utjecaj povišene koncentracije soli odražava se kroz dvofazni proces: brzi odgovor biljke na visok osmotski tlak u zoni korijena i sporiji odgovor uzrokovan akumulacijom Na^+ (i Cl^-) u lišću. Prva faza, faza osmotskog tlaka dovodi do smanjenog rasta izbojka sa smanjenom ekspanzijom lista i slabijim stvaranjem bočnih pupova. Druga faza počinje s akumulacijom toksične količine Na^+ u lišću što posljedično dovodi do inhibicije fotosintetskih i biosintetskih procesa (Taiz i sur., 2015). Istraživanje na sadnicama vrste hrasta crnike pokazalo je da unatoč velikim količinama soli u lišću, nisu uočene vidljiva oštećenja (Guidi i sur., 2017). Izlaganjem biljaka povećanoj količini soli te naknadno povećanim količinama ozona nisu rezultirala vidljivim oštećenjima na lišću (Guidi i sur., 2017).

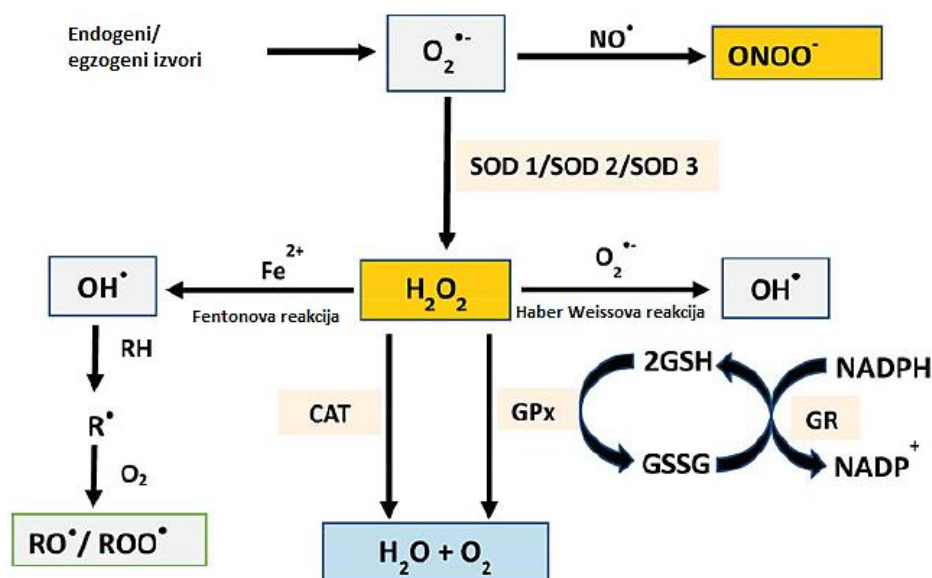
2.3.2. Nastanak reaktivnih kisikovih čestica (ROS)

Reaktivne kisikove čestice (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) se kontinuirano proizvode kao nusprodukti različitih metaboličkih mehanizama koji su lokalizirani u različitim staničnim dijelovima kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksizomi (Sharma i sur., 2012). ROS-ovi u biljci imaju zapravo dvije uloge:

- (i) služe kao glasnici kada se biljka nalazi pod stresom te time prenose informaciju za aktivaciju obrambenih mehanizama biljke te, druga uloga,
- (ii) nanose štetu biljci akumulacijom čestica u stanicama ako ih se previše akumulira.

U stanju oksidativnog stresa, biljka proizvodi povećane količine reaktivnih kisikovih čestica ROS-a. ROS uglavnom čine slobodni radikali (superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal ($\bullet OH$)) ili neradikalne molekule (vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3) i singlet kisik (1O_2)). Nastajanje i pretvorba raznih ROS-a prikazana je na Slici 8.

Sam kisik (O_2) je bezopasna molekula jer u svom osnovnom stanju ima dva nesparena elektrona s paralelnim spinom što ga čini paramagnetskim i stoga je malo vjerojatno da će sudjelovati u reakcijama s organskim molekulama, ako se ne aktivira. Aktivacija O_2 može se dogoditi pomoću dva različita mehanizma: (i) apsorpcija dovoljne energije za preokretanje spina na jednom od nesparenih elektrona i (ii) postupno monovalentna redukcija. U prvom se formira 1O_2 , dok se u drugom O_2 sekvencijalno reducira na $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , O_3 i $\bullet OH$ (Sharma i sur., 2012). Značajno povećanje razine ROS-a utječe na veliki broj staničnih, fizioloških i biokemijskih funkcija, što može dovesti do raznih oštećenja i poremećaja poput poremećaja stanične membrane deoksidacijom ugljikohidrata, peroksidacije lipida, denaturacije proteina deaktivacije enzima i uništavanje DNA, RNA, enzima i pigmenta. Koncentracija ROS-a mogu se značajno i brzo povećati zbog narušene ravnoteže između proizvodnje i uklanjanja ROS-a i kao posljedica intenzivnog oksidativnog stresa, molekule ROS-a akumuliraju se u stanicama. Sve navedeno može dovesti do gubitka i kvalitete prinosa biljke i njene produktivnosti (Contran i sur., 2013; Pellegrini i sur., 2019).



Slika 8. Nastajanje i pretvorba raznih reaktivnih kisikovih čestica (ROS). Kratice: CAT katalaza, GR glutation reduktaza. GPX glutation peroksidaza. SOD superoksid dizmutaza, GSH reducirani glutation, GSSG oksidirani glutation (Bhatla i Lal, 2018)

U normalnim uvjetima, molekule ROS-a sintetiziraju se kao produkti biljnog metabolizma uslijed aerobnog načina života te služe kao signalne molekule. U slučaju povećane koncentracije, kada biljka više ne može neutralizirati nastale količine ROS-a, biljka se nalazi u stanju oksidativnog stresa te aktivira niz fizioloških i biokemijskih reakcija (Gill i Tuteja, 2010; Guidi i sur., 2017; Saunier i sur., 2018). Procijenjeno je da iz oko 1-2 % unesenog kisika biljka sintetizira ROS u različitim organelima stanice poput kloroplasta, mitohondrija, peroksisoma, staničnoj membrani i drugim dijelovima u biljci (Sharma i sur., 2012).

Kloroplast je organel u kojem se kod svih biljaka i nekih alga odigrava fotosinteza. Ovdje se odvija proces pretvaranja svjetlosne u kemijsku energiju i smatra se glavnim mjestom proizvodnje ROS-a (Suzuki i sur., 2012; Taiz i sur., 2015). Kisik koji nastaje u kloroplastima tijekom fotosinteze može prihvatiti elektrone koji prolaze kroz fotosustave, pa rezultira stvaranjem $O_2^{\bullet-}$. Ova čestica može stvoriti još reaktivniju i destruktivniju česticu, $\bullet OH$. Razni abiotički stresovi, poput velike količine svjetlosti, suše, saliniteta povećavaju proizvodnju ROS-a u kloroplastima (Suzuki i sur., 2012; Hasanuzzaman i sur., 2020).

Mitohondriji smatraju se glavnim mjestom proizvodnje ROS-a, poput H_2O_2 . Mitohondriji mogu proizvesti ROS na nekoliko mjesta u transportnom lancu elektrona (ETC). U mitohondrijima se odvija izravna redukcija kisika u $O_2^{\bullet-}$. Biljni mitohondriji mogu kontrolirati stvaranje ROS-a pomoću sustava za rasipanje energije (Gill i Tuteja, 2010; Suzuki i sur., 2012). Stoga mitohondriji mogu odigrati središnju ulogu u adaptaciji stanica na abiotički stres, za koji je poznato da izaziva oksidativni stres na staničnoj razini (Suzuki i sur., 2012).

Peroksisomi su mala, obično sferična mikrotijela omeđena jednostrukom dvoslojnom membranom lipida. Peroksisomi su podstanične organele s bitnim oksidativnim tipom metabolizma i vjerojatno su glavna mjesta unutarstanične proizvodnje ROS-a. Poput mitohondrija i kloroplasta, peroksisomi proizvode $O_2^{\bullet-}$ radikale kao posljedicu njihovog normalnog metabolizma. U peroksisomima su utvrđena dva mjesta stvaranja $O_2^{\bullet-}$, u matriksu organela i membrani peroksisoma. Peroksisomi su glavna mjesta proizvodnje čestice H_2O_2 (Sharma i sur., 2012).

Biljka proizvodi ROS-ove i u ostalim dijelovima stanice kao što su endoplazmatski retikulumu, stanična membrana, stanična stjenka te apoplast (Mittler, 2002).

2.3.3. Prilagodba biljaka na abiotičke izvore stresa

Tolerancija stresa kao jedan od mehanizma obrane omogućuju biljkama da se odupru posljedicama uzrokovanim vanjskim izvorima stresa razvojem otpornih struktura i fizioloških procesa. Primjer tolerancije na abiotičke izvore stresa su: ranije dozrijevanje, zatvaranje puči (sprječava preveliku transpiraciju, ali reducira i fotosintezu) te pojačano nakupljanje različitih osmolita koji održavaju turgor biljke i omogućavaju normalan metabolizam i u uvjetima vodnog stresa (Hasanuzzaman i sur., 2013, 2020).

Izbjegavanje stresa, kao drugi oblik mehanizma obrane, cilj je sprječavanje ili minimiziranje izloženosti stresnim uvjetima (Taiz i sur., 2015). To može postići različitim strategijama: promjenom orijentacije lisne plojke i postavljanjem u paralelni položaj u odnosu na smjer Sunčevih zraka, hlađenjem površine lista transpiracijom, zatvaranjem puči u uvjetima manjka vode, povećanjem gustoće puči i povećanjem gustoće žila ksilema. Smanjenje apsorpcije Sunčeve svjetlosti se može postići i refleksijom, pa su na biljkama često prisutne dlake i epikutikularni voskovi specifičnih struktura koje povećavaju refleksiju svjetlosti. Biljke koje imaju obilje vode hlade se intenzivnom transpiracijom. Neke druge su evoluirale tako da izbjegnu topli dio godine ostvarujući svoj reproduktivni ciklus u hladnijem dijelu godine. Toplotni stres se često javlja u kombinaciji s manjkom vode (sušom), pa je ponekad teško odrediti na koji od ta dva stresna uvjeta biljka reagira (Bhatla i Lal, 2018; Hasanuzzaman i sur., 2013).

Kako bi se spriječila šteta uzrokovana oksidacijom bitnih molekula (proteini, DNA, RNA, lipidi) unutar stanice, ROS-ove neutraliziraju posebne molekule, enzimi i antioksidansi. Biološki antioksidansi su male molekule koje prihvaćaju elektron s ROS-a i neutraliziraju ga. Najpoznatiji neenzimatski antioksidansi su askorbinska kiselina (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E) i β -karoten (vitamin A), reducirani tripeptid glutation (GSH u reduciranom obliku i GSSG u oksidiranom obliku) koji direktno reagiraju s ROS-om što dovodi do njihovog uklanjanja (Taiz i sur., 2015).

Uz ove antioksidanse, biljke su razvile i antioksidativne enzime. U ove enzime ubrajaju se superoksid dizmutaza (SOD), askorbat peroksidaza (APX), katalaza (CAT), peroksidaza (POD), koji pomažu u uklanjanju ROS-a (Tablica 1) (Bhatla i Lal, 2018). Enzimi navedeni u Tablici 1 istraživani su u ovom radu.

Tablica 1. Glavni antioksidativni enzimi uključeni u uklanjanje ROS-a (Bhatla i Lal, 2018)

Enzim	Katalizirana reakcija
Superoksid dizmutaza (SOD)	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \rightarrow 2 H_2O_2 + O_2$
Katalaza (CAT)	$2 H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Askorbat peroksidaza (APX)	$AsA + H_2O_2 \rightarrow$ Dehidroaskorbat (DHA) +2 H_2O
Peroksidaza (POD)	$Donor + H_2O_2 \rightarrow$ oksidirani donor +2 H_2O

Superoksid dizmutaza (SOD) ima središnju ulogu u obrani od oksidativnog stresa u svim aerobnim organizmima. Superoksid dizmutaza pripada skupini metaloenzima (Mn, Fe, Cu/Zn) i katalizira dismutaciju $O_2^{\bullet -}$ u O_2 i H_2O_2 . Ovaj enzim jedan je od najučinkovitijih antioksidansa (Gill i sur., 2015; Gill i Tuteja, 2010).

Katalaza (CAT) je sveprisutni enzim koji sadrži tetramerni hem i katalizira dismutaciju dviju molekula H_2O_2 u vodu i kisik. Ima visoki afinitet za H_2O_2 , ali slabu aktivnost protiv organskih peroksida. Biljke sadrže nekoliko vrsta enzima koji razgrađuju H_2O_2 , međutim, CAT je jedinstveni enzim jer ne zahtijeva stanični redukcijski ekvivalent. Također, vrlo je važan za održavanje redoks ravnoteže tijekom oksidativnog stresa. Aktivnost CAT-a ističe se prilikom povećanih koncentracija vodikova peroksida, što upućuje na specifičnost CAT-ovog djelovanja u uvjetima oksidativnog stresa. Katalaza je enzim koji ima jedan od najvećih koeficijenata konverzije s obzirom na ostale antioksidativne enzime, a najviše je lokalizirana u peroksisomima (Gill i Tuteja, 2010).

Peroksidaza (POD) katalizira reakciju redukcije H_2O_2 u vodu uz istovremenu oksidaciju različitih supstrata. U odnosu na askorbat peroksidazu ima različitu aminokiselinsku sekvencu, različitu fiziološku funkciju i slabiju specifičnost prema supstratu, te preferira aromatske elektron donore poput gvajakola i progalola. Zastupljen je sve od životinja do mikroba. Aktivnost POD-a ovisi o vrsti biljke, a povezuje se i sa promjenama koje imaju bitnu ulogu u rastu i razvoju biljke poput respiracije, fotosinteze i transpiracije (Gill i Tuteja, 2010). POD se također povezuje sa promjenama koje imaju ulogu u rastu i razvoju biljke kao što je respiracija, fotosinteza, transpiracija te izmjena plinova i kao takav može poslužiti kao osjetljivi indikator ugrožene metaboličke aktivnosti zbog izlaganja raznim abiotским stresorima.

Smatra se da askorbat peroksidaza (APX) ima najvažniju ulogu u uklanjanju ROS-a i u zaštiti stanica u višim biljkama, algama i drugim organizmima. Askorbat peroksidaza ima

esencijalnu ulogu u kontroli unutarstaničnih koncentracija ROS-a. Pripada hem peroksidazama, a regulirana je redoks signalom i H_2O_2 . Redukcija H_2O_2 praćena je oksidacijom dvije molekule askorbata, pri čemu nastaju dvije molekule vode i dvije molekule monohidroksiaskorbata (Ambriović-Ristov i sur., 2007). APX je jedan od najraširenijih antioksidativnih enzima u biljnim stanicama i posjeduje puno veći afinitet za H_2O_2 nego CAT, stoga je učinkovitiji u razgradnji H_2O_2 u stresnim uvjetima (Sharma i sur., 2012).

Ravnoteža između aktivnosti SOD-a, APX-a, POD-a i CAT-a u stanicama ključna je za određivanje ustaljene razine superoksidnog radikala (O_2^-), vodikovog peroksida (H_2O_2) i hidroksilnog radikala ($\bullet OH$) (Mittler i sur., 2004). Različiti afiniteti APX-a i CAT-a za H_2O_2 sugeriraju da oni pripadaju dvjema različitim klasama enzima za uklanjanje H_2O_2 : APX bi mogao biti odgovoran za fino moduliranje ROS-a za signalizaciju, dok bi CAT mogao biti odgovoran za uklanjanje viška ROS-a tijekom stresa (Mittler, 2002).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Oprema

U ovom radu korištena je sljedeća oprema:

Ime	Proizvođač
• atomski apsorpcijski spektrometar	Perkin Elmer Aanalyst 700, SAD
• centrifuga	BioSan Microspin 12, Latvia
• centrifuga	Ohaus Frontier 5718, SAD
• dendrometarske trake	D1 UMS 2017
• elementarni analizator	Leco CNS-2000, Njemačka
• elementarni analizator	Leco S Analyzer, Njemačka
• hladnjak	Liebherr ProfiLine, Njemačka
• ionski kromatograf	Dionex DX600, SAD
• pH-metar	Mettler Toledo SevenMulti S40, SAD
• plameni fotometar	Jenway PFP-7, UK
• spektrofotometar	Labomed UVS-2700, SAD
• stanica za pročišćavanje vode	Fusion 320-Suez, Francuska
• sustav za mikrovalnu digestiju	Milestone, Ethos One, Italija
• titrator	Mettler Toledo T50, SAD
• vaga	Sartorius CP124S, Njemačka

3.1.2. Kemikalije

U nastavku su nabrojane korištene kemikalije za izradu ovog rada.

Korišteni standardi i kemikalije za određivanje kationa i aniona u prikupljenim uzorcima vode:

Ime	Kemijska formula	Proizvođač
• kalijev dihidrogen fosfat	KH_2PO_4	Kemika, Hrvatska
• kalijev sulfat	K_2SO_4	Kemika, Hrvatska
• kloridna kiselina	HCl	Fisher Scientific, SAD
• metansulfonska kiselina	$\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$	Acros-Organics
• multistandard za katione	$\text{Na}^+, \text{NH}_4^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$	NSI Lab Solutions, SAD
• natrijev karbonat/bikarbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$	NSI Lab Solutions, SAD
• natrijev klorid	NaCl	Kemika, Hrvatska

Materijali i metode

- | | | |
|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| • natrijev nitrat | NaNO_3 | Kemika, Hrvatska |
| • standard za provodljivost | $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$ | InLab Solutions, SAD |
| • pH standardi | pH=4,01; 7,00; 9,21 | InLab Solutions, SAD |

Korištene kemikalije za određivanje ozona:

- | Ime | Kemijska formula | Proizvođač |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| • deionizirana voda | H_2O | HŠI, Hrvatska |
| • glicerol | $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ | Gram-mol, Hrvatska |
| • kalijev nitrit | KNO_3 | Kemika, Hrvatska |
| • limunska kiselina | $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ | T.T.T. d.o.o., Hrvatska |
| • metanol | CH_3OH | Carlo Erba, Italija |
| • natrijev karbonat | Na_2CO_3 | Gram-mol, Hrvatska |
| • natrijev nitrit | NaNO_2 | Kemika, Hrvatska |
| • nitratni standard | NO_3^- | NSI Lab Solutions, SAD |

Za određivanje hranjivih tvari u tlu:

- | Ime | Kemijska formula | Prizvođač |
|--|--|-------------------------|
| • 4-(metilamino)-fenol sulfat (Metol) | $[\text{HOC}_6\text{H}_4\text{NH}_2(\text{CH}_3)]\text{HSO}_4$ | Fluka, SAD |
| • amonijev acetat | $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ | Gram-mol, Hrvatska |
| • amonijev heptamolibat | $\text{H}_{66}\text{Mo}_7\text{N}_6\text{O}_{24}$ | Kemika, Hrvatska |
| • amonij-željezo sulfat-heksahidrat | $\text{H}_8\text{FeN}_2\text{O}_8\text{S}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ | Gram-mol, Hrvatska |
| • destilirana voda | H_2O | HŠI, Hrvatska |
| • difenilamin-4-sulfonska kiselina (DAS) | $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$ | Riedel de Haen, SAD |
| • kalij dihidrogen fosfat | KH_2PO_4 | Kemika, Hrvatska |
| • helij | He | UTP, Hrvatska |
| • kalcijev klorid | CaCl_2 | Kemika, Hrvatska |
| • kalijev dikromat | $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ | Kemika, Hrvatska |
| • kisik | O_2 | UTP, Hrvatska |
| • kloridna kiselina | HCl | Fisher Scientific, SAD |
| • kvarcni pijesak | SiO_2 | Gram-mol, Hrvatska |
| • mliječna kiselina | $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ | T.T.T. d.o.o., Hrvatska |
| • natrijev disulfit | NaHSO_3 | Gram-mol, Hrvatska |
| • natrijev sulfit | Na_2SO_3 | Kemika, Hrvatska |

• octena kiselina	CH ₃ COOH	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
• referentni materijal – Istra	<i>terra rosa</i>	Istra, Hrvatska
• srebro-sulfat	Ag ₂ SO ₄	Kemika, Hrvatska
• standard – Bio Soil		Belgija
• sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	Carlo Erba, SAD
• zrak		UTP, Hrvatska

Za određivanje hranjivih tvari u lišću i iglicama:

Ime	Kemijska formula	Prizvođač
• amonijev hidroksid	NH ₄ OH	Kemika, Hrvatska
• amonijev heptamolibat	H ₆₆ Mo ₇ N ₆ O ₂₄	Kemika, Hrvatska
• cezijev klorid	CsCl	Fisher Scientific, SAD
• deionizirana voda	H ₂ O	HŠI, Hrvatska
• kalij dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	Fisher Scientific, SAD
• lantanov nitrat heksahidrat	La(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	Carlo Erba, Italija
• nitratna kiselina	HNO ₃	Gram-mol, Hrvatska
• 4-(metilamino)-fenolsulfat	[HOC ₆ H ₄ NH ₂ (CH ₃)]HSO ₄	Fluka, SAD
• natrijev sulfit	NaHSO ₃	Kemika, Hrvatska
• natrijev disulfit	Na ₂ SO ₃	Gram-mol, Hrvatska
• standard Ca	Ca ²⁺	NSI Lab Solutions, SAD
• standard K	K ⁺	NSI Lab Solutions, SAD
• standard Mg	Mg ²⁺	NSI Lab Solutions, SAD
• sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	Carlo Erba, Italija
• vodikov peroksid	H ₂ O ₂	Gram-mol, Hrvatska
• α-2,4-dinitrofenol	HOC ₆ H ₃ (NO ₂) ₂	Aldrich, SAD

Za određivanje oksidativnog stresa:

Ime	Kemijska formula	Proizvođač
• aceton	(CH ₃) ₂ CO	Gram-mol, Hrvatska
• destilirana voda	H ₂ O	HŠI, Hrvatska
• etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Kemika, Hrvatska
• Bradfordov reagens		Applichem, Njemačka
• gvajakol	C ₆ H ₄ (OH)(OCH ₃)	Acros-Organics, SAD
• kalijev dihidrogen fosfat	KH ₂ PO ₄	Kemika, Hrvatska
• kalijev hidrogen fosfat	K ₂ HPO ₄	Kemika, Hrvatska

Materijali i metode

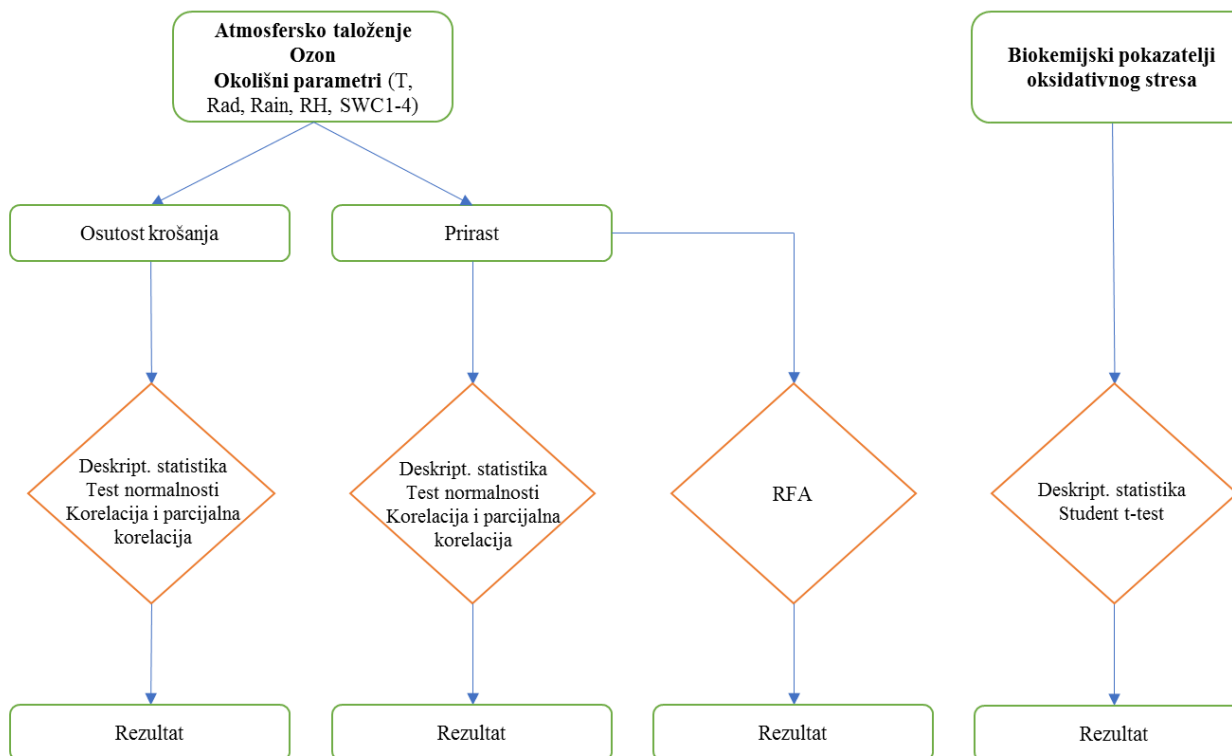
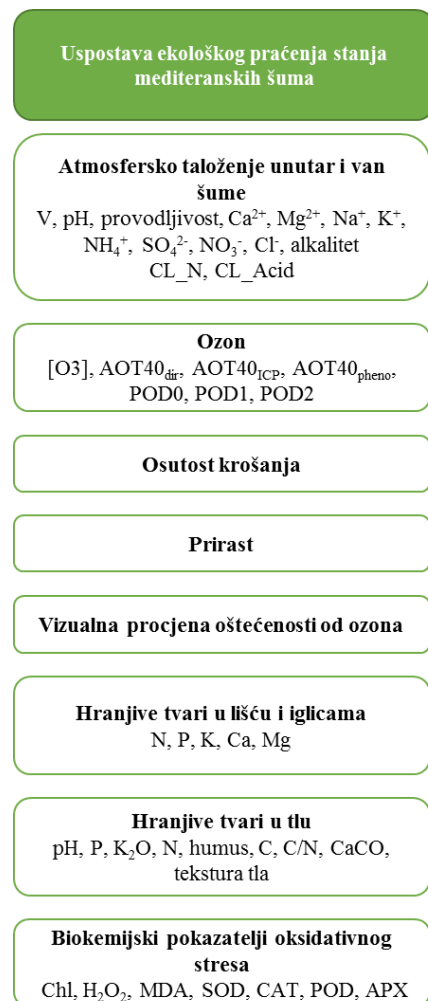
• kalijev jodid	KI	Kemika, Hrvatska
• L-askorbinska kiselina	C ₆ H ₈ O ₆	Kemika, Hrvatska
• metionin	HO ₂ CCH(NH ₂)CH ₂ CH ₂ SCH ₃	Acros-Organics, SAD
• natrijev askorbat	C ₆ H ₇ NaO ₆	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
• nitro-plavi tetrazolijev klorid (NBT)	C ₄₀ H ₃₀ Cl ₂ N ₁₀ O ₆	Alfa Aesar, SAD
• polivinil – polipirolidon (PVPP)	(C ₆ H ₉ NO) _n	Acros-Organics, SAD
• riboflavin	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	Kemika, Hrvatska
• tiobarbituratna kiselina (TBA)	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S	Acros-Organics, SAD
• trikloroetena kiselina (TCA)	Cl ₃ CCOOH	Gram-mol, Hrvatska
• vodikov peroksid (w = 30 %)	H ₂ O ₂	Gram-mol, Hrvatska

3.2. Metode

Istraživanje je obuhvatilo definiranje ploha te uspostavu mjerenja ekoloških i biokemijskih pokazatelja stanja mediteranskih šumskih ekosustava prema priručnicima Međunarodnog programa za procjenu i motrenje štetnih utjecaja onečišćenja zraka na šume (ICP Forests). Shema istraživanja prikazana je na Slici 9.

3.2.1. Uspostava ekološkog praćenja stanja mediteranskih šuma

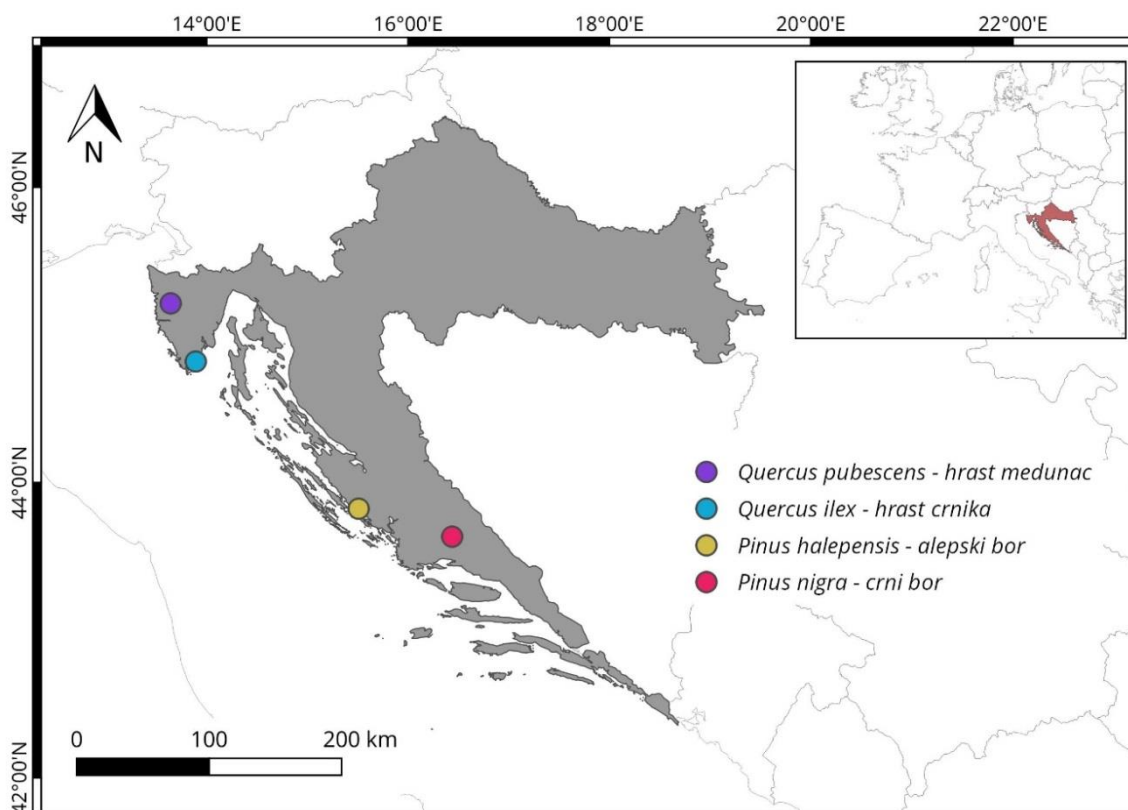
Za potrebe ekološkog praćenja stanja mediteranskih šuma definirale su se četiri plohe koje su morale zadovoljiti nekoliko uvjeta: trebale su predstavljati najzastupljenije vrste/šume Hrvatskog submediterana i eumediterana, trebale su biti smještene u blizini meteoroloških postaja Državnog hidrometeorološkog zavoda te su se trebale nalaziti u državnim šumama kako bi se smanjio rizik neplaniranih sječa i devastacije. Odabrane plohe predstavljaju najvažnije šumske vrste na Jadranskoj obali: *Quercus pubescens* Wild. (hrast medunac) i *Quercus ilex* L. (hrast crnika) u Istri (UŠP Buzet) te *Pinus halepensis* Mill. (alepski bor) i *Pinus nigra* L. (crni bor) u Dalmaciji (UŠP Split) (Slika 10). Sve plohe bile su površine je 0,25 ha. Detaljniji podaci o plohama prikazani su u Tablici 1. Na odabranim plohama postavljena je oprema za uzorkovanje atmosferskoga taloženja u šumi i na otvorenom (kišomjeri), pasivni mjerači za određivanje O₃, dendrometrijske trake za mjerenje prirasta. Mjerenja su provedena tijekom tri godine, od 2017. do 2019. godine.



Slika 9. Shema istraživanja

Ploha u sastojini hrasta medunca Poreč nalazi se na području šumarije Poreč GJ Dubrava, odjel 57 (45°14'59,2" N; 13°43'52,9" E). Ploha se nalazi na 264 m. n. v. Po uzgojnom obliku radi se o panjači hrasta medunca s pojedinim stablima iz sjemena. Uz hrast medunac od drvenastih vrsta pojavljuju se još hrast cer, crni jasen i bijeli grab. Sklop je potpun, a narušen je mjestimično sušenjem pojedinih stabala ili skupinom stabala iz panja. Tip tla koje prevladava je crvenica (*terra rossa*). Cjelokupna sastojina dobrog je zdravstvenog stanja. Na šumskom tlu vidljivi su tragovi rovanja divljih svinja, a drvenastu vegetaciju obgriza srneća divljač (Jakovljević i sur., 2019).

Ploha u sastojini hrasta crnike Šišan nalazi se na području šumarije Pula, GJ Magran – Cuf, odjel 79 (44°51'41,2" N; 13°59'24,4" E). Ploha se nalazi na 3 m. n. v. Po uzgojnom obliku radi se o panjači hrasta crnike s pojedinim stablima iz sjemena. Uz hrast crniku od drvenastih vrsta pojavljuju se još hrast medunac, crni jasen, lovor i lemprika. Sklop je gust tako da na površinu tla dopire minimum ili nimalo svjetla. Cjelokupna sastojina dobrog je zdravstvenog stanja. Tip tla koje prevladava je crvenica (*terra rossa*). (Jakovljević i sur., 2019).



Slika 10. Lokacije odabranih ploha

Ploha Vrana, na Vranskom jezeru, nalazi se na području šumarije Biograd, GJ Biograd, odjel 46e (43°53'23" N; 15°33'47" E). Ploha se nalazi na 20 m. n. v. Kultura alepskog bora dobre je kakvoće i dobrog zdravstvenog stanja. Sloj grmlja slabo je razvijen te se vrlo rijetko javlja pokoji grm šmrike. Tip tla je smeđe tlo. (Jakovljević i sur., 2019).

Ploha u sastojini crnog bora Donji Muć nalazi se na području šumarije Split, GJ Borovača, predio Modraš, odjel 52 b (43°41'59"N; 16°26'34"E). Ploha je postavljena na zapadnoj ekspoziciji, na 550 m .n. v. i nagibu od 32°. Ploha se nalazi u čistoj kulturi crnog bora potpunog sklopa, s vrlo malim udjelom autohtonih vrsta u podstojnoj etaži. Sastojina je dobrog zdravstvenog stanja. Tip tla je smeđe tlo (Jakovljević i sur., 2019).

Tablica 2. Opis ploha

Šumska vrsta	Latinski naziv	Regija	Nadmorska visina (m)	Vrsta tla	Biogeografska zona
Hrast medunac	<i>Quercus pubescens</i> Wild.	Istra	264	<i>Terra rossa</i>	Mediteran
Hrast crnika	<i>Quercus ilex</i> L.	Istra	3	<i>Terra rossa</i>	Mediteran
Alepsi bor	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	Dalmacija	20	Kalkokambisol	Mediteran
Crni bor	<i>Pinus nigra</i> L.	Dalmacija	550	Kalkokambisol	Mediteran

3.2.2. Mjerenje atmosferskoga taloženja i procjena opterećenja kiselim spojevima

Na odabranim plohama utvrđen je broj kišomjera koji su nasumično raspoređeni po plohi. Kišomjeri su se postavili izvan šume (metoda mokrog taloženja, BOF – eng. *bulk open field*) i unutar šume (metoda prokapljivanja, THR – eng. *throughfall*). Uzorci atmosferskog taloženja prikupljali su se svaka 2 tjedna tijekom cijele godine (Clarke i sur., 2020). Tri kišomjera postavila su se izvan šume, a devet ravnomjerno raspoređenih unutar plohe ispod krošnje. Uzorci prikupljeni van šume čine jedan reprezentativni uzorak gdje se iz svakog kišomjera uzela podjednaka količina uzorka. Slično, od devet kišomjera unutar šume uzela se podjednaka količina uzorka za tri reprezentativna uzorka. Analize atmosferskog taloženja

uključivale su mjerenje pH, provodljivosti, alkalitet te se na ionskom kromatografu odredila koncentracija klorida, nitrata, sulfata, fosfata, amonijaka, natrija, kalija, kalcija i magnezija (Clarke i sur., 2020). Analize iona u BOF i THR uzorcima rađene su jednom za svaki period uzorkovanja; jedan uzorak BOF-a i tri uzorka THR-a. Rezultati su prikazani kao prosječna godišnja vrijednost atmosferskog taloženja određivanih iona \pm standardna devijacija.

Prosječno godišnje taloženje kiselih spojeva i taloženje N spojeva na plohama koristilo se za izračun kritičnih opterećenja i njegovog prekoračenja pri čemu su se u obzir uzele samo vrijednosti taloženja dobivene metodom prokaplivanja (u šumi) jer je to stvarni tok iona iz atmosfere do šumskog tla. Rezultati opterećenja kiselim i dušikovim spojevima izračunati su kao zbroj taloženja dušikovih ($\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$) ili kiselih (SO_4^{2-} , N-NH_4^+ , N-NO_3^-) spojeva, a izraženi su u $\text{kg ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Taloženje dušika i kiselih spojeva izračunato je prema jednadžbama (1 i 2) (Mosello i sur., 2002):

$$\text{DEP}_N = \text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^- \quad [1]$$

$$\text{DEP}_{\text{Acid}} = 2 \cdot (\text{SO}_4^{2-}) + 1,5 \cdot (\text{N-NH}_4^+) + (\text{N-NO}_3^-) \quad [2]$$

Taloženje dušika uspoređeno je s kritičnim opterećenjem za dušik prema literaturnim podacima za pojedinu vrstu (3) (Bobbink i sur, 2011):

$$\text{DEP}_N </> \text{DEP}_{\text{CL}}(\text{N}) \quad [3]$$

3.2.2.1. Analiza pH i provodljivosti

Mjerenje pH zasniva se na mjerenju aktivnosti vodikovih (H^+) iona. Ono je mjera kiselosti koja pokazuje kiselost ili lužnatost neke otopine. Kiša, u odsutnosti onečišćenja, ima pH oko 5,6. Razlog tome je što molekule vode disociraju CO_2 u ugljičnu kiselinu. Prema tome, analizom pH može se uvidjeti o kakvoj se kiši radi, baznoj ili kiseloj. Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi s tri standarda (4,01, 7,00 i 9,21) pomoću instrumenta Mettler Toledo SevenMulti S40 (Clarke i sur., 2020). Analize pH na BOF i THR uzorcima rađene su jednom

za svaki period uzorkovanja. Rezultati su prikazani kao prosječna godišnja vrijednost \pm standardna devijacija.

Provodljivost je fizikalna veličina koja opisuje svojstvo otopine da provodi električnu struju. Ovo svojstvo ovisi o vrsti i koncentraciji pojedinih iona i o temperaturi na kojoj se mjeri provodljivost. Vrijednost provodljivosti otopine izražava se u $\mu\text{S cm}^{-1}$. Mjerenja su vršena pri sobnoj temperaturi pomoću instrumenta Mettler Toledo SevenMulti S40. Ispravnost elektrode provjeravana je standardom $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$. Budući da vodljivost ovisi o temperaturi, te su vrijednosti koje su mjerene na različitoj temperaturi od referentne ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) bile su preračunate na referentnu vrijednost. Analize pH na BOF i THR uzorcima rađene su jednom za svaki period uzorkovanja. Rezultati su prikazani kao prosječna godišnja vrijednost \pm standardna devijacija.

3.2.2.2. Analiza alkaliteta

Mjera kapaciteta vode da neutralizira jaku kiselinu (ion H^+) do određenog pH, naziva se alkalitet vode. Dakle, alkalitet je suma svih baza u uzorku kiše. U kiši uglavnom se odnosi na baze HCO_3^- , i OH^- . Mjeri se utroškom otopine kiseline do završne točke određenog pH, tj. do ekvivalentne točke gdje se smatra da su sve baze neutralizirane (Clarke i sur., 2020). Mjerenja su rađena pri sobnoj temperaturi s tri standarda (4,01, 7,00 i 9,21) pomoću instrumenta Mettler Toledo T50. Analize alkaliteta na BOF i THR uzorcima rađene su jednom za svaki period uzorkovanja. Rezultati su izraženi u $\mu\text{eq L}^{-1}$ i prikazani kao prosječna godišnja vrijednost \pm standardna devijacija.

3.2.2.3. Provjera valjanosti analitičkih rezultata atmosferskoga taloženja

Provjera valjanosti analitičkih rezultata izvedena je prema Fürst i sur. (2020) kako bi se smanjio rizik od pogrešaka i uključivala je provjeru bilance iona, usporedbu između izmjerene i izračunate provodljivosti na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, omjer Na^+ i Cl^- iona i vezu između provodljivosti i zbroja kationa, kao i između provodljivosti i zbroja aniona. Te provjere su se koristile kako bi se potvrdila točnost rezultata za daljnju statističku obradu.

3.2.3. Utvrđivanje razine prizemnog ozona (O₃)

Pasivni mjerači ozona postavljeni su u blizini šume na 1,5 do 2,0 m iznad tla. Uzorci su se prikupljali svaka dva tjedna u vegetacijskom periodu od početka travnja do kraja listopada (prosina). Pasivni mjerač sadrži dva filtera koji su obloženi nitritnom otopinom (Schaub i sur., 2016). Nitriti u reakciji s ozonom reagiraju i nastaju nitrati. Nakon dvotjednog izlaganja uzorci su se poslali u laboratorij. U laboratoriju uzorci su se pohranili na tamno mjesto do analize. Filter iz mjerača stavio se epruvetu i dodala se deionizirana voda te se uzorak centrifugirao 15 min na 300 rpm. Nakon centrifuge, ekstrakt se razrijedio deioniziranom vodom. Razrijeđeni ekstrakt se filtrira kroz filter 0,45 µm u vialu te injektira u ionski kromatograf. Iz takvog ekstrakta određivale su se koncentracija NO₃⁻ iona. Koncentracija NO₃⁻ iona koristile su se za izračun ozona na odabranim ploham (Ogawa, 2001). Za svaki period izračunata je prosječna vrijednost od četiri uzorka prikupljena na terenu. Koncentracije ozona prikazane su u ppb.

3.2.3.1. Parametri za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma

Za vegetaciju je dugoročna izloženost ozonu važnija od akutne. Teško je kvantificirati potencijalnu štetu na biljkama uzrokovanu onečišćenjem ozonom. Zapravo, ozon nanosi najveću štetu kada ga biljka preuzme. Koncentracije ozona u atmosferi, međutim, nisu izravna mjera unosa ozona u biljku. Ulogu imaju i mnogi drugi parametri: razina vlažnosti, stanje tla, faza rasta biljaka itd. (CLRTAP, 2017). Kako bi se izračunali parametri za procjenu rizika od ozona, dvotjedne koncentracije ozona preračunate su na jednosatno razdoblje pomoću Loiblove jednadžbe (4) (Gerosa i sur., 2007)

$$O_3(h_r, t) = a_1 + a_2 e^{-(t-a_3)^2 a_4} \cdot \ln \left(\frac{h_r}{100} + \frac{b_1 t^2 + b_2 t + b_3}{b_4 t^2 + b_5 t + 1000} e^{-b_6 t} \right) \quad [4]$$

gdje je h_r relativna nadmorska visina u metrima, t je vrijeme (tijekom dnevnog svjetla), te aproksimirani koeficijenti preuzeti iz literature (Loibl, 1994): $a_1 = 20,3$, $a_2 = 7,5$, $a_3 = 13,4$, $a_4 = 0,05$, a dnevne varijacije rezultiraju koeficijentima: $b_1 = 504$, $b_2 = -4993$, $b_3 = 26546$, $b_4 = 50$, $b_5 = -1401$, $b_6 = 0,122$ (Loibl, 1994).

Europska unija definirala je parametar za procjenu rizika od ozona, akumulirani ozon, AOT40 (eng. *Accumulated O₃ exposure over a Threshold of 40 ppb*) (2008/50/EC) u cilju zaštite vegetacije. Nasuprot tome, Međunarodni istraživački program za istraživanje utjecaja

onečišćujućih tvari zraka na usjeve i (polu) prirodnu vegetaciju (ICP Vegetation) predlaže korištenje parametra PODY (eng. *Phytotoxic O₃ Dose above a threshold flux of Y*) zbog većeg biološkog značaja u odnosu na AOT40 (CLRTAP, 2017).

Koristeći preračunate koncentracije pasivnog ozona na jednosatno razdoblje, izračunale su se dvije vrste parametara, AOT40 i PODY (CLRTAP, 2017). Ovi parametri koriste se za procjenu rizika od ozona za zaštitu šumskih ekosustava.

a) Parametar AOT40

Akumulirani ozon (AOT40) je zbroj razlika između srednje satne koncentracije ozona (u ppb) i granične vrijednosti od 40 ppb ozona kada koncentracija premašuje 40 ppb tijekom vremena od 8 h do 20 h, akumulirane u navedenom vremenskom razdoblju. Koristila su se tri različita proračuna za AOT40 prema jednadžbama 5-7. ($AOT40_{dir}$, $AOT40_{ICP}$, $AOT40_{pheno}$) kako bi se procijenio koji od parametara će biti značajniji.

Za izračunavanje izloženosti biljaka ozonu koriste se različite metode izračuna za AOT40. $AOT40_{dir}$ (izraženo u ppb h) izračunat je kao suma prekoračenja sata iznad 40 ppb, za vrijeme od 8 h do 20 h prema Direktivi EC 2008/50/EC koja vrijedi za šume. To je standard za procjenu koncentracije ozona u vanjskom zraku. Period koji uključen u ovu jednadžbu (5) računa se od 1. travnja do 30. rujna.

$$AOT40_{dir} = \int_{t=1.\text{travanj}}^{30.\text{rujan}} \max([O_3] - 40, 0) dt \quad [5]$$

ICP Vegetation preporuča korištenje druge jednadžbe. $AOT40_{ICP}$ (izraženo u ppb h) izračunava se kao zbroj prekoračenja sata iznad 40 ppb, za dnevne svjetlosne sate kada je globalno zračenje veće od $> 50 \text{ W m}^{-2}$ tijekom vegetacije (jednadžba 6, CLRTAP, 2017.):

$$AOT40_{ICP} = \int_{t=SGS}^{EGS} \max([O_3] - 40, 0) dt \quad [6]$$

gdje SGS i EGS predstavljaju početak i kraj vegetacijske sezone. U slučaju listopadne šume, duljina vegetacijske sezone je od 1. travnja do 30. rujna, dok za mediteransko zimzeleno drveće i četinjače preporuča se mjerenje tijekom cijele godine (od 1. siječnja do 31. prosinca).

Budući da indeksi $AOT40_{dir}$ i $ATO40_{ICP}$ ne uključuju točno vegetacijski period za pojedinu vrstu (Anav i sur., 2017.), $AOT40_{pheno}$ (izraženo u ppb h) izračunat je prema Paoletti i sur. (2019). koji su uključili specifičnu vegetacijsku sezonu dominantnih vrsta drveća na plohama, kako je opisano u jednadžbi (7):

$$AOT40_{pheno} = \int_{t=aSGS}^{aEGS} \max([O_3] - 40, 0) dt \quad [7]$$

gdje $aSGS$ i $aEGS$ predstavljaju promatrani/specifični početak vegetacijske sezone i promatrani/specifični kraj vegetacijske sezone mjereni na plohi (Paoletti i sur., 2019.).

Sve koncentracije $AOT40$ indeksa iz jednadžbi (5), (6), (7) izražene su u ppb h, dt je vremenski period od 1 h.

b) Parametar PODY

Za proračun unosa ozona kroz puči ispitivanih vrsta koristio se model DO_3SE (CLRTAP, 2017). Ovaj model procjenjuje vodljivost ozona kroz puči uzimajući u obzir sadržaj vode u tlu, klimatske čimbenike, kao što su temperatura, sunčevo zračenje i relativna vlažnost, te karakteristike pojedine biljke (Emberson i sur., 2000). Vodljivost ozona kroz puči (g_{sto}) ($mmol O_3 m^{-2} PLA s^{-1}$, gdje je PLA projicirana površina lista) izračunata je pomoću sljedeće jednadžbe (8):

$$g_{sto} = g_{max} \cdot [f_{phen} \cdot f_{light} \cdot \max\{f_{min}(f_{temp} \cdot f_{VPD} \cdot f_{SWC})\}] \quad [8]$$

gdje je g_{max} specifična maksimalna vodljivost ozona kroz puči biljne vrste ($mmol O_3 m^{-2} PLA s^{-1}$). Parametri f_{phen} , f_{light} , f_{temp} , f_{VPD} i f_{SWC} su ograničavajući čimbenici izraženi u relativnim vrijednostima od 0 do 1 do udjela g_{max} , na temelju gustoće fotosintetičkog fluksa na površini lista (PPFD, $\mu mol fotona m^{-2} s^{-1}$), temperatura površinskog zraka (T , °C), deficit tlaka pare (VPD, kPa) procijenjen kroz vlažnost površinskog zraka, te sadržaj vode u tlu (SWC, $m^3 m^{-3}$). Za f_{SWC} korišteni su specifični parametri vezani za vrstu tla (crvenica i kalcokambisol, Tablica 2). Funkcija f_{min} je minimalni g_{sto} izražen kao udio g_{max} (CLRTAP, 2017). Za izvođenje modela DO_3SE -a korištene su parametri specifični za vrstu, prema CLRTAP-u (2017) za svaku dominantnu biljnu vrstu na plohama. Konačno, PODY je izračunat korištenjem

procijenjene vodljivosti ozona kroz puči s rasponom graničnih pragova (promjenjiv Y ; 0, 1 i 2 $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) što ukazuje na različite sposobnosti detoksikacije. Korištena je sljedeća jednadžba (jednadžba 9):

$$PODY = \int_{SGS}^{EGS} \max \left(\frac{R_c}{R_b + R_c} \cdot g_{sto} \cdot [O_3] - Y, 0 \right) dt \quad [9]$$

gdje je dt 1 h, $[O_3]$ koncentracija ozona po satu (ppb), R_b je kvazi-laminarni otpor (s m^{-1}), R_c je otpor površine lista (s m^{-1}), a g_{sto} je satna vrijednost vodljivosti ozona kroz puči ($\text{mmol O}_3 \text{m}^{-2} \text{PLA s}^{-1}$) (CLRTAP, 2017).

Fenologija biljaka izračunata je korištenjem stvarnog početka vegetacijskog razdoblja i stvarnog kraja vegetacijskog razdoblja specifičnog za lokaciju. Za hrast crniku, alepski bor i crni bor uzeta je u obzir cijela godina (365 dana), a za hrast medunac je razmatrano razdoblje od 101 do 320 dana.

3.2.4. Vizualna procjena oštećenosti od ozona

Povišene koncentracije ozona mogu uzrokovati oštećenje biljaka koje se očituje na lišću i iglicama. Vizualna procjena oštećenosti uzrokovane ozonom procjenjena je na lišću i iglicama jednom godišnje s ciljem procjene vidljivog oštećenja. Procjenu su provela 2 promatrača na kako bi ocijenili vidljiva oštećenja izazvana ozonom od travnja do rujana kad su koncentracije najveće. Identifikacija simptoma vizualnih oštećenja od ozona vrši se prateći sljedeće korake: (i) simptomi oštećenja od ozona traženi su na potpuno razvijenom lišću izloženom sunčevoj svjetlosti, (ii) starije lišće prije razvija simptome od mladog lišća, (iii) zasjenjeni dijelovi lišća obično ne pokazuju simptome, (iv) oštećenja se pojavljuju na gornjoj strani lista, (v) simptomi se pojavljuju između žila lista, same žile nisu zahvaćene, (vi) simptomi su jednoliko raspoređeni po listu. Procjena vidljivog oštećenja izazvanih ozonom služi kao sredstvo za procjenu potencijalnog rizika za šumske ekosustave koji su izloženi povišenim koncentracijama okolnog ozona (Eichhorn i sur., 2016).

3.2.5. Određivanje hranjivih tvari u tlu

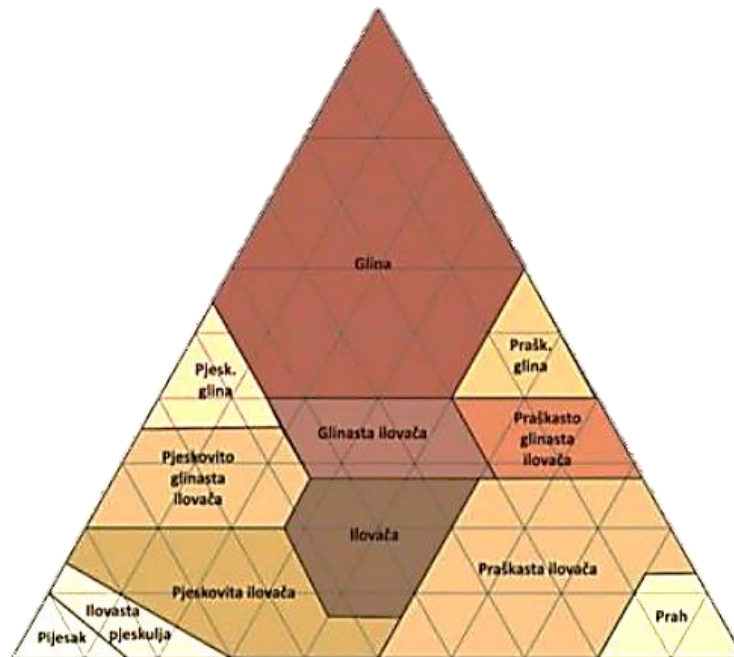
Cilj određivanja svojstva tla je procjena nutritivnog statusa tla na plohama i njegove promjene tijekom vremena. Za utvrđivanje hranjivih tvari u tlu, uzorci tla uzimali su se i analizirali jednom godišnje u skladu s ICP priručnikom, ali učestalije nego je navedeno u priručniku, koji predlaže uzorkovanje svakih 10 godina na više različitih dubina (Cools i De Vos, 2020). Zbog vremenskog ograničenja te kako bi se pratile trenutne promjene uzrokovane atmosferskim taloženjem, uzimao se gornji mineralni sloj (0-10 cm) (Ferretti i sur., 2014).

Prethodno analizi, uzorci tla su se osušili na sobnoj temperaturi ili na 40 °C te samljeli u mlinu. Takvim uzorcima odredio se mehanički sastav tla, pH, sadržaj karbonata, ukupnog N i C elementarnim analizatorom, sadržaj P na UV-VIS spektrofotometru te K na plamenom fotometru (Cools i De Vos, 2020). Priprema uzorka za analizu makroelemenata vršila se prema ICP Forests priručniku (Cools i De Vos, 2020).

3.2.6. Određivanje mehaničkog sastava tla

Mehanički sastav određuje se na veličini čestica manjoj od 2 mm. U ovoj analizi bitna je prethodna obrada uzorka usmjerena na potpunu disperziju primarnih čestica. Određivanje mehaničkog sastava bitno je jer ovisno o udjelu pijeska/praha/gline ovisit će i sastav tla. Pipet-metoda po Köhnu koristi se za određivanje mehaničkog sastava tla a temelji se na različitosti masa i veličina čestica koje utječe na brzinu taloženja (Stokesov zakon). Kao medij koristi se destilirana voda. Analize su rađene jednom godišnje s dva ponavljanja. Rezultati su izraženi u postotnom udjelu pojedine frakcije i prikazani kao prosječna vrijednost dva mjerenja \pm standardna devijacija.

Uzorku od 10 g tla odstrani se organska tvar. Odstranjivanje organskog ugljika vrši se dodavanjem H₂O₂ i ostavi se preko noći. Sljedeći dan se smjesa zagrijava dok se tlo ne osuši. Zatim se dodaje voda, Na-pirofosfat te stavi na mućkalicu. Nakon 15 min mućkanja, suspenzija se presijava preko sita od 63 μ m u sedimentacijski valjak od 1000 mL. Ostatak sa sita se prebacuje u lončić poznate mase. Zatim slijedi pipetiranje tri frakcije u različitim vremenskim periodima. U točno određenim vremenskim razmacima otpipetira se uzorak suspenzije tla na određenoj dubini sedimentacijskog valjka (cilindra).



Slika 11. Teksturni trokut, FAO 2015 (Izvor: <http://www.sumfak.unizg.hr>)

1. Frakcija (F1, <0,063 mm-sitni i kruni pijesak)

Sedimentacijski valjak mučka se rukama 2 min. Spustimo ga na stol i ne pomiče se. Nakon 44 s otpipetira se 10 mL suspenzije sa dubine od 10 cm u označeni lončić.

2. Frakcija (F2, <0,02 mm-krupni prah, glina)

Nakon 4 min i 27 s odpipetira se 10 mL suspenzije na dubini od 10 cm u označeni lončić.

3. Frakcija (F3, <0,002 mm-glina)

Nakon 3 h 47 min i 30 s odpipetira se 10 mL suspenzije na dubini od 5 cm u označeni lončić.

Svi lončići stavljaju se na sušenje na 105 °C do sljedećeg dana. Nakon hlađenja ponovo se izvažu. Razlika masa (g) nakon sušenja i praznog lončića daje masu frakcije (F1, F2 ili F3) s kojom se dalje ide u proračun teksture tla (Cools i De Vos, 2020).

$$\text{Glina} = (F3 - 0,0068) \cdot 1000 \quad [10]$$

$$\text{Prah sitni} = (F2 + F3) \cdot 1000 \quad [11]$$

$$\text{Prah krupni} = (F1 + F2) \cdot 1000 \quad [12]$$

$$\text{Prah} = \text{prah sitni} + \text{prah krupni} \quad [13]$$

$$\text{Pijesak} = 100 - \text{prah} - \text{glina} \quad [14]$$

Teksturna oznaka tla prema FAO klasifikaciji određuje se prema Slici 11:

3.2.7. Određivanje pH tla u vodi (H₂O) i kalcijevom kloridu (CaCl₂)

pH je važna veličina koja odražava kemijske uvjete otopine. pH tla vrlo je bitan faktor jer može kontrolirati dostupnost hranjivih tvari, biološke funkcije i mikrobnu aktivnost tla. Određivanje pH u H₂O i CaCl₂ u uzorcima tla mjeri se pomoću pH metra. Uzorku se doda alikvot destilirane vode/ 0,01 M otopine kalcijeva klorida i mučka jedan sat na mućkalici. Nakon mućkanja određuje se pH otopine (Cools i De Vos, 2020). Analize pH tla u vodi (H₂O) i kalcijevom kloridu (CaCl₂) rađene su u dva ponavljanja. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost dva mjerenja ± standardna devijacija.

3.2.8. Određivanje sadržaja karbonata (CaCO₃) u tlu

Ova metoda procjenjuje količinu karbonata tla. Ova metoda određuje karbonate kao postotak tla pomoću neutraliziranja kiseline. U uzorak tla dodaje se 10%-tna klorovodična kiselina (HCl), a karbonati se u reakciji s HCl-om raspadaju i nastaje ugljikov dioksid (CO₂). Nastali volumen CO₂ određuje na kalcimetru (Cools i De Vos, 2020). Analize su rađene jednom godišnje s dva ponavljanja. Rezultati su izraženi u postotnom udjelu i prikazani su kao prosječna vrijednost dva mjerenja ± standardna devijacija.

3.2.9. Određivanje dušika (N) i ugljika (C) u tlu

Suhim izgaranjem pri 1350 °C u prisutnosti kisika elementarnim analizatorom odredile su se količine ukupnog dušika (N) i ugljika (C) u uzorcima tla. Spaljivanje uzoraka tla provodi pri visokim temperaturama u struji čistoga kisika pri čemu se oksidira uzorka. Produkti oksidacije su oksidi dušika (NO_x) i molekularni dušik (N₂) te ugljikov dioksid (CO₂). Nakon

pretvorbe svih dušikovih spojeva u molekularni dušik, količina ukupnog dušika (mg g^{-1}) određuje se na temelju toplinske provodljivost. Dušik i ugljik odredili su se na elementarnom analizatoru Leco CNS 2000 Rezultati C i N izraženi su kao maseni postotak (%) i prikazani su kao prosječna vrijednost dva mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.10. Određivanje sadržaja fosfora (P_2O_5) i kalija (K_2O) u tlu

Pod lakopristupačnm kalijem podrazumijeva se mobilni kalij koji se nalazi u vodenoj fazi tla i adsorbiran na površini tijela sorpcije, dok je lakopristupačni fosfor frakcija topiva u vodi i slabim kiselinama. Određivanje sadržaja P i K radi se ekstrakcijom pomoću AL metode. Kalij se određuje direktno iz filtrata na plamenom fotometru Jenway PFP-7. Rezultati su izraženi kao udio K_2O (mg) u 100 g tla i prikazani su kao prosječna vrijednost dva mjerenja \pm standardna devijacija.

Određivanje sadržaja P radi se iz navedenog filtrara plavom metodom s amonijevim molibdatom. Pripreme se standardne otopine i uzorci te se analiziraju na spektrometru Labomed UVS-2700 redosljedom kako su i pripremljeni. Rezultati su izraženi kao udio P (mg) u 100 g tla i prikazani su kao prosječna vrijednost dva mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.11. Određivanje hranjivih tvari u lišću i iglicama

Cilj određivanja nutrijenata u lišću i iglicama je procijeniti utjecaj onečišćivača zraka na nutritivni status stabla na odabranim plohama (Rautio i sur., 2020). Tijekom druge polovice vegetacijskog perioda prikupilo se lišće/iglice s deset dominantnih stabla, uz pretpostavku da predstavljaju prosječno zdravstveno stanje za svaku plohu. Uzorci su se uzeli iz osunčanog dijela krošnje (Rautio i sur., 2020). Dolaskom u laboratorij, uzorci su se sušili u sušioniku maksimalno $70\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom najmanje 24 sata ili dok se ne postigne konstantna težina. Nakon sušenja uzorci se melju kako bi se dobio prah. Mjerila se koncentracija dušika (N) i ugljika (C) elementarnim analizatorom Leco CNS-2000, te sumpora (S) s elementarnim analizatorom Leco S Analyzer, fosfor (P) UV-VIS spektrofotometrom Labomed UVS-2700 te kalcij (Ca), kalij (K) i magnezij (Mg) atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom Perkin Elmer Analyst 700 (Rautio i sur., 2020).

3.2.12. Određivanje dušika (N), ugljika (C) i sumpora (S) u lišću i iglicama

Analiza biljnog materijala provedena je kao i analiza tla (napisano u potpoglavlju 3.2.4.4.) Nakon sušenja i usitnjavanja, u uzorcima je određena koncentracija dušika (N) i ugljika (C) na elementarnom analizatoru Leco CNS 2000, sumpora (S) na elementarnom analizatoru Leco S Analyzer. Rezultati N, C i S hranjivih tvari na plohi izraženi su kao udio elementa (mg) po gramu uzorka i prikazani su kao prosječna vrijednost tri godine.

3.2.13. Određivanje kalcija (Ca), kalija (K) i magnezija (Mg) u lišću i iglicama

Mikrovalna digestija je tehnika za pripremu uzoraka za elementarnu analizu. Uključuje uporabu kisele digestije koja razlaže matricu uzorka ostavljajući elemente za analizu u otopini i spremne za analizu. Izvaganim uzorcima dodao se alikvot nitratne kiseline i vodikova peroksida. Uzorci su se potom spalili u mikrovalnoj Milestone Ethos One. Nakon mikrovalne digestije, uzorci se profiltriraju te se uzorcima određuju elementi (Ca, K, Mg) na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru AAS 700. Rezultati su izraženi kao udio elementa (mg) po gramu i prikazani su kao prosječna vrijednost tri godine.

3.2.14. Utvrđivanje rasta stabla i stanja krošnji

3.2.14.1. Utvrđivanje rasta stabla

Na odabranim stablima, na plohama odredio se prirast stabala. Prirast se mjerio svaka dva tjedna tijekom vegetacijskog perioda očitanjem dendrometarskih traka na stablu (Slika 12) (Dobbertin i Neumann, 2016). Trake za mjerenje prsnog promjera izrađene su od umjetnog materijala postojanog na temperaturu, a na stablo su pričvršćene pomoću opruge koja omogućava širenje trake pod utjecajem rasta stabla. Trake su postavljene u prsnoj visini i vizualno su očitane, pazeći na položaj viziranja u odnosu na traku. Kako bi točnost bila veća, opažać treba biti pod pravim kutem na tangentu stabla koja ga dodiruje na mjestu skale za očitavanje. Preciznost očitavanja je 1/100 cm.



Slika 12. Određivanje prirasta pomoću dendrometerskih traka na plohi hrasta medunca

3.2.14.2. Utvrđivanje stanja krošnji

Osutost krošnji (pokazatelj gustoće lišća stabala u odnosu na referentno stablo) i učestalost stabla s uočenim gubitkom lišća koristiti se kao dodatni pokazatelji zdravstvenog stanja stabla na plohama (Eichhorn i sur., 2016). Osutost je definirana kao gubitak lišća u procjenjivom dijelu krošnje ocijenjen u odnosu na referentno stablo i ono se često koristi kao indikator vitaliteta šuma. Procjena se vrši u pragovima od 5 %, a kasnije se rezultati grupiraju u klase prema Tablici 3. Značajno oštećenim stablom smatra se stablo osutosti iznad 25 % (Eichhorn i sur. 2016). Jednom godišnje procijenila se osutost na 45 stabla po plohi. Procjena se vršila u periodu od kad se lišće/iglice u potpunosti razvije te prije početka jesenskog starenja.

Procjena se obavlja na predominantnim, dominantnim i kodominantnim stablima. Za procjenu se u obzir uzima samo osvijetljeni dio krošnje. Postotak osutosti procjenjuje se na osnovi usporedbe određenog stabla s foto-priručnikom te zamišljenim lokalnim referentnim stablom, koje je definirano prema ICP Forests priručniku "najbolje stablo s potpunom krošnjom koje može uspijevati na određenom lokalitetu" (Eichhorn i sur. 2016). Procjenu osutosti obavljaju dva promatrača, uz korištenje dvogleda.

Tablica 3. Klase osutosti

Klasa	Osutost	Postotak gubitka lisne mase
0	nema	0-10 %
1	mala	>10-25 %
2	umjerena	>25-60 %
3	jaka	>60-99 %
4	mrtvo stablo	100 %

Izračunao se srednji godišnji prirast te srednja godišnja vrijednost osutosti krošnje te su se ti podaci dalje koristili u statističkoj obradi.

3.2.15. Određivanje biokemijskih pokazatelja oksidativnog stresa

Prema utvrđenim vrijednostima osutosti stabala odabrale su se jedinke s kojih su se uzeli uzorci lišća i iglica na visini od 2 - 4 m s osunčane strane. Odabranim uzorcima odredili su se biokemijski pokazatelj koji nastaju kao posljedica oksidativnog stresa (Rautio i sur., 2020). Odredili su se sadržaj fotosintetskih pigmenata (klorofila), količina malondialdehida kao pokazatelja lipidne peroksidacije i količina vodikovog peroksida (H_2O_2) te aktivnosti antioksidativnih enzima (superoksid-dismutaze, nespecifičnih peroksidaza, katalaze i askorbat-peroksidaze) na UV-VIS spektrofotometru s ciljem boljeg razumijevanja uloge antioksidativnog sustava biljke u obrani od oksidativnog stresa uzrokovanog onečišćenjem zraka (Sharma i sur., 2012).

3.2.15.1. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Uzorcima odredio se sadržaj klorofila a (Chl_a), klorofila b (Chl_b) te ukupnog klorofila (Chl_T) Sadržaj klorofila određuje se u uzorcima listića homogenizacijom uz dodatak 80%-tne otopine acetona u vodi (v/v). Ekstrakcije klorofila provede se u mraku pri temperaturi 4 °C tijekom 24 h. Uzorci su zatim centrifugirani na centrifugi Ohaus Frontier 5718 te je na spektrofotometru izmjerena apsorbancija supernatanta pri valnim duljinama 663 nm i 645 nm. Sadržaj fotosintetskih pigmenata izražava se kao μg fotosintetskih pigmenata po gramu svježeg

tvari ($\mu\text{g g}^{-1}$ svj. tv.) (Arnon, 1949). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.15.2. Određivanje količine vodikovog peroksida (H_2O_2) i lipidne peroksidacije (LPO)

Za određivanje lipidne peroksidacije i sadržaja H_2O_2 izvršila se ekstrakcija gdje se biljni materijal homogenizirao u tarioniku uz dodatak otopine trikloroetene kiseline u vodi te je dobiveni ekstrakt koji se centrifugira na centrifugi BioSan Microspin 12. Dobiveni supernatant čuva se na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do analize. Dobiveni koristi se za određivanje lipidne peroksidacije i količine H_2O_2 .

Određivanje količine vodikovog peroksid (H_2O_2)

Vodikov peroksid generira se u stanici i pod normalnim uvjetima. Izlaganjem stresu, nastaje H_2O_2 koji je srednje reaktivan i može daleko putovati i uzrokovati štetu dalje od mjesta nastanka (Sharma i sur. 2012). Za određivanje H_2O_2 uzme se alikvot ekstrakta te dodaje kalij fosfatnog pufera i kalijev jodid. Slijedi određivanje apsorbancije pri valnoj duljini 390 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent za H_2O_2 iznosi $0,28\ \mu\text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$, a količina H_2O_2 izražava se kao μmol po gramu svježe tvari ($\mu\text{mol g}^{-1}$ svj. tv.). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

Određivanje lipidne peroksidacije (LPO)

Kad razina ROS -a dosegne iznad praga, dolazi do pojačane peroksidacije lipida u staničnim i organelarnim membranama, koje pak utječu na normalno funkcioniranje stanica. Malondialdehid (MDA) jedan je od konačnih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima i odgovoran je za oštećenje stanične membrane (Sharma i sur., 2012). Za određivanje lipidne peroksidacije određuje se količina nastalog krajnjeg produkta lipidne peroksidacije – malondialdehida (MDA) koji s trikloroetenim kiselinom (TCA) daje obojeni produkt. Supernatantu se doda 0,5 %-tne tiobarbituratne kiseline (TBA) u 20 %-tnoj trikloroetenoj kiselini (TCA). Reakcijska smjesa se zagrijava u vodenoj kupelji pri

temperaturi. Slijedi naglo hlađenje u ledenoj kupelji te centrifugiranje. Apsorbancija se mjeri pri valnim duljinama 532 nm i 600 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog MDA iznosi $155,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a količina malondialdehida (MDA) izražava se kao nmol po gramu svježe tvari (nmol g^{-1} svj. tv.). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.15.3. Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu i aktivnosti antioksidativnih enzima

Homogenizacijom biljnog materijala vršila se u tarioniku na ledu uz dodatak polivinil-polipirrolidona i hladnog pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0. Dobiveni ekstrakt se centrifugira te se dobiveni supernatant dekantira i čuva na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize. Dobiveni supernatant koristi se za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu, mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), nespecifičnih peroksidaza (POD), katalaze (CAT) i askorbat-peroksidaze (APX).

Određivanje koncentracije ukupnih topljivih proteina po Bradfordu

Ukupni topljivi proteini odredili su se metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). U kivetu se otpipetira alikvot ekstrakta te dodaje Bradfordov reagens. Slijedi inkubacija u tamnoj sobi (npr ormar) na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon 15 minuta uzorci se prenesu u tamnoj posudi do spektrofotometra i očitava se apsorbancija pri 595 nm.

Mjerenje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD)

Kada se biljka nađe pod stresom, zbog suše, povećanje koncentracije soli, dolazi do proizvodnje ROS-a. Kako bi se obranila, aktiviraju se obrambeni mehanizmi. Jedan od njih je i proizvodnja superoksid-dizmutaze (SOD), koja je prva linija obrane biljke od ROS-a (Ambriović Ristov i sur., 2007). Pripremila su se različita razrijeđenja ekstrakta miješanjem određenih volumena ekstrakta i pufera za ekstrakciju proteina pH = 7,0 do određenog volumena. U epruvetu se doda pufer za mjerenje aktivnosti superoksid-dizmutaze pH = 7,8 i razrijeđeni ekstrakt. Dodaje se još i određen volumen otopine riboflavina u vodi te se

enzimska reakcija pokrene uključivanjem izvora svjetla od 36 W. Reakcija se prekida nakon 10 min gašenjem izvora svjetla i zamračivanjem uzorka. Slijedi mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini 560 nm i izrada krivulje aktivnosti enzima.

Aktivnost se izražava kao inhibicija redukcije supstrata (15):

$$\text{NBT (\%)} = [(A-B)/A] \cdot 100 \quad [15]$$

gdje je: A apsorbancija izmjerena nakon reakcije bez enzima (najveća vrijednost apsorbancije), a B apsorbancija izmjerena nakon reakcije s enzimom (smanjenje apsorbancije)

Krivulja aktivnosti enzima izradi se tako da se na apscisu volumeni razrijeđenog enzimskog ekstrakta (1:40) upotrijebljeni za pripremu razrjeđenja (npr. 0, 4; 20; 40 i 80 μL), a na ordinatu nanese vrijednosti inhibicije redukcije supstrata NBT (%). Jedinica aktivnosti SOD jednaka je količini enzima potrebnog za 50 % inhibicije NBT u reakcijskoj smjesi. Također, odredi se volumen enzimskog ekstrakta koji uzrokuje 50 % inhibicije redukcije NBT te iz koncentracije ukupnih proteina izračuna se specifična aktivnost SOD. Aktivnost SOD izražava se u jedinicama enzimske aktivnosti po miligramu ukupnih proteina ($\text{U mg}^{-1} \text{P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

Mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza (POD)

Nespecifične peroksidaze (POD) ima bitnu ulogu u biljci gdje je uključen u procese poput zarastanja rana te obranu od patogena (Ambriović Ristov i sur., 2007). Dobiveni ekstrakt se razrijedio. U kivetu se otpipetira alikvot pufera za mjerenje aktivnosti nespecifičnih peroksidaza i započne reakcija dodatkom razrijeđenog ekstrakta. Na spektrofotometru se prati porast apsorbancije u određenom vremenu pri valnoj duljini 470 nm. Molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog tetragvajakola iznosi $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalaza (CAT) uspješno katalizira dismutaciju H_2O_2 u vodu i kisik, ima veliku brzinu reakcije, ali joj je afinitet za supstrat slab (Ambriović Ristov i sur., 2007). Uzorci su dobiveni

razrjeđivanjem ekstrakta. U kvarcnu kivetu otpipetira se alikvot pufera za mjerenje aktivnosti katalaze te se reakcija započne dodatkom alikvotom razrijeđenog uzorka. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 240 nm u određenom vremenskom periodu. Ekstinkcijski koeficijent iznosi $40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost katalaze izražava se kao mmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

Mjerenje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX)

Askorbat-peroksidaza (APX) najvažnija je za uklanjanje vodikovog peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala u stanici (Ambriović Ristov i sur., 2007). U kvarcnu kivetu otpipetira se alikvot pufera za mjerenje aktivnosti askorbat-peroksidaze, zatim alikvot Na-askorbata i alikvot ekstrakta/supernatanta. Reakcija započinje dodatkom alikvotom vodikovog peroksida. Spektrofotometrijski se mjeri pad apsorbancije pri valnoj duljini 290 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao smanjenje količine askorbata s ekstinkcijskim koeficijentom $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Aktivnost askorbat-peroksidaze izražava se kao nmol po min i mg ukupnih proteina ($\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ P}$) (Ambriović Ristov i sur., 2007). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

3.3. Statistička obrada podataka

Analizom dobivenih podataka, utvrdile su se uzročno-posljedične veze između fizioloških parametara stabala i atmosferskih unosa koristeći različite statističke alate. Podaci su obrađeni koristeći Microsoft Office Excel 2010, Statistica 13.0. software paket (StatSoft Inc, 2011; StatSoft Inc, 2013).

Deskriptivna analiza podataka provedena je korištenjem Microsoft Office Excel 2010, Statistica 13.0. Za provjeru raspodjele podataka atmosferskoga taloženja koristio se Kolmogorov-Smirnov test. Značajnost podataka testirana je Wilcoxonovim testom za $p < 0,05$. Korelacija je ispitana Spearmanovim testom korelacije kako bi se procijenilo postoji li veza između iona u BOF i THR uzorcima te jakost same veze među njima (Burbano-Garces i sur., 2014). Analiza varijance (ANOVA) se koristila kako bi se ispitale razlike među ionima prikupljenih atmosferskim taloženjem tijekom istraživanja. Nakon provedene analize, ako su

postojale razlike među skupinama, proveo se Tukey post-hoc test kako bi se utvrdilo među kojim skupinama postoji razlika.

ANOVA se koristila kako bi se ispitale razlike na pojedinoj plohi između varijabli: osutost, prirast, parametri ozona [akumuliranog ozona AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}] i fitotoksičnog ozona (POD0, POD1, POD2)] te sadržaj vode u tlu na četiri različite dubine (SWC1, SWC2, SWC3, SWC4). Nakon analize varijance, primijenjen je Newman-Keulsov test, post-hoc test kako bi se ispitale razlike među parametrima ozona [akumuliranog ozona AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}] i fitotoksičnog ozona (POD0, POD1, POD2)].

Za izračun korelacije koristili su se podaci preuzeti iz baze podataka Copernicus [temperatura (T), sunčevo zračenje (Rad), relativna vlažnost (RH), kiša (rain), voda u tlu (SWC1-4)] dostupne na stranici (<https://cds.climate.copernicus.eu/>). Nakon utvrđenih značajnih varijabli (temperatura, sunčevo zračenje, relativna vlažnost, kiša, voda u tlu) te izračunatih parametara ozona (AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}, POD0, POD1, POD2), provedene su korelacija i parcijalna korelacija. Parcijalna korelacija se provela tako da su se okolišne varijable držale konstantnima, točnije, temperatura i sadržaj vode u tlu na prvoj dubini (SWC1). Dakle, provele su se 3 parcijalne korelacije, prva gdje je temperatura bila konstantna, druga gdje je SWC1 bio konstantan te treća kada su temperatura i SWC bili konstantni (Proietti i sur., 2016).

Statistički alat RFA (eng. *Random Forest Analysis*) koristio se za utvrđivanje učinka klimatskih varijabli na prirast stabala (Breiman i Cutler, 2003). Parametri koji su korišteni bili su temperatura, relativne vlage, sadržaj vode u tlu, sunčevog zračenja i taloženja dušika, koncentracije ozona i apsorpcije ozona (fitotoksična doza ozona preko praga Y, PODY). RFA se koristi kako bi se procijenio koji je od navedenih parametara najvažniji pokazatelj (dodjeljuje se vrijednost 1) među meteorološkim parametrima (temperatura, relativne vlage, sadržaj vode u tlu, sunčevog zračenja) i parametara ozona (AOT40 i PODY) te koji od njih ima najveći utjecaj na prirast.

Provedena je deskriptivna analiza (srednje vrijednosti i standardna devijacija) indikatora oksidativnog stresa. Izračunate prosječne vrijednosti analiziranih indikatora te pripadajuće varijance i standardne devijacije. Za provjeru statističke značajnosti među indikatorima oksidativnog stresa koristio se *t*-test.

4. REZULTATI

4.1. Atmosfersko taloženje

Rezultati kemijskog sastava atmosferskoga taloženja, pH, provodljivosti i alkaliteta u uzorcima mokrog taloženje (izvan šume, BOF, eng. *bulk open field*) i prokaplivanja (u šumi, THR, eng. *throughfall*) prikazani su u Tablici 4. za period od travnja 2017. do prosinca 2019. Količina padalina prikupljena u THR uzorcima na sve četiri plohe bila je niža od količine prikupljene u BOF uzorcima. Količine padalina razlikovale su se ovisno o plohi. Najveće količine padalina izmjerene su u THR i BOF uzorcima na plohi crnog bora, 1347 mm odnosno 1467 mm, a najniža na plohi alepskog bora, 350 mm u THR uzorcima i 287 mm u BOF uzorcima (Tablica 4).

Utvrđene vrijednosti pH kretale su se između 5,52 na plohi crnog bora i 6,18 na plohi alepskog bora. Vrijednosti provodljivosti su bile veće u THR-u na svim plohama u odnosu na BOF uzorke. Najveće vrijednosti provodljivosti utvrđene su na plohi hrasta crnike. Na svim ispitivanim plohama najveće vrijednosti atmosferskih taloženja (BOF i THR) izmjerene su za Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ i Cl^- (Tablica 4). Visoke vrijednosti utvrđene su i za SO_4^{2-} . Najveće vrijednosti SO_4^{2-} utvrđene su na plohi hrasta crnike za sve tri godine i to s većim vrijednostima u THR-u (Tablica 4).

Usporedbom atmosferskih taloženja u uzorcima BOF-a i THR-a na ispitivanim plohama može se primijetiti da su najveće vrijednosti izmjerene za većinu iona u 2019. godini osim za plohu crnog bora gdje su najveće vrijednosti uglavnom utvrđene u 2018. godini. Vrijednosti alkaliteta veće su u uzorcima THR-a i variraju ovisno o plohi. Najveća prosječna vrijednost alkaliteta utvrđena je na plohi hrasta medunca u 2019. godini u THR-u (Tablica 4).

Tablica 4. Količina oborina (V), pH, provodljivost, atmosfersko taloženje određivanih iona i alkalitet na plohi hrasta medunca (Poreč), hrasta crnike (Šišan), alepskog bora (Vrana) i crnog bora (Split) unutar šumi (THR) i izvan šume (BOF). Rezultati volumena kiše prikazani su kao suma, dok su ostali rezultati prikazani kao godišnji prosjek \pm standardna devijacija za period od 2017. do 2019.

Vrsta	God.	Vrsta uzorka	V mm	pH	Provodljivost $\mu\text{S cm}^{-1}$	Ca^{2+} meq m^{-2}	Mg^{2+} meq m^{-2}	Na^{+} meq m^{-2}	K^{+} meq m^{-2}	NH_4^{+} meq m^{-2}	SO_4^{2-} meq m^{-2}	NO_3^{-} meq m^{-2}	Cl^{-} meq m^{-2}	Alkalitet $\mu\text{eq L}^{-1}$
hrast medunac	2017	BOF	732	5,85 \pm 0,53	27,02 \pm 20,00	155,73 \pm 8,29	32,26 \pm 1,94	37,05 \pm 2,22	27,68 \pm 2,08	14,98 \pm 0,89	62,64 \pm 3,28	18,98 \pm 1,08	41,63 \pm 2,44	22,73 \pm 12,63
		THR	709	5,95 \pm 0,35	49,46 \pm 37,80	167,23 \pm 8,83	41,36 \pm 2,25	48,10 \pm 3,03	36,92 \pm 2,37	19,08 \pm 0,78	90,21 \pm 4,46	24,30 \pm 1,17	52,26 \pm 3,06	47,69 \pm 22,30
	2018	BOF	1068	5,95 \pm 0,54	21,87 \pm 16,70	182,48 \pm 6,41	31,47 \pm 1,79	35,48 \pm 3,54	35,90 \pm 3,20	31,12 \pm 2,99	67,83 \pm 3,02	17,18 \pm 0,57	47,58 \pm 3,71	36,44 \pm 34,21
		THR	999	6,05 \pm 0,26	38,01 \pm 29,17	257,48 \pm 10,10	45,82 \pm 2,42	60,23 \pm 4,66	75,15 \pm 6,00	42,10 \pm 2,60	93,26 \pm 5,67	25,05 \pm 0,99	81,19 \pm 7,29	50,51 \pm 35,22
	2019	BOF	1304	5,55 \pm 0,51	18,62 \pm 7,43	312,72 \pm 22,98	85,81 \pm 4,99	77,41 \pm 5,68	61,93 \pm 7,62	18,88 \pm 1,22	161,79 \pm 13,24	42,17 \pm 2,31	96,27 \pm 7,83	21,47 \pm 10,46
		THR	1266	6,03 \pm 0,27	41,40 \pm 40,00	371,31 \pm 17,77	100,27 \pm 4,78	96,61 \pm 6,28	136,43 \pm 11,17	16,63 \pm 0,77	167,86 \pm 13,10	55,05 \pm 2,68	142,10 \pm 10,61	94,72 \pm 160,27
hrast crnika	2017	BOF	718	5,78 \pm 0,49	48,30 \pm 25,91	148,80 \pm 8,72	87,81 \pm 6,68	269,80 \pm 26,94	45,56 \pm 2,24	21,12 \pm 1,32	113,98 \pm 7,44	16,81 \pm 1,33	384,69 \pm 38,74	26,62 \pm 12,48
		THR	631	5,94 \pm 0,30	111,41 \pm 51,26	139,23 \pm 7,00	75,37 \pm 4,68	192,67 \pm 16,31	59,75 \pm 3,34	25,91 \pm 1,63	133,55 \pm 8,33	20,37 \pm 1,70	301,00 \pm 27,22	46,81 \pm 27,8
	2018	BOF	1073	5,92 \pm 0,46	37,63 \pm 21,71	199,82 \pm 6,16	110,65 \pm 5,31	250,28 \pm 18,16	33,80 \pm 1,72	17,81 \pm 1,45	145,90 \pm 5,45	19,90 \pm 0,80	495,60 \pm 27,80	36,32 \pm 28,74
		THR	968	5,95 \pm 0,31	109,73 \pm 53,47	232,49 \pm 7,64	153,41 \pm 7,51	395,88 \pm 25,55	76,86 \pm 3,64	22,01 \pm 1,03	202,54 \pm 9,16	25,56 \pm 0,87	751,74 \pm 43,21	49,76 \pm 32,57
	2019	BOF	1129	5,97 \pm 0,63	50,89 \pm 53,94	200,86 \pm 7,13	123,37 \pm 6,85	251,58 \pm 16,44	47,62 \pm 3,21	51,98 \pm 5,30	155,31 \pm 7,34	19,63 \pm 0,60	330,20 \pm 24,36	47,20 \pm 31,49
		THR	1116	5,97 \pm 0,28	96,1 \pm 68,83	274,22 \pm 7,57	203,59 \pm 7,55	484,24 \pm 24,32	142,35 \pm 6,37	39,49 \pm 2,05	308,58 \pm 11,72	32,07 \pm 1,28	627,46 \pm 33,17	68,42 \pm 40,01
alepski bor	2017	BOF	350	5,74 \pm 0,28	10,65 \pm 3,46	62,48 \pm 9,63	10,78 \pm 1,69	14,00 \pm 2,55	6,37 \pm 0,98	4,15 \pm 1,03	12,19 \pm 2,48	5,16 \pm 0,79	16,30 \pm 2,68	19,00 \pm 5,94
		THR	287	5,86 \pm 0,29	29,46 \pm 13,27	51,04 \pm 7,93	13,03 \pm 2,57	14,17 \pm 2,82	8,08 \pm 1,31	8,09 \pm 0,88	20,36 \pm 4,90	12,26 \pm 4,08	17,69 \pm 3,61	37,00 \pm 13,27
	2018	BOF	900	6,19 \pm 0,52	24,47 \pm 28,34	225,10 \pm 10,17	38,38 \pm 1,53	76,02 \pm 11,93	30,21 \pm 1,46	77,37 \pm 12,05	92,11 \pm 6,42	18,27 \pm 1,13	131,83 \pm 18,82	45,69 \pm 61,43
		THR	749	5,86 \pm 0,39	65,81 \pm 47,53	141,38 \pm 7,90	29,65 \pm 1,54	43,44 \pm 5,66	26,71 \pm 1,32	40,67 \pm 6,00	59,88 \pm 3,35	11,44 \pm 0,64	73,65 \pm 10,33	58,07 \pm 70,59
	2019	BOF	1046	5,93 \pm 0,57	20,38 \pm 6,80	280,34 \pm 9,07	82,84 \pm 2,74	131,38 \pm 7,64	46,08 \pm 2,38	23,36 \pm 1,16	123,61 \pm 5,20	28,95 \pm 1,38	164,05 \pm 11,21	40,00 \pm 22,95
		THR	806	5,68 \pm 0,31	43,16 \pm 23,09	206,03 \pm 8,37	60,89 \pm 2,62	101,29 \pm 5,98	52,77 \pm 2,98	11,39 \pm 1,10	114,43 \pm 8,04	32,09 \pm 1,43	149,34 \pm 9,00	52,62 \pm 31,96
crni bor	2017	BOF	668	6,09 \pm 0,61	15,32 \pm 12,78	190,32 \pm 18,65	27,45 \pm 2,56	22,77 \pm 2,17	19,24 \pm 1,96	15,74 \pm 2,00	47,75 \pm 5,22	28,84 \pm 3,50	23,10 \pm 2,10	44,25 \pm 25,89
		THR	507	5,86 \pm 0,37	23,89 \pm 12,76	162,08 \pm 19,59	26,69 \pm 3,37	21,58 \pm 2,63	21,10 \pm 2,84	13,14 \pm 2,01	45,07 \pm 6,59	27,06 \pm 4,85	23,84 \pm 2,90	52,32 \pm 19,75
	2018	BOF	1417	5,90 \pm 0,68	16,80 \pm 9,74	349,15 \pm 13,55	45,33 \pm 1,67	20,81 \pm 1,48	16,68 \pm 0,74	52,34 \pm 5,69	75,93 \pm 2,78	26,73 \pm 1,12	87,25 \pm 4,61	31,11 \pm 27,12

Rezultati

	THR	1222	5,79±0,35	32,57±28,16	357,69±7,57	85,34±6,07	122,60±15,01	51,95±4,62	42,20±3,04	100,18±3,21	18,82±0,53	185,29±18,77	39,96±33,60
2019	BOF	1467	5,57±0,48	15,84±5,62	272,18±8,53	48,20±1,70	69,75±3,78	19,51±0,80	9,56±0,67	114,08±5,23	26,83±0,94	80,93±4,92	33,24±19,01
	THR	1347	5,52±0,30	21,82±9,91	327,76±7,91	67,59±1,76	81,33±3,36	38,98±1,43	14,52±0,31	139,02±4,53	36,46±1,29	101,54±4,79	40,89±24,61

Primjenom Wilcoxonovog testa na dvotjednim mjerenjima utvrđene su značajne razlike između BOF i THR uzoraka na ispitivanim plohama (Tablica 5). Utvrđena je razlika za Ca^{2+} na plohi hrasta crnike i alepskog bora. Razlike za Mg^{2+} , Na^+ i SO_4^{2-} utvrđene su na hrastovim plohama, dok je za K^+ i Cl^- utvrđeno na hrastovim plohama i na plohi crnog bora. Za NO_3^- , razlika je utvrđena samo na plohi hrasta medunca. Na svim plohama, nije utvrđena razlika za NH_4^+ .

Značajne razlike alkalitet utvrđene su na hrastovim plohama i na plohi alepskog bora (Tablica 5).

Tablica 5. Prikaz značajnih razlika između atmosferskog taloženja iona u uzorcima dobivenim mokrim taloženjem (BOF) i prokapljivanjem (THR) na plohi hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora (Wilcoxonov test, značajni rezultati su podebljani za $p < 0,05$).

Vrsta	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	N-NH_4^+	SO_4^{2-}	N-NO_3^-	Cl^-	Alkalitet
Hrast medunac	0,13	0,00	0,01	0,00	0,12	0,02	0,02	0,01	0,00
Hrast crnika	0,02	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,31	0,00	0,00
Alepski bor	0,01	0,11	0,14	0,10	0,48	0,66	0,26	0,11	0,00
Crni bor	0,43	0,38	0,08	0,00	0,17	0,92	0,10	0,01	0,06

Primjenom Spearmanove korelacije na dvotjednim mjerenjima (od travnja 2017. do prosinca 2019.) utvrđene su značajne korelacije između BOF i THR uzoraka (Tablica 6). Na svim plohama, utvrđene su značajne korelacije za katione Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ i K^+ na plohi crnog bora za Ca^{2+} te na plohi hrasta crnike za K^+ korelacija je značajna ali niske vrijednosti koeficijenta korelacije. Za NH_4^+ utvrđena je značajna korelacija na svim plohama osim na plohi alepskog bora. Za anione SO_4^{2-} , NO_3^- i Cl^- utvrđene su značajne korelacije na svim plohama. Značajna korelacija za alkalitet utvrđena je na borovim plohama.

Tablica 6. Koeficijenti korelacije između atmosferskog taloženja iona u uzorcima dobivenim mokrim taloženjem (BOF) i prokapljivanjem (THR) na plohi hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora. Značajni rezultati su podebljani za $p < 0,05$

	Vrsta	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	N-NH ₄ ⁺	SO ₄ ²⁻	N-NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Alkalitet
Koeficijent korelacije	Hrast medunac	0,87	0,78	0,66	0,59	0,72	0,80	0,72	0,51	0,16
	Hrast crnika	0,67	0,61	0,79	0,32	0,53	0,49	0,37	0,79	0,29
	Alepski bor	0,69	0,80	0,88	0,82	0,39	0,77	0,74	0,89	0,45
	Crni bor	0,77	0,63	0,85	0,68	0,59	0,80	0,77	0,88	0,68

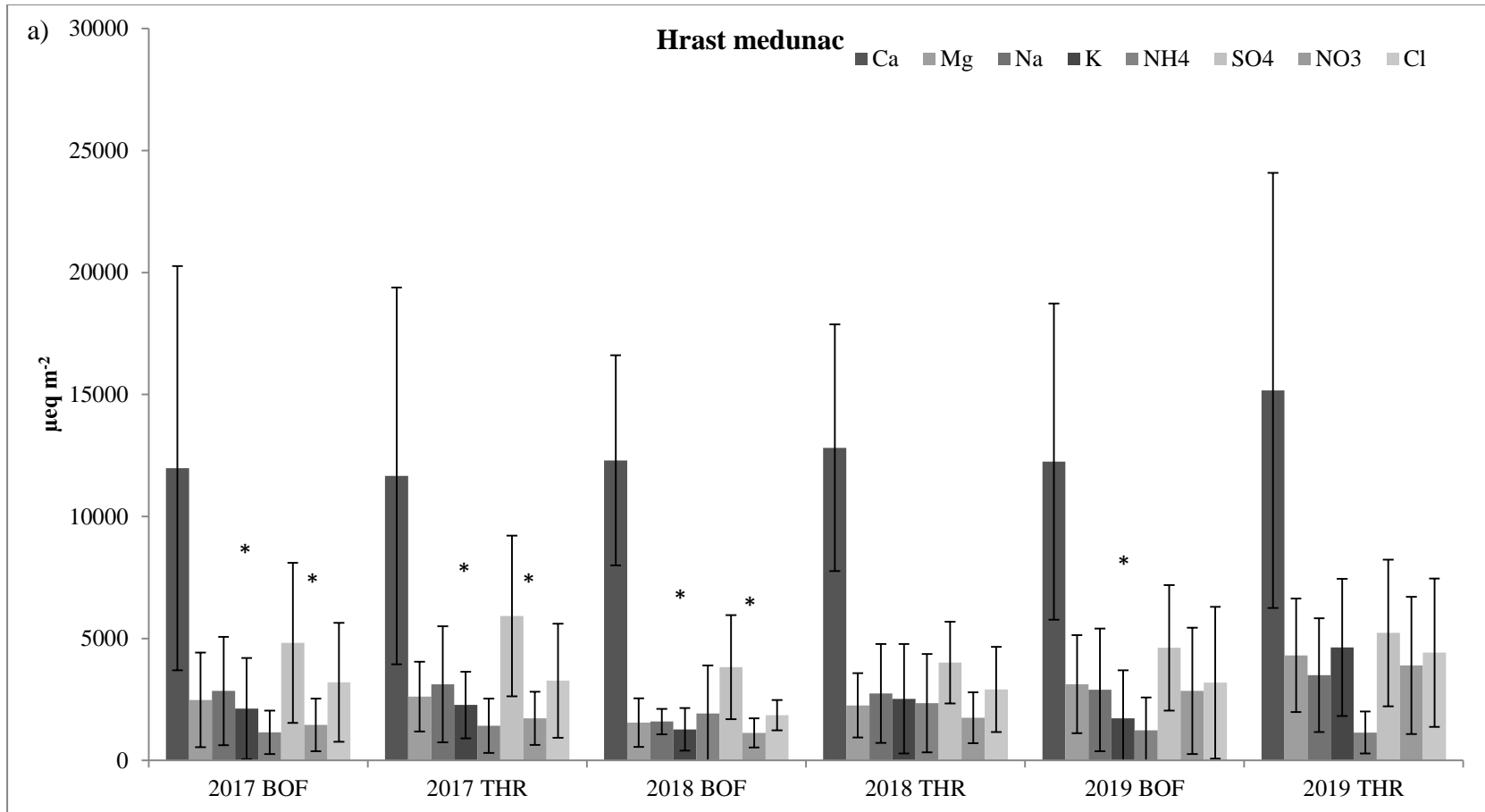
Analiza varijance (ANOVA) je korištena kako bi se ispitale razlike među ionima prikupljenim atmosferskim taloženjem u BOF i THR uzorcima u 2017., 2018. i 2019. godini. Nakon provedene analize utvrdile su se razlike između skupina te se proveo Tukey post-hoc test da se utvrdi među kojim skupinama postoje razlike (Slika 13a-d).

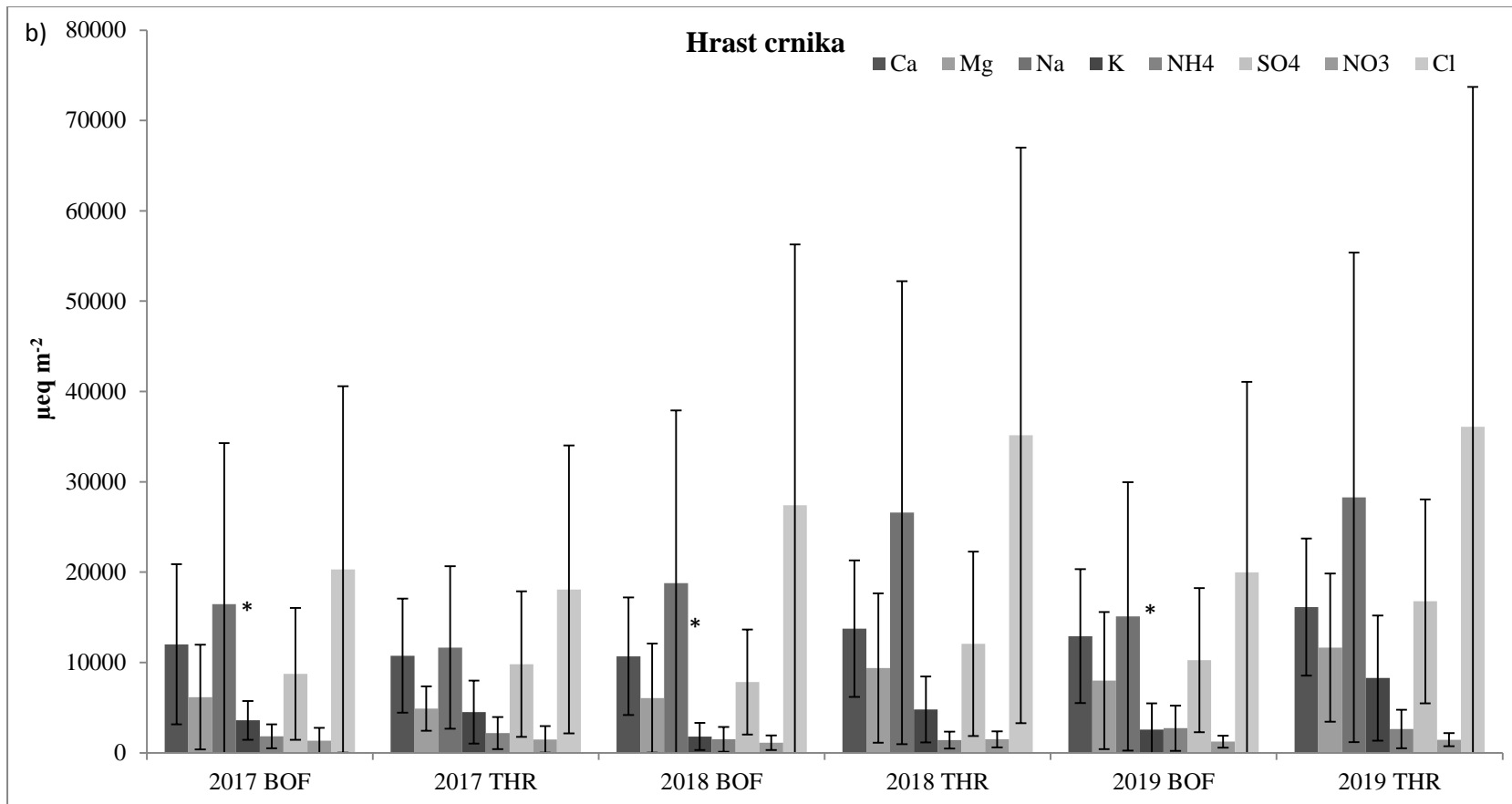
Značajne razlike na plohi hrasta medunca uočene su za K⁺, NO₃⁻ i alkalitet. Za K⁺ utvrđena je razlika u THR-u između 2017. i 2019. te u 2019. godini između BOF-a i THR-a (Slika 13a). Za NO₃⁻ značajna razlika utvrđena je u THR-u između 2017. i 2019. godine. Značajna razlika alkaliteta unutar tri godine mjerenja, zabilježena je u 2019. godini između BOF-a i THR-a (Slika 13a).

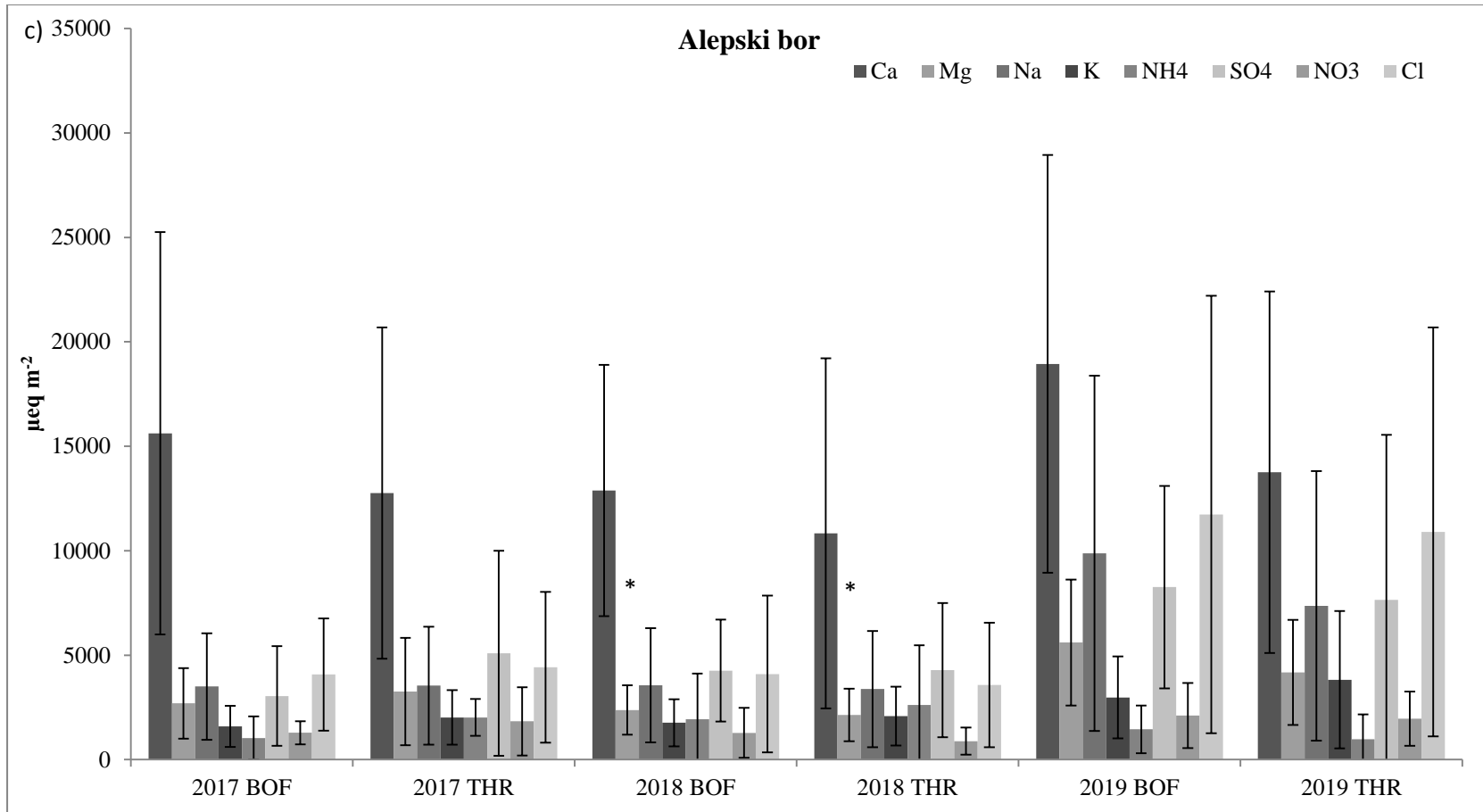
Na plohi hrasta crnike značajna razlika utvrđena je za K⁺ u 2019. godini između BOF i THR (Slika 13b).

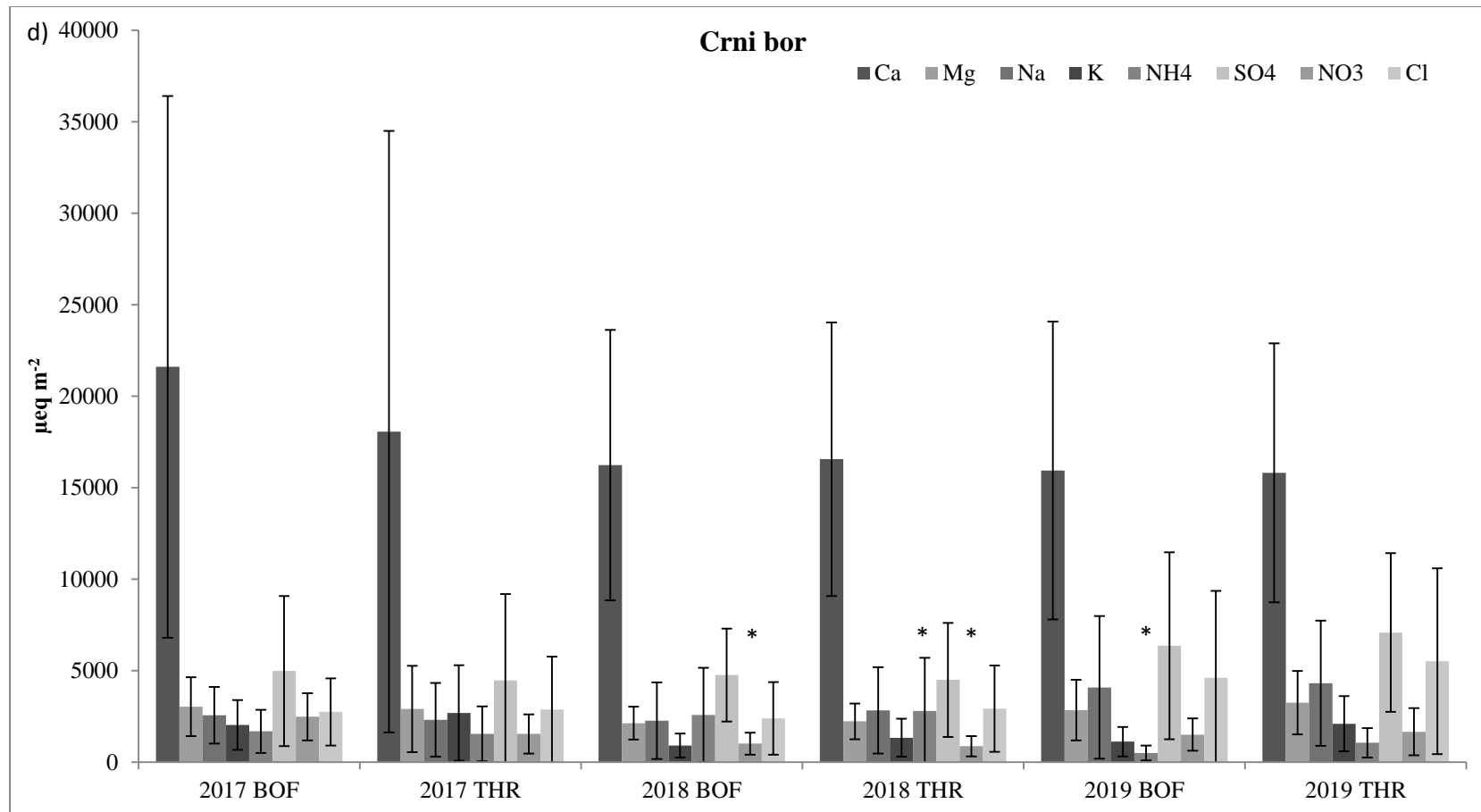
Razlike na plohi alepskog bora utvrđene su razlike za Mg²⁺ u BOF-u između 2018. i 2019. godine (Slika 13c).

Na plohi crnog bora značajne razlike utvrđene su za NH₄⁺ i NO₃⁻. Za NH₄⁺ značajna razlika utvrđena je u THR-u između 2018. i 2019. godine, dok se NO₃⁻ značajno razlikovao u BOF-u između 2017. i 2018. godine (Slika 13d).









Slika 13. Rezultati post-hoc Tukey HSD testa za istraživane ione između uzoraka dobivenim mokrim taloženjem (BOF) i prokapljanjem (THR) za tri godine (2017., 2018., 2019.) na plohi a) hrasta medunca, b) hrasta crnike, c) alepskog bora i d) crnog bora. Značajni rezultati za $p < 0,05$ označeni su zvjezdicom (*).

U Tablici 7. prikazana su stvarna i kritična opterećenja dušikom. Rezultati stvarnog opterećenja dušikom u šumi kretali su se između $4 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ na plohi alepskog bora u 2017. godini i $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ na plohi hrasta medunca u 2019. Na plohi alepskog bora stvarno opterećenje u 2018. bilo je $15 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Vrijednosti od 16 i $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ utvrđenih na plohi hrasta medunca u 2018. i 2019. ujedno su jedine vrijednosti koje su bile na granici kritičnog opterećenja. U 2017. godini niti jedna ploha nije bila blizu kritičnog opterećenja.

Tablica 7. Stvarna i kritična opterećenja dušikom (N) na plohama hrasta medunca hrasta crnike alepskog bora i crnog bora (Bobbink i Hettelingh, 2011).

Vrsta	Godina			Kritično opterećenje, CL
	2017	2018	2019	
	kg N ha ⁻¹ g ⁻¹			kg N ha ⁻¹ g ⁻¹
Hrast medunac	14	16	20	15-20
Hrast crnika	10	11	15	10-20
Alepski bor	4	15	14	5-15
Crni bor	5	8	10	15

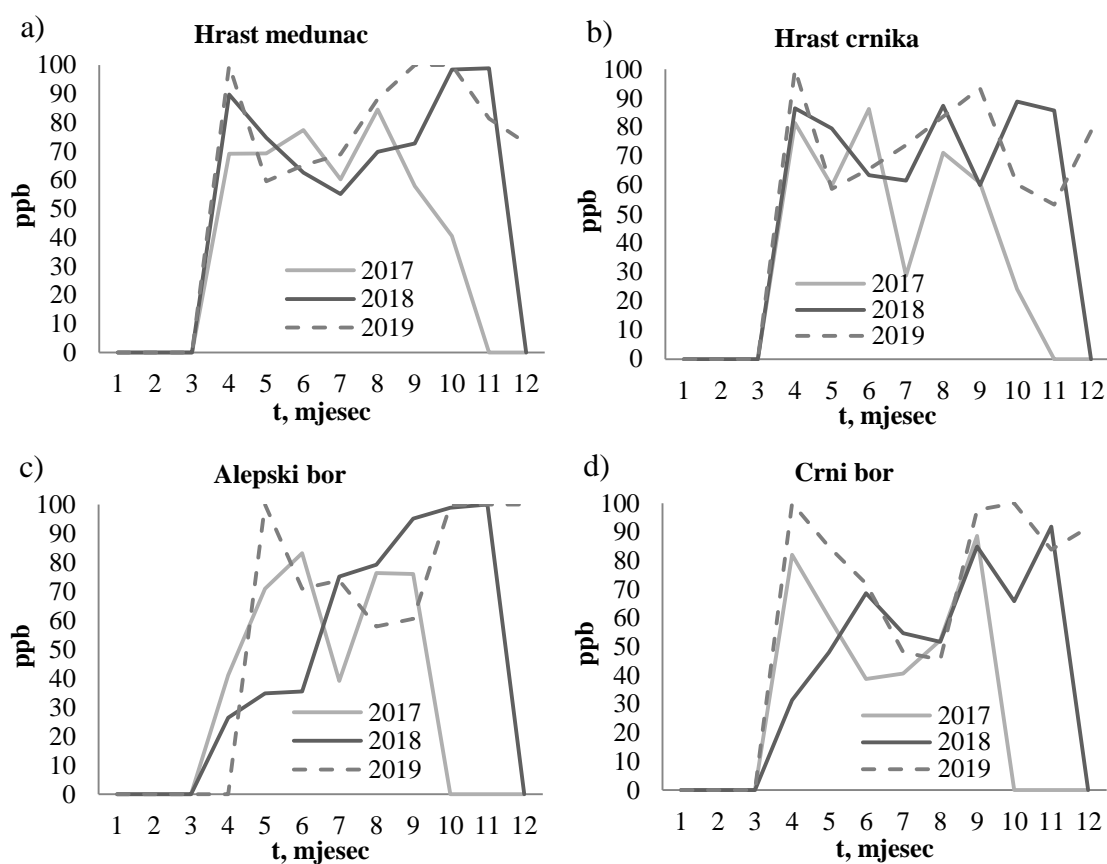
U Tablici 8 prikazana su stvarna opterećenja kiselim spojevima. Rezultati stvarnog opterećenja kiselim spojevima u šumi kretala su se između $14 \text{ kg ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ na plohi alepskog bora u 2017. godini i $135 \text{ kg ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ na plohi hrasta crnike u 2019. (Tablica 8). Uspoređujući vrijednosti opterećenja na pojedinoj plohi po godinama istraživanja, najveće vrijednosti utvrđene su u 2019. godini, izuzev plohe alepskog bora gdje je najveća utvrđena vrijednost bila u 2018. godini.

Tablica 8. Stvarna opterećenja kiselim spojevima (N+S) na plohama hrasta medunca hrasta crnike alepskog bora i crnog bora

Vrsta	Godina		
	2017	2018	2019
	kg ha ⁻¹ g ⁻¹	kg ha ⁻¹ g ⁻¹	kg ha ⁻¹ g ⁻¹
Hrast medunac	62	56	84
Hrast crnika	72	85	135
Alepski bor	14	60	59
Crni bor	20	41	55

4.2. Koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeracima

Koncentracije ozona izmjerene su na plohama hrasta medunca i crnike te alepskog i crnog bora. Utvrđene dvotjedne koncentracije ozona bile su veće u 2019. nego u 2017. i 2018. na sve četiri plohe, uglavnom tijekom ljeta i rane jeseni (Slika 14). Rezultati pokazuju da su izmjerene koncentracije na sve četiri plohe bile blizu ili su dosegle 100 ppb, vrijednost koja je preporučena kao gornja granica za pasivno mjerenje koncentracija ozona na šumskim plohama (Schaub i sur., 2016.). Na plohama alepskog i crnog bora 2017. godine koncentracije ozona bile su blizu granice za pasivno mjerenje ozona na šumskim plohama (Slika 14).



Slika 14. Dvotjedne koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeracima u 2017. (svijetla linija), 2018. (tamna linija) i 2019. (isprekidana linija) za plohe a) hrasta medunca, b) hrasta crnike, c) alepskog bora i d) crnog bora

4.2.1. Određivanje parametara za procjenu rizika od ozona za zaštitu vegetacije i šuma

Vrijednosti koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeracima preračunale su se u satne vrijednosti pomoću Loiblove jednadžbe (4). Dobivene satne vrijednosti koristile su se za izračun parametara akumuliranog ozona, AOT40, i fitotoksičnog ozona, PODY, za procjenu rizika od ozona kako bi se zaštitile šume i vegetacija.

Parametar AOT40 izračunat je na tri različita principa pomoću jednadžbi 5-7. Vrijednosti za sve AOT40 parametre bile su veće u 2018. nego u 2017. na plohama hrasta medunca, hrasta crnike i alepskog bora, ali ne i na plohi crnog bora (Tablica 9). Vrijednosti parametara AOT40_{ICP} (izračunato prema ICP Vegetation za određen vegetacijski period ovisno o vrsti) i AOT40_{pheno} (točan vegetacijski period za pojedinu vrstu) bile su veće na plohama crnog i alepskog bora nego na plohama hrasta crnike i medunca.

U 2017. za sve parametre AOT40 (> 57000 ppb h), najveće vrijednosti izračunate su za plohu crnog bora (Tablica 9), a najniže za plohu hrasta crnike (> 2300 ppb h). U 2018. godini bila je vidljiva razlika između vrijednosti AOT40_{dir} (izračunato prema Direktivi) i AOT40_{ICP}. Vrijednosti AOT40_{dir} bile su niže za sve plohe, izuzev plohe hrasta medunca. Najveća vrijednost AOT40_{dir} izračunata je za plohu crnog bora 55880 ppb h, a najniža za plohu hrasta crnike, 4480 ppb h.

Tablica 9. Parametri akumuliranog ozona (AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}) i fitotoksičnog ozona (POD0, POD1, POD2)

Vrsta	Godina	AOT40 _{dir} ppb h	AOT40 _{ICP} ppb h	AOT40 _{pheno} ppb h	POD0 mmol m ⁻²	POD1 mmol m ⁻²	POD2 mmol m ⁻²
Hrast medunac	2017	7870±3707	7069±3164	7221±6625	12±3	5±2	0±0
	2018	13113±3707	11544±3164	16590±6625	16±3	8±2	1±0
Hrast crnika	2017	2487±1409	2379±2440	2379±2440	3±0	0±0	0±0
	2018	4480±1409	5829±2440	5829±2440	3±0	0±0	0±0
Alepski bor	2017	20170±1380	25297±1447	25297±1447	7±2	2±1	0±0
	2018	39692±1380	45761±1447	45761±1447	9±2	3±1	0±0
Crni bor	2017	57359±1046	57896±7624	57896±7624	33±1	24±2	15±4
	2018	55880±1046	68678±7624	68678±7624	32±1	22±2	9±4

Za izračun parametara fitotoksičnog ozona (PODY) za tri različita praga (Y = 0, 1, 2) koristile su se jednadžbe 8 i 9. Najviše vrijednosti POD0, POD1 i POD2 u 2017. i 2018. godini su dobivene su za crni bor, a najniže vrijednosti za hrast crniku (Tablica 9).

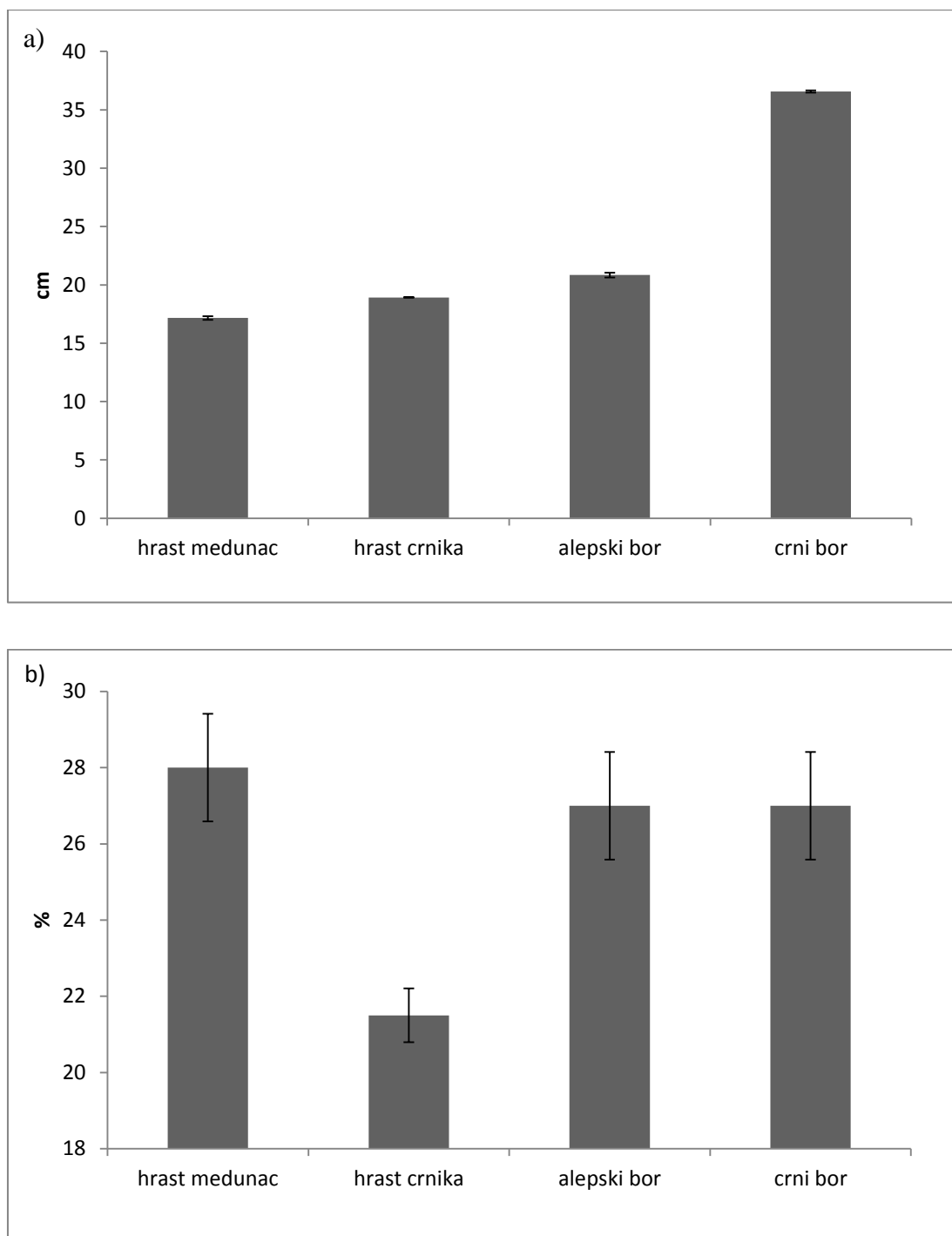
U 2017. vrijednosti POD2 bile su 0 mmol m^{-2} za sve vrste osim crnog bora 15 mmol m^{-2} . U 2018. godini POD2 za crni bor iznosio je 9 mmol m^{-2} , a za hrast medunac 1 mmol m^{-2} (Tablica 9). Vrijednosti za hrast crniku i alepski bor bile su 0 mmol m^{-2} .

4.3. Odnosi između okolišnih varijabli i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma

Korištenjem statističkih analiza utvrđen je odnos između okolišnih varijabli (temperatura, sunčevo zračenje, relativna vlažnost, kiša, sadržaj vode u tlu) te parametara ozona ($\text{AOT40}_{\text{dir}}$, $\text{AOT40}_{\text{ICP}}$, $\text{AOT40}_{\text{pheno}}$ i POD0 , POD1 , POD2) i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma (prirast i osutost) (Slike 15-18).

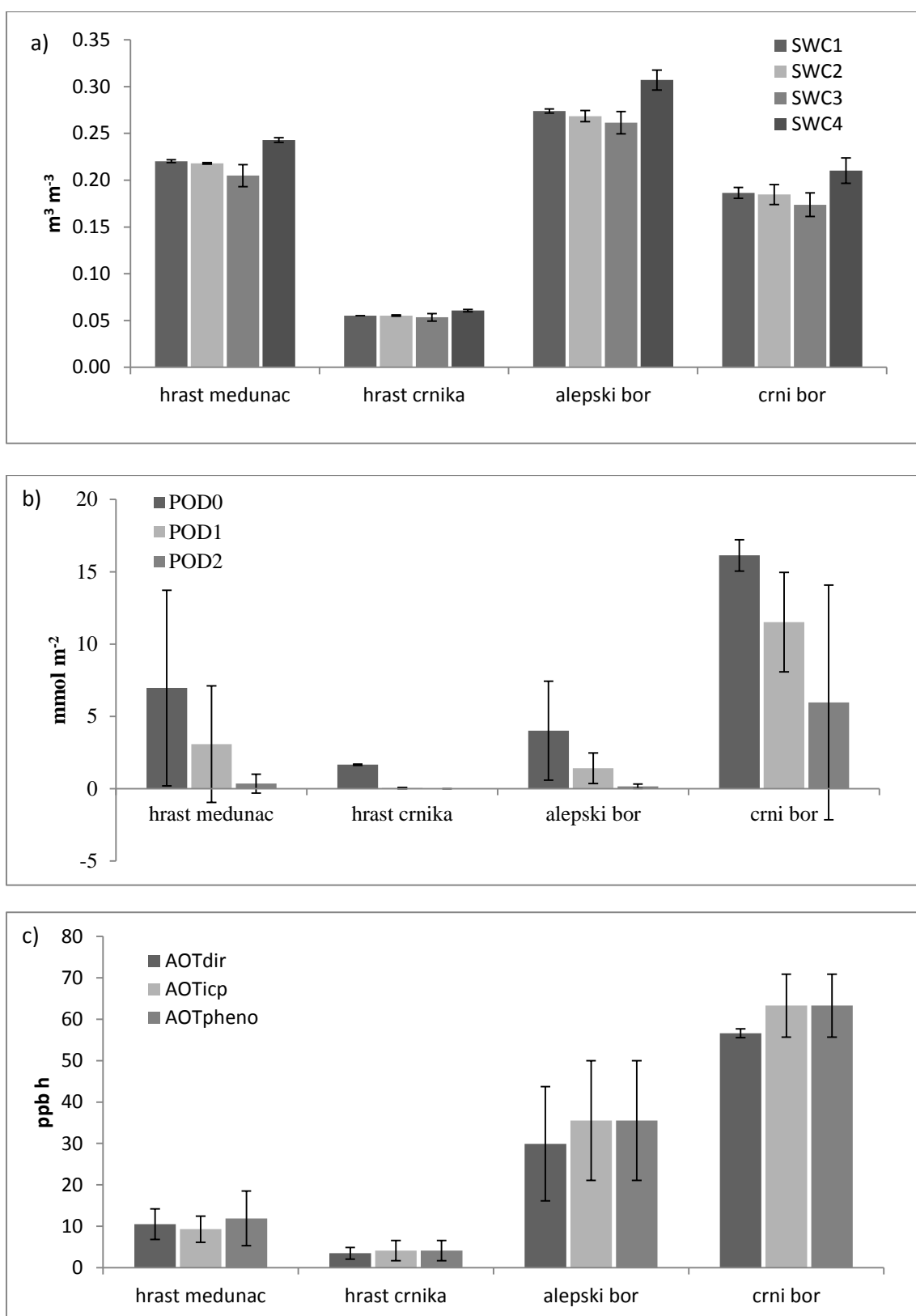
Utvrđena je statistički značajna razlika primjenom analize varijance ANOVA-e za prirast (Slike 15a) između pojedinih vrsta, a najveća razlika je utvrđena za crni bor. Osutost (Slika 15b) je bila najniža u šumi hrasta crnike dok preostale vrste nisu pokazivale statistički značajnu razliku.

Sadržaj vode u tlu (eng. *soil water content*, *SWC*), preuzet iz baze Copernicus, na različitim dubinama SWC1-4 , značajno se razlikovao na svim ispitivanim plohama (Slika 16a). Nadalje, vrijednosti fitotoksičnog ozona (POD0 , POD1 i POD2) značajno su se razlikovale između ploha (Slika 16b, Slika 18). Vrijednosti akumuliranog ozona ($\text{AOT40}_{\text{dir}}$, $\text{AOT40}_{\text{ICP}}$, $\text{AOT40}_{\text{pheno}}$) na plohi crnog bora pokazale su statistički različite vrijednosti od ostale tri plohe (Slika 16c, Slika 18).

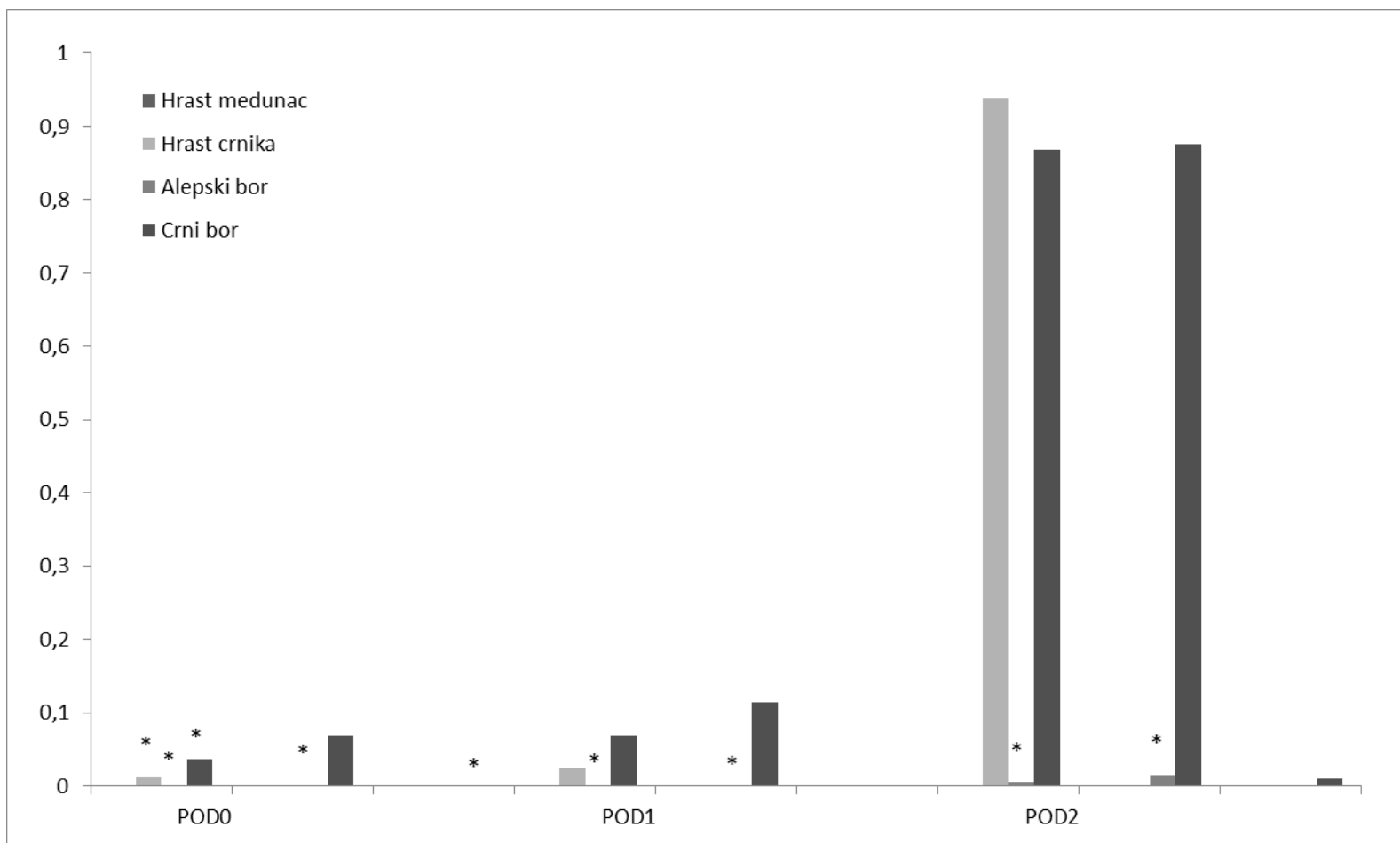


Slika 15. Prikaz rezultata analize varijance za a) prirast i b) osutost za hrast medunac, hrast crniku, alepski bora i crnog bora za 2017. i 2018. godinu

Rezultati

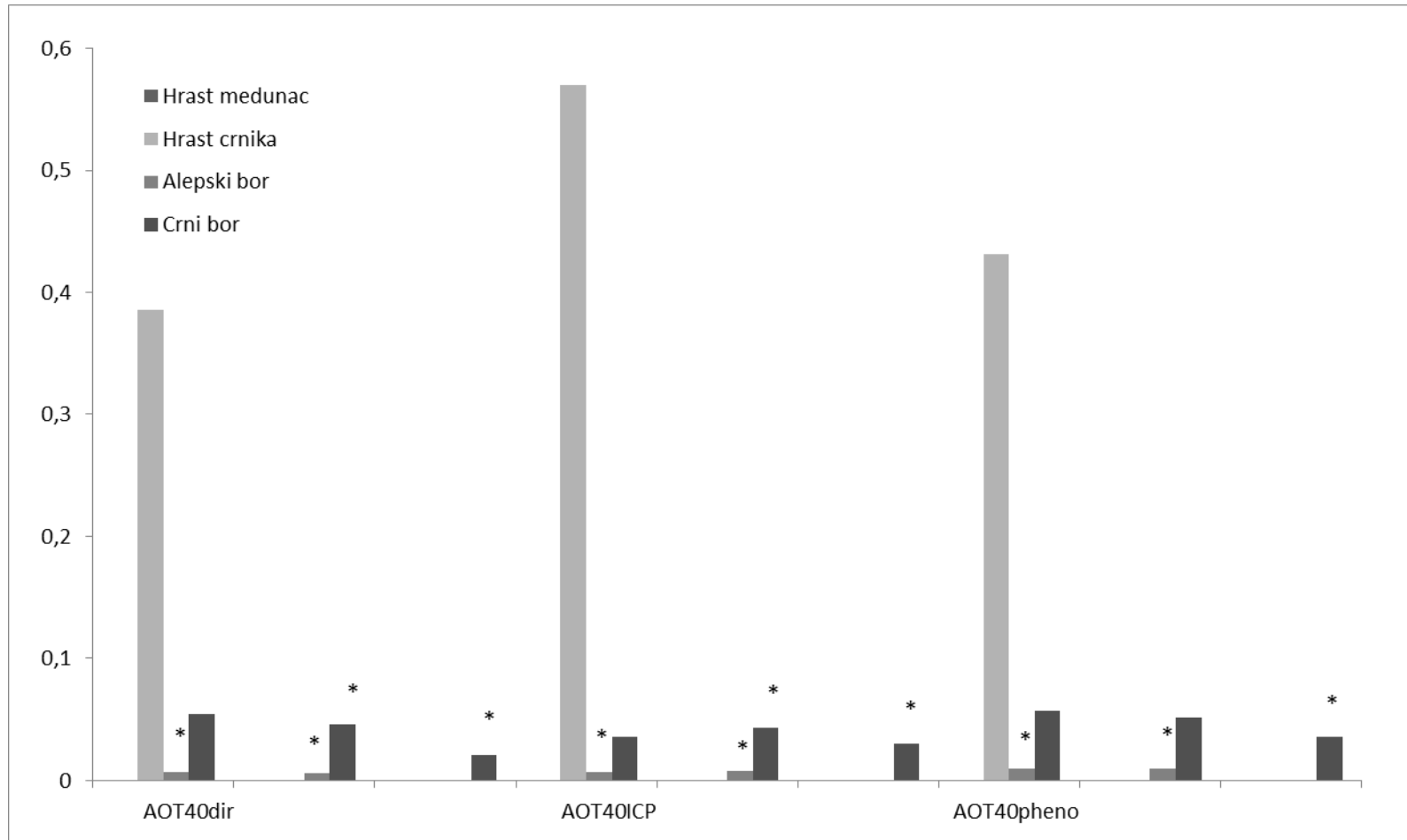


Slika 16. Prikaz analize varijance za a) sadržaj vode na četiri različite dubine tla (SWC1, SWC2, SWC3, SWC4), b) vrijednosti fitotoksičnog ozona (POD0, POD1 i POD2) i c) akumuliranog ozona (AOT40dir, AOT40ICP, AOT40pheno) za plohe hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora



Slika 17. Rezultati Newman-Keulsovog testa za različite vrijednosti fitotoksičnog ozona, POD0, POD1, POD2 za plohe hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora. Značajni rezultati za $p < 0,05$ označeni su zvjezdicom.

Rezultati



Slika 18. Rezultati Newman-Keulsovog testa za različito izračunate parametre akumularnog ozona ($AOT40_{dir}$, $AOT40_{ICP}$, $AOT40_{pheno}$) za plohe hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora. Značajni rezultati za $p < 0,05$ označeni su zvjezdicom

Nakon što su se utvrdile značajne okolišne varijable (temperatura, sunčevo zračenje, relativna vlažnost, kiša, sadržaj vode u tlu) te parametri ozona (POD0, POD1, POD2 i AOT40_{dir}, AOT40_{ICP}, AOT40_{pheno}), provedene su korelacija i parcijalna korelacija primjenom Newman-Keuls post-hoc test. Korelacijom ispitane varijable pokazale su povezanost godišnjeg prirasta i osutosti krošnje. Osutost je bila značajno povezana sa sadržajem vode u tlu na različitim dubinama (r između 0,847 i 0,877) (Tablica 10). Prirast je pokazao značajnu povezanost za različite vrijednosti fitotoksičnog ozona POD0, POD1, POD2 (r između 0,890 i 0,942), kao i s različito izračunatim vrijednostima parametra AOT40, ali nešto manje povezanosti (r između 0,886 i 0,903) (Tablica 10).

Parcijalna korelacija provedena uz temperaturu kao fiksnu varijablu, potvrdila je do sad utvrđene korelacije, ali je istaknula negativan utjecaj sunčevog zračenja i značajan utjecaj vlage na prirast (Tablica 10).

Sljedeća parcijalna korelacija provedena je uz sadržaj vode u tlu (SWC1) u gornjem sloju (0-7 cm) kao fiksnom varijablom. Utvrdilo se da je rast bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji s temperaturom i parametrima za određivanje ozona, AOT40 i PODY. Postotak osutosti bio je značajno povezan s temperaturom zraka (Tablica 10).

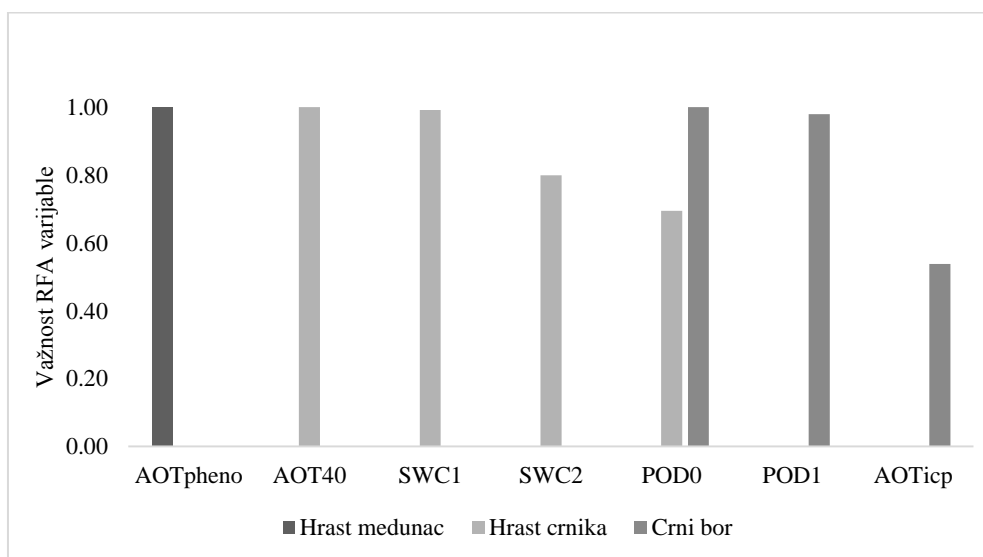
Kad je parcijalna korelacija provedena uz dvije istovremeno fiksne varijable, (temperatura i SWC1), dobivene korelacije ponovno su se promijenile. Rast je bio značajno pozitivno povezan sa sunčevim zračenjem, i značajno negativno povezan s relativnom vlagom, te je bio pozitivno povezan s parametrima ozona (POD1, POD2 i AOT40). Nadalje, osutost je bila negativno povezana samo s AOT40 parametrima (Tablica 10).

Rezultati

Tablica 10. Odnosi između godišnjeg prirasta i osutosti krošnje u odnosu na parametre ozona (POD0, POD1, POD2 i AOT40_{dir}, AOT40_{ICP}, AOT40_{pheno}) i okoliša (temperatura (T), sunčevo zračenje (Rad), relativna vlažnost (RH), kiša (Rain), sadržaj vode u tlu (SWC)). Značajni rezultati (p<0,05) su podebljani.

	T	Rad	RH%	Rain	SWC1	SWC2	SWC3	SWC4	POD0	POD1	POD2	AOT _{dir}	AOT _{ICP}	AOT _{pheno}
prirast (cm)	0,555	0,475	-0,641	-0,036	0,061	0,064	0,0507	0,078	0,890	0,931	0,942	0,903	0,893	0,886
osutost (%)	-0,232	-0,141	-0,497	-0,021	0,871	0,877	0,8472	0,869	0,529	0,4382	0,227	0,472	0,469	0,507
konstantna T (°K)														
prirast (cm)	--	0,699	-0,897	0,055	0,628	0,632	0,664	0,633	0,844	0,899	0,916	0,934	0,927	0,915
osutost (%)	--	-0,190	-0,478	-0,057	0,956	0,963	0,948	0,944	0,794	0,704	0,439	0,577	0,568	0,613
konstantan SWC1														
prirast (cm)	0,761	0,473	-0,739	-0,043	--	0,071	-0,099	0,350	0,905	0,937	0,942	0,962	0,952	0,953
osutost (%)	0,814	-0,415	-0,005	-0,247	--	0,283	-0,392	-0,041	0,659	0,585	0,386	0,264	0,252	0,304
konstantna T (°K) i SWC1														
prirast (cm)	--	0,939	-0,835	0,047	--	0,105	0,443	0,144	0,788	0,859	0,866	0,912	0,892	0,886
osutost (%)	--	-0,486	0,414	-0,292	--	0,481	-0,027	-0,590	-0,337	-0,437	-0,568	-0,915	-0,894	-0,880

Statistički alat RFA, analiza slučajne šume, (eng. *Random Forest Analysis*) koristio se za utvrđivanje učinka okolišnih varijabli na prirast stabala ispitivanih vrsta. RFA analiza naglasila je najvažnije ekološke prediktore koji utječu na rast. Ova analiza istaknula je da su AOT40_{pheno} i AOT40_{dir} najvažniji prediktori rasta hrasta medunca i crnike. Na plohi crnog bora najvažniji prediktor bio je POD0 (Slika 19). Međutim, važno je istaknuti da su varijable sadržaja vode u tlu (SWC1-4) također pokazale visoke vrijednosti važnosti kao prediktori za rast ispitivanih vrsta (Slika 19).

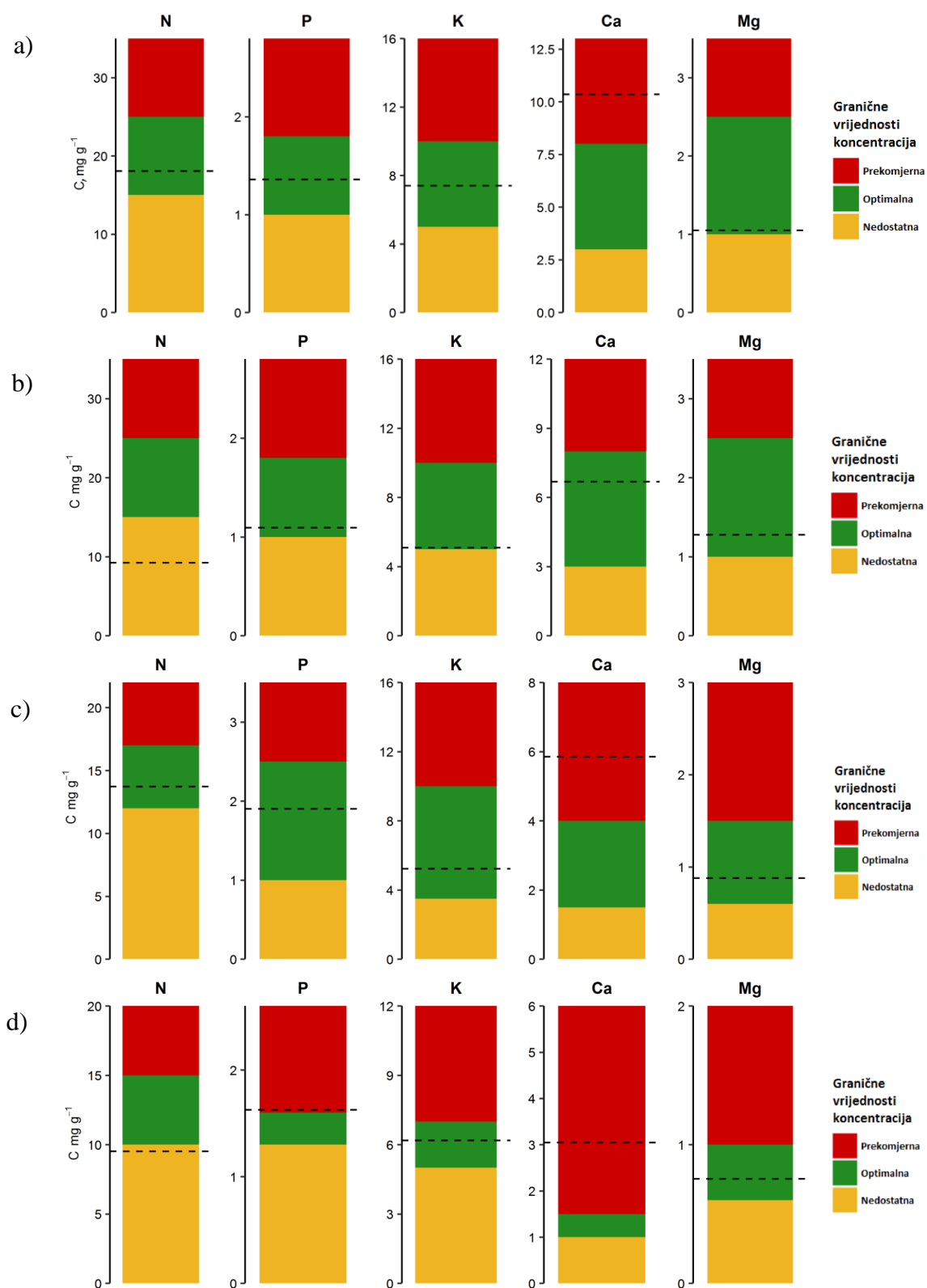


Slika 19. Varijable najveće važnosti za rast prema RFA analizi za plohe hrasta medunca (Poreč), hrasta crnike (Šišan) i crnog bora (Split)

4.4. Hranjive tvari u lišću i iglicama

Kako bi se procijenila opskrbljenost hranjivim tvarima u lišća/iglica, provedena je usporedba dobivenih rezultata istraživanja s literaturnim podacima. Shodno tome, dobiveni rezultati masenih udjela pojedinih elemenata uspoređeni su se s literaturnim vrijednostima danim u rasponima odnosno klasama (Mellert i Göttlein, 2012). Prema rezultatima prikazanim na Slici 20a-d vidljivo je da se kod većine ispitivanih vrsta maseni udjeli elemenata nalaze u optimalnom rasponu. Iznimno, maseni udio dušika bio je u ispod granice optimalne koncentracije, to jest u nedostatnom rasponu za vrste hrasta crnike i crnog bora (Slika 20b i d). Visoke vrijednosti kalcija utvrđene su u hrastu meduncu, crnom boru i alepskom boru (Slika 20a, c i d).

Rezultati



Slika 20. Koncentracije elemenata u lišću i iglicama za tri ispitivane godine (2017.-2019., isprekidane linije) a) listovi hrasta medunca; b) listovi hrasta crnike; c) iglice alepskog bora; i d) iglice crnog bora

4.5. Hranjive tvari u tlu

Uzorci tla prikupljeni su i analizirani tri uzastopne godine na svim ispitivanim plohama. Uzet je gornji mineralni sloj (0-10 cm). Na području Istre, analize uzoraka tla na plohama hrasta medunca i crnike pokazuju slabo kiselu reakciju (5,5-6,5) dok ostali uzorci pokazuju neutralnu reakciju (6,5-7,2) (Tablica 11). Analize uzoraka tla na plohama alepskog i crnog bora pokazuju neutralnu (6,5-7,2) do alkalnu reakciju ($>7,2$) (Tablica 11).

Tlo na svim ispitivanim plohama bilo je jako humozno (5-10 %), izuzev na plohi hrasta crnike gdje je bilo u kategoriji humoznog tla (3,18 %) (Tablica 11).

Na svim ispitivanim plohama tlo je bilo bogato (0,21-0,30 %) do vrlo bogato dušikom ($>0,30$ %) izuzev plohe crnog bora u 2019. (Tablica 11).

Sadržaj fiziološki aktivnog fosfora pokazuje da je tlo vrlo slabo (<10 mg/100 g) opskrbljeno fosforom na svim plohama izuzev plohe alepskog bora u 2019. kada je utvrđena osrednja opskrbljenost (Tablica 11). Kalija je bilo u dovoljnim količinama na svim istraživanim plohama.

Po teksturi tlo na navedenim plohama (Tablica 11) pripada većinom praškastoj glini i praškasto glinastoj ilovači (FAO, 2015).

Rezultati

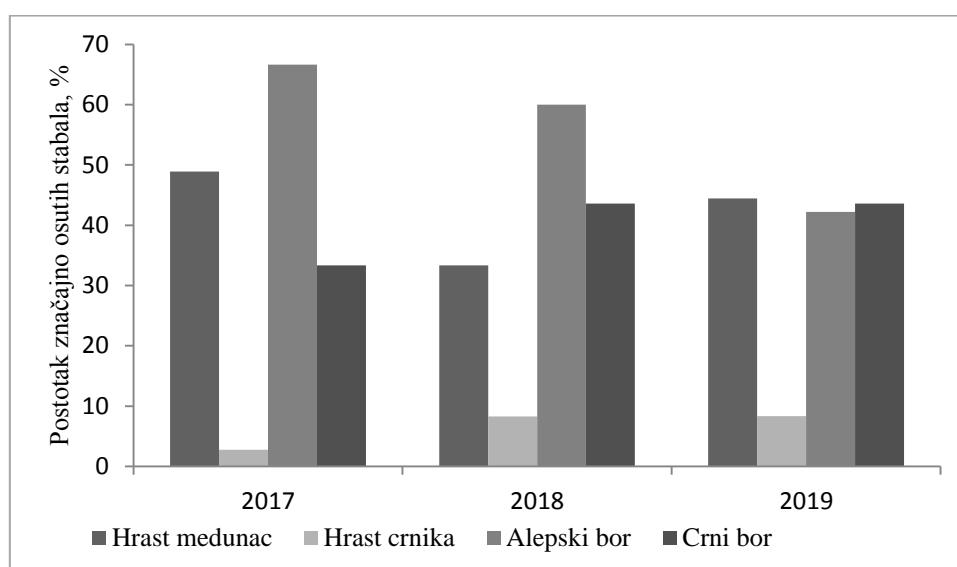
Tablica 11. Srednje vrijednosti koncentracija elemenata u tlu (P, K₂O, N, C, CaCO₃), humus, pH i tekstura tla na plohama hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora za tri ispitivane godine (2017. - 2019.)

Vrsta	God.	pH		P	K ₂ O	N	Humus	C	C/N	CaCO ₃	Pijesak	Prah	Glina
		H ₂ O	0.01M CaCl ₂	mg/ 100g tla	mg/ 100g tla	%	%	%	%	%	0,063-2 mm	0,002-0,063 mm	<0,002 mm
hrast medunac	2017	6,95±0,29	5,54±0,49	0,45±0,21	18,69±3,27	0,34±0,19	5,11±2,23	2,97±1,29	9,26±1,41	0,53±0,00	3,88±0,91	45,85±10,09	50,29±11,82
	2018	7,13±0,81	6,37±0,46	0,88±0,30	25,15±0,60	0,50±0,43	6,54±5,08	3,80±2,96	8,18±1,16	0,42±0,00	3,33±1,03	41,75±10,96	54,92±9,93
	2019	6,72±0,07	6,23±0,19	0,56±0,48	28,38±5,69	0,46±0,28	7,66±3,44	4,46±2,00	10,36±1,88	0,64±0,10	3,69±1,28	48,32±9,09	48,00±7,81
hrast crnika	2017	5,45±0,15	3,91±0,13	0,19±0,07	13,09±4,53	0,20±0,08	3,18±1,13	1,85±0,66	9,55±0,44	0,00	12,06±6,00	54,53±0,83	33,42±5,15
	2018	5,96±0,16	5,31±0,23	0,75±0,30	21,62±9,31	0,34±0,14	6,80±2,52	3,96±1,46	11,76±0,59	0,00	5,42±0,81	56,92±4,28	37,68±3,47
	2019	6,36±0,45	5,67±0,72	0,45±0,47	15,63±2,04	0,33±0,10	5,84±1,52	3,40±0,88	10,35±0,42	0,42±0,00	5,50±0,42	60,94±2,92	33,57±3,40
alepski bor	2017	7,57±0,10	6,87±0,23	2,91±3,90	43,56±9,33	0,38±0,23	6,37±4,39	3,71±2,55	9,63±0,81	23,10±30,29	11,13±3,25	43,93±4,40	44,94±7,67
	2018	8,04±0,11	7,42±0,19	3,55±8,93	46,08±10,03	0,51±0,26	8,40±4,36	4,89±2,54	9,69±1,56	24,55±24,07	12,10±6,63	43,41±2,42	44,49±6,36
	2019	7,99±0,19	7,45±0,20	12,37±8,03	57,79±17,31	0,46±0,18	6,53±3,22	3,79±1,87	7,98±0,97	22,49±19,58	10,29±1,91	41,21±3,03	48,50±4,72
crni bor	2017	7,51±0,18	7,11±0,08	0,83±0,39	23,19±5,72	0,27±0,17	6,85±5,28	3,98±3,07	13,92±2,62	15,92±13,03	16,66±3,87	50,08±11,28	33,27±15,15
	2018	8,07±0,19	7,49±0,16	0,95±1,91	18,75±7,76	0,22±0,14	5,10±5,91	3,94±3,62	9,41±6,59	10,79±0,81	19,16±14,2 2	46,00±7,11	34,85±20,14
	2019	8,14±0,07	7,44±0,07	3,21±1,49	26,03±10,13	0,19±0,07	5,10±1,93	2,97±1,12	15,83±4,30	6,84±1,71	13,78±9,04	48,37±12,56	37,86±20,78

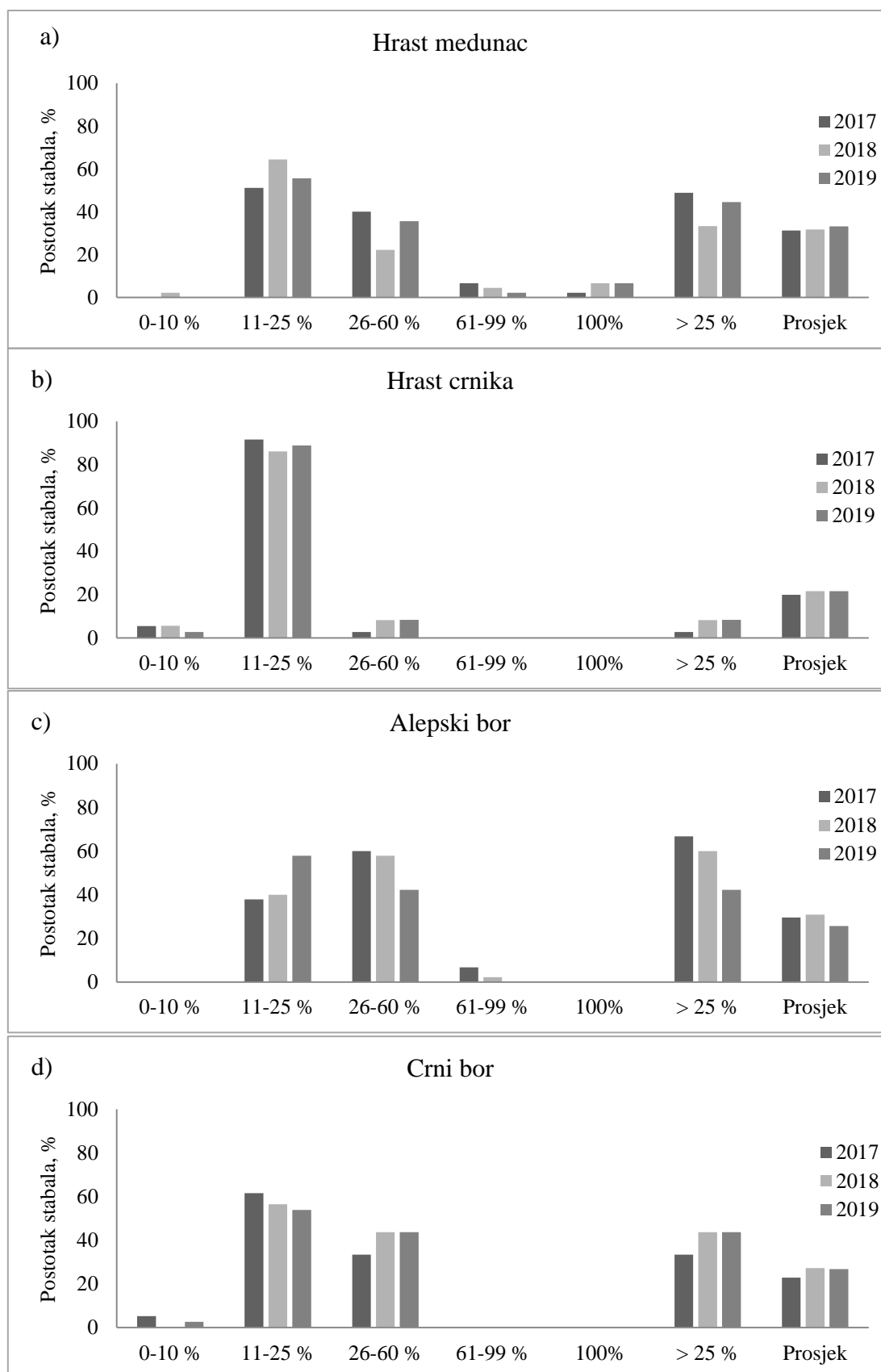
4.6. Osutost

Rezultati praćenja osutosti ispitivanih vrsta kroz tri godine prikazani su po kategorijama osutosti na Slikama 21 i 22. Razlike u osutosti između pojedinih ploha i godina ne razlikuju se (Slika 21). Postotak značajno osutih stabala (> 25 %) ukazuje da značajne razlike u osutosti između ispitivanih ploha i unutar istraživanih godina (2017.-2019.) ipak postoje (Slika 21). Najveći postotak značajno osutih stabala (> 25 %) utvrđen je na plohi alepskog bora za sve tri istraživane godine. Visok postotak značajno osutih stabala utvrđen je za sve tri godine i na plohama hrasta medunca i crnog bora. Ploha hrasta crnike bila je najvitalnija ploha s malim postotkom značajno osutih stabala.

Rezultati praćenja osutosti prikazani su na Slici 22a-d za sve tri godine, prema klasi osutosti i lokaciji plohe. Uočene su razlike među plohama u postotku stabala osutosti većom od 25 % (Tablica 3). Najveći postotak značajno osutih stabala (udio stabala s osutosti > 25 %) utvrđen je na plohi alepskog bora i prema Slici 22c smanjuje se s godinama (67 % u 2017., 60 % u 2018., 42 % u 2019.). Visoka osutost zabilježena je i na plohi hrasta medunca (49 % u 2017., 33 % u 2018., 44 % u 2019.) i plohi crnog bora (33 % u 2017., 44 % u 2018., 44 % u 2019.). Šuma hrasta crnike bila je najvitalnija ploha tijekom istraživanja s najmanjim postotkom značajno osutih stabala (>25 %) 3 % u 2017., i 8 % u 2018. i 2019. godini (Slika 22b).



Slika 21. Kretanje značajno osutih stabala u razdoblju 2017.-2019. godine, na plohama hrasta medunca (svjetla linija), hrasta crnike (tamna linija), alepskog bora (svjetla isprekidana linija), crnog bora (tamna isprekidana linija)



Slika 22. Osutost stabala za godine 2017., 2018. i 2019. na plohama a) hrasta medunca, b) hrasta crnike, c) alepskog bora i d) crnog bora

4.7. Prirast

Rezultat mjerenja prirasta pomoću dendrometerskih prikazano je na slikama u Prilogu 2. Prosječan godišnji debljinski prirast svih praćenih stabala hrasta medunca iznosio je u 2019. godini 0,19 cm, a prosječni godišnji postotak prirasta temeljnice iznosio je 1,08 %. Najveći prirasta u ispitivanom razdoblju bio je u 2018. (1,18 %) (Tablica 12). U 2017. bio je najmanji postotak prirasta.

Na plohi hrasta crnike prosječan godišnji debljinski prirast svih praćenih stabala iznosio je u 2019. godini 0,22 cm, a prosječan godišnji postotak prirasta temeljnice iznosio je 1,05 % što je najveći prirast u ispitivanom razdoblju (Tablica 12). U 2017. i 2018. (0,31 % i 0,67 %) postotak prirasta bio je manji u usporedbi s prirastom u 2019.

Tablica 12. Prosječan godišnji debljinski prirast i prosječni godišnji postotak prirasta temeljnice svih praćenih stabala na plohama hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora u periodu od 2017. do 2019.

Vrsta	Godina	Prirast cm	Prirast %
hrast medunac	2017	0,18±0,08	1,05±0,44
	2018	0,2±0,11	1,18±0,53
	2019	0,19±0,08	1,08±0,45
hrast crnika	2017	0,07±0,07	0,31±0,27
	2018	0,14±0,11	0,67±0,48
	2019	0,22±0,15	1,05±0,62
alepski bor	2017	0,26±0,11	1,28±0,53
	2018	0,27±0,14	1,26±0,63
	2019	0,38±0,15	1,77±0,64
crni bor	2017	0,13±0,09	0,33±0,2
	2018	0,13±0,72	0,33±0,17
	2019	0,16±0,1	0,42±0,22

Na plohi alepskog bora prosječan godišnji debljinski prirast svih praćenih stabala iznosio je u 2019. godini 0,38 cm. Prosječni godišnji postotak prirasta temeljnice iznosio je 1,77 % što je ujedno i najveći prirast u ispitivanom razdoblju (Tablica 12). U ostale dvije godine, 2017. i 2018. (1,28 % i 1,26 %), postotak prirasta bio je manji u usporedbi s prirastom u 2019.

Na plohi crnog bora prosječan godišnji debljinski prirast svih praćenih stabala iznosio je u 2019. godini 0,16 cm, a prosječan godišnji postotak prirasta temeljnice iznosio je 0,42 % što je najveći postotak prirasta u mjerenom razdoblju (Tablica 12). U 2017. i 2018. (0,33 % i 0,33 %) postotak prirasta bio je manji u usporedbi s prirastom u 2019.

4.8. Određivanje indikatora oksidativnog stresa i antioksidativnih enzima

U svrhu utvrđivanja oksidativnog stresa u četiri ispitivane vrste (hrast medunac, hrast crnika, alepski bor i crni bor) određene su količine fotosintetskih pigmenata (Chl-a, Chl-b, Chl-tot) (Tablica 13), količine H₂O₂ (Tablica 14) i količine malondialdehida (MDA) (Slika 21) kao pokazatelja lipidne peroksidacije (LPO). Također, određena je i aktivnost antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) (Slika 24), katalaze (CAT) (Slika 25), nespecifičnih peroksidaza (POD) (Slika 26), i askorbat-peroksidaze (APX) (Slika 27) kao pokazatelja potencijalne zaštite od oksidativnog stresa. Biljni materijal prikupljen je sa stabala koji su bili podijeljeni u 2 kategorije: kategorija stabala male osutosti (osutost <25 %) i kategorija stabala značajne osutosti (osutost >25 %) (Eichhorn i sur., 2016; Gottardini i sur., 2020).

U četiri ispitivane vrste određen je maseni udio fotosintetskih pigmenata: klorofila a (Chl-a), klorofila b (Chl-b) i ukupnog klorofila (Chl-tot). Rezultati su prikazani u Tablici 13.

Tablica 13. Količina fotosintetskih pigmenata u lišću/iglicama (Chl-a, Chl-b, Chl-tot) hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora za stabla male osutosti (osutost <25 %) i stabla značajne osutosti (osutost >25 %). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti unutra biljne vrste određenom studentovom t-testu (p < 0,05).

Vrsta	Kategorija	Chl-a	Chl-b	Chl-tot
		µg g ⁻¹ svj.tv.	µg g ⁻¹ svj.tv.	µg g ⁻¹ svj.tv.
Hrast medunac	Stabla male osutosti (< 25 %)	1503,93±53,84*	366,39±36,32	1891,62±53,13*
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	1302,68±57,91	347,22±35,22	1649,89±23,80
Hrast crnika	Stabla male osutosti (< 25 %)	1673,62±69,47*	466,84±42,40*	2290,94±271,10*
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	1387,09±55,64	357,96±24,75	1800,22±17,20
Alepski bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	406,74±119,81	123,81±25,77	422,59±95
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	562,72±104,72	250,47±34,61*	448,87±110,32
Crni bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	666,3±23,50	221,35±13,81	882,79±24,01
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	795,59±8,42*	241,2±26,52	990,4±92,92*

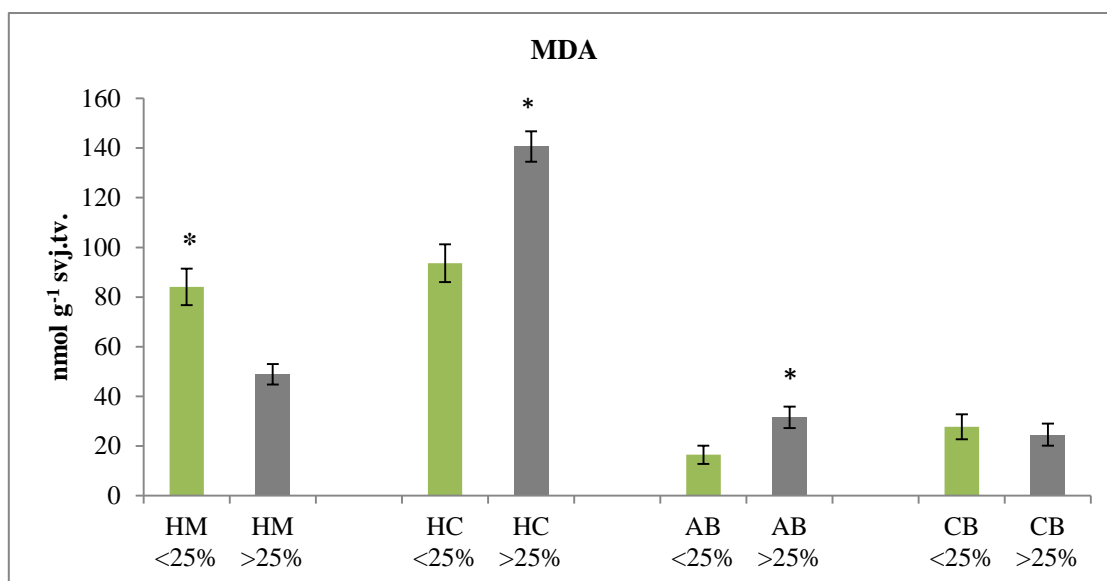
U hrastovim vrstama značajno više je Chl-tot utvrđeno u stablima male osutosti. U crnom boru je značajno više Chl-tot utvrđeno u stablima značajne osutosti. Za Chl-a utvrdile su se značajne razlike između stabala male i značajne osutosti za hrast medunac, hrast crniku i crni bor. Za Chl-b značajne razlike utvrdile su se za hrast crniku i alepski bor.

Količina H_2O_2 određivala se u lišću/iglicama hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora za stabla male i značajne osutosti, a rezultati su prikazani u Tablici 14. Značajne razlike za H_2O_2 utvrđene su za crni bor između stabala male i značajne osutosti.

Tablica 14. Količina vodikovog peroksida (H_2O_2) u lišću/iglicama hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora za stabla male osutosti (osutost <25 %) i stabla značajne osutosti (osutost >25 %). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti unutra biljne vrste u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).

Vrsta	Kategorija	H_2O_2
		nmol g ⁻¹ svj. tv.
Hrast medunac	Stabla male osutosti (< 25 %)	44,04 \pm 12,88
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	39,4 \pm 5,67
Hrast crnika	Stabla male osutosti (< 25 %)	0,03 \pm 0,01
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	0,02 \pm 0,00
Alepski bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	0,58 \pm 0,09
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	0,61 \pm 0,2
Crni bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	0,89\pm0,21*
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	0,32 \pm 0,06

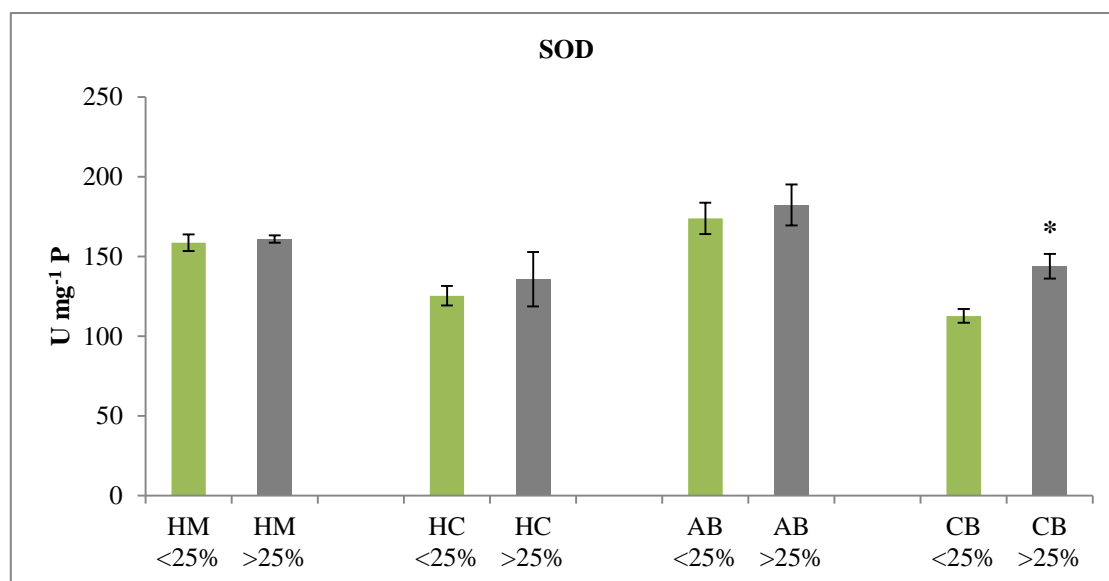
Određivanje lipidne peroksidacije vršilo se mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA). Rezultati su prikazani na Slici 23. Za hrast crniku i alepski bor, određene su veće količine MDA u stablima značajne osutosti nego u stablima male osutosti. Za hrast medunac određene su manje količine MDA u stablima značajne osutosti nego u stablima male osutosti. Za hrast crniku i alepski bor utvrđene su značajno veće razlike MDA u značajno osutim stablima u odnosu na stabla male osutosti.



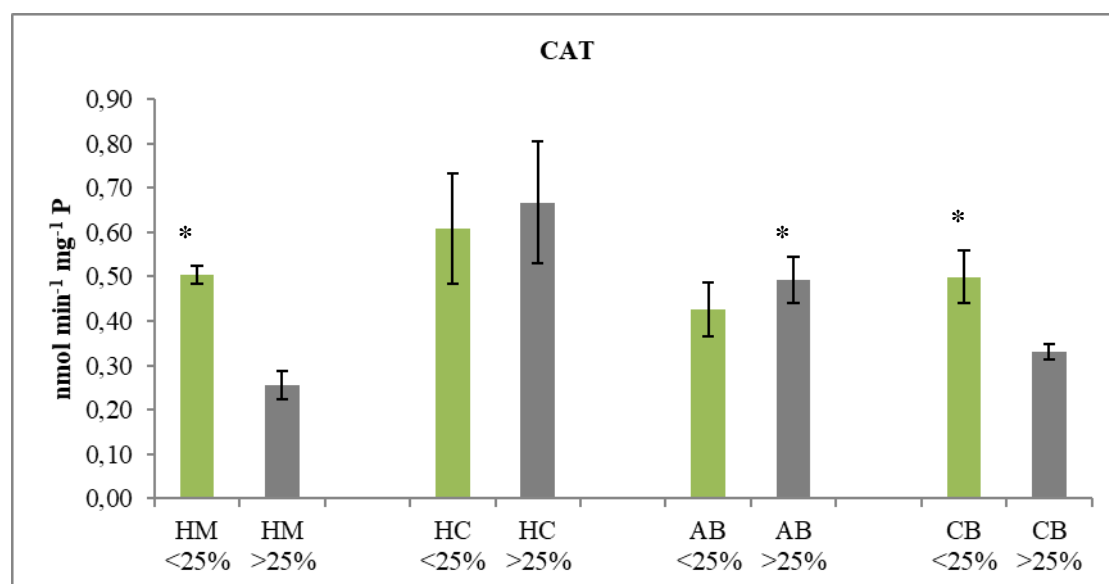
Slika 23. Količina malondialdehida (MDA) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB). za stabla male osutosti (osutost <25%) i stabla značajne osutosti (osutost >25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± S. D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu ($p < 0,05$)

Antioksidativni enzimi (poput SOD, CAT, POD, APX) sudjeluju u obrani neutralizirajući ROS-ove. Rezultati aktivnosti enzima u lišću/iglicama hrasta medunca, hrasta crnike, alepskog bora i crnog bora za stabla male i značajne osutosti prikazani su na Slikama 24 – 27.

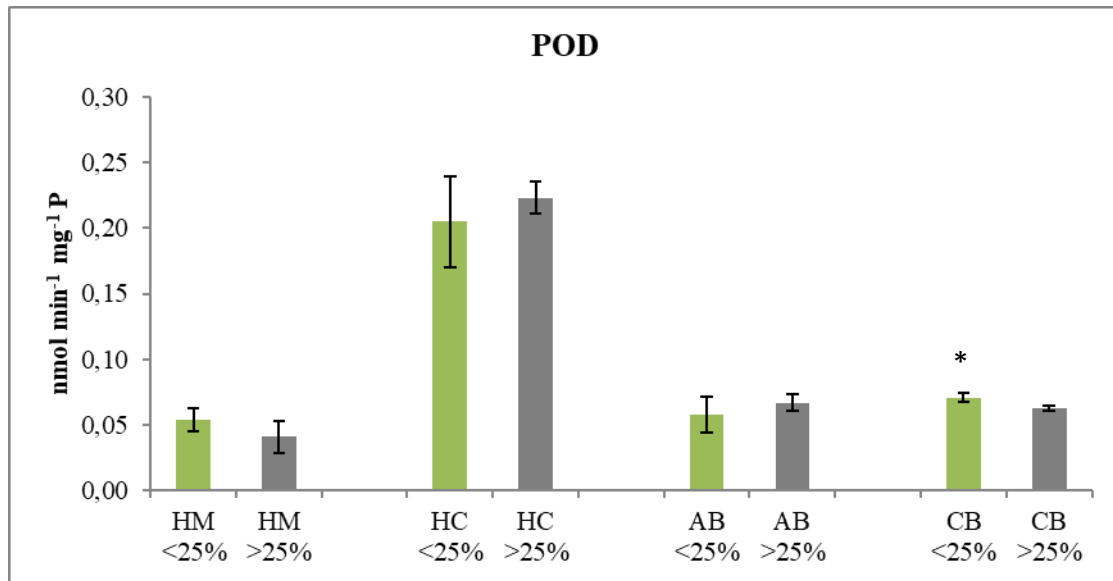
Značajna razlika SOD-a utvrđena je između stabala male i značajne osutosti samo za crni bor (Slika 24). Rezultati aktivnosti CAT-a prikazani su na Slici 25. Značajne razlike utvrđene su između stabala male i značajne osutosti za sve vrste osim za hrast crniku. Dobiveni rezultati aktivnosti POD-a prikazani su na Slici 26. Značajne razlike aktivnosti POD-a zabilježene su samo između stabala male i značajne osutosti crnog bora. Značajne razlike rezultata aktivnosti APX-a utvrđene su između stabala male i značajne osutosti za sve vrste osim za hrast crniku (Slika 27).



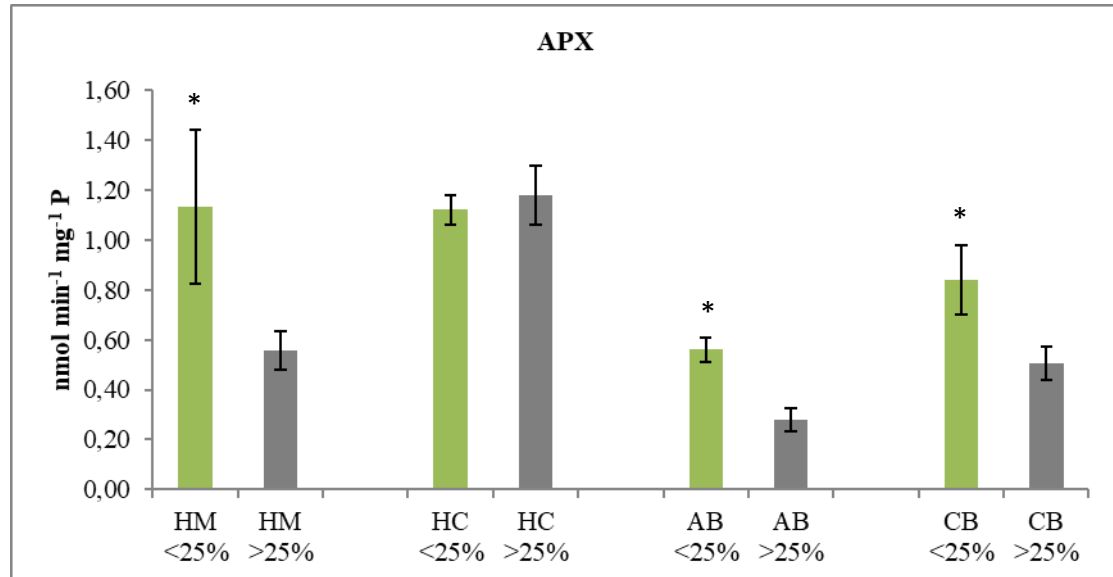
Slika 24. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB) za stabla male osutosti (osutost <25%) i stabla značajne osutosti (osutost >25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).



Slika 25. Aktivnost katalaze (CAT) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB) za stabla male osutosti (osutost <25%) i stabla značajne osutosti (osutost >25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).



Slika 26. Aktivnost nespecifičnih peroksidaza (POD) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB) za stabla male osutosti (osutost <25%) i stabla značajne osutosti (osutost >25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).



Slika 27. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB) za stabla male osutosti (osutost <25%) i stabla značajne osutosti (osutost >25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D. (n=3). Vrijednosti označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu ($p < 0,05$).

Rezultati masenih udjela hranjivih tvari u lišću/iglicama ispitivanih vrsta (hrast medunac, hrast crnika, alepski bor i crni bor) prikazani su u Tablici 15. Značajne razlike utvrđene su za hrast medunac između stabala male i značajne osutosti za P, K, S, Ca, Mg, Mn, Zn i Cu. Statistički značajne razlike za K, Fe i Mn utvrđene su za hrast crniku između stabala male i značajne osutosti. Značajne razlike utvrđene su za Ca, Zn i Cu između stabala male i značajne osutosti za alepski bor. Značajne razlike za crni bor utvrđene su za P, K i Ca između stabala male i značajne osutosti.

Rezultati

Tablica 15. Maseni udio hranjivih tvari (N, P, K, S, C, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) u lišću/iglicama hrasta medunca (HM), hrasta crnike (HC), alepskog bora (AB) i crnog bora (CB) za stabla male osutosti (osutost < 25%) i za stabla značajne osutosti (osutost > 25%). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost (n=3). Vrijednosti podebljane i označene sa zvjezdicom (*) prikazuju statistički značajnu razliku između stabala male i značajne osutosti za istu vrstu u Studentovom t-testu (p < 0,05). Bojama su označene koncentracije elemenata: crveno – prekomjerna količina; zeleno –optimalna količina; žuto – nedostatna količina (Fürst i sur., 2020).

Vrsta	Kategorija	N mg g ⁻¹	P mg g ⁻¹	K mg g ⁻¹	S mg g ⁻¹	C %	Ca mg g ⁻¹	Mg mg g ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹
Hrast medunac	Stabla male osutosti (< 25 %)	16,95	1,22	6,62	1,26*	49,25	10,72	1,23	103,05	618,78*	20,30	4,03
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	16,95	1,75*	7,50*	0,94	47,55	14,66*	1,97*	108,25	367,65	30,20*	5,71*
Hrast crnika	Stabla male osutosti (< 25 %)	13,30	0,99	6,26*	1,05	51,50	6,21	1,22	50,22	1002,38	16,30	3,83
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	12,15	0,99	3,17	0,89	51,20	6,72	1,42	65,18*	1192,50*	19,98	3,90
Alepski bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	11,14	1,34	3,99	1,01	52,53	8,41*	1,65	111,30	12,06	29,61*	2,49*
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	10,88	1,33	3,96	0,81	51,93	4,03	1,70	105,95	8,62	21,02	1,63
Crni bor	Stabla male osutosti (< 25 %)	10,11	1,20	4,98	0,81	52,88	5,24*	1,30	71,47	1,36	41,77	2,59
	Stabla značajne osutosti (> 25 %)	9,69	1,51*	6,36*	0,90	52,45	2,52	1,22	77,61	2,53	41,77	3,25

5. RASPRAVA

Mediterranski šumski ekosustavi vrlo su bogati raznolikim biljnim i životinjskim vrstama. Očuvanje ovih ekosustava od iznimne je važnosti jer su oni izvor bioraznolikosti kao i izvor hrane, sprječavaju eroziju zemljišta te pružaju mjesto su za rekreaciju i turizam (Prpić i sur., 2011a). U terenskim uvjetima postoji tek manji broj istraživanja te je većina istraživanja uglavnom rađena na mladim biljkama u kontroliranim uvjetima. Stoga su neophodna istraživanja u prirodnim uvjetima jer mogu pružiti korisne informacije i predstavljati stvarnu sliku mogućih negativnih utjecaja proizašlih ljudskim aktivnostima poput onečišćenja zraka (Matyssek i sur., 2010; Paoletti i sur., 2019). U ovom istraživanju izvršena je procjena utjecaja atmosferskoga taloženja u četiri mediteranska šumska ekosustava kako bi se utvrdilo taloženje bazičnih spojeva kao i utvrđivanje kritičnih opterećenja dušikovim i kiselim spojevima i njihov utjecaj na odabrane šumske ekosustave. Utvrđivanjem koncentracija i izračunom indeksa ozona utvrdio se utjecaj prizemnog ozona na ispitivanim šumskim vrstama kao i odnosi između varijabli okoliša i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma. Također, utvrđen je status hranjivih tvari u tlu te lišću i iglicama kako bi se utvrdilo zdravstveno stanje ispitivanih šumskih ekosustava. Određivanjem indikatora oksidativnog stresa ispitalo se jesu li istraživane vrste pod utjecajem abiotičkog stresa.

5.1. Procjena utjecaja atmosferskoga taloženja te utvrđivanje stvarnih i kritičnih opterećenja dušikovim i kiselim spojevima u mediteranskim šumskim ekosustavima

Atmosfersko taloženje smatra se jednim od bitnih čimbenika koji određuju kruženje tvari u šumskim ekosustavima (Kozłowski i sur., 2020). Prikupljanjem kiše u šumi prati se količina atmosferskoga taloženja koja se ispere s krošnje na šumsko tlo. Prikupljanje kiše izvan šume (BOF) služi kako bi se utvrdile razlike između iona prikupljenih u šumi (THR) i izvan šume (Balestrini i sur., 2007). Na prikupljenu količinu kiše u kišomjerima utječe nekoliko čimbenika kao što su isparavanje, brzina vjetrova, geometrija kišomjera te struktura krošnje (Balestrini i sur., 2007; Clarke i sur., 2020). Uzorci kiše prikupljaju se kako bi se pratilo atmosfersko taloženje (koncentracije, količine taloženja, tokovi) i opterećenja tla na odabranim plohama u svrhu razumijevanja i kvantificiranja procesa taloženja u šumskim ekosustavima (Clarke i sur., 2020). U cilju procjene atmosferskoga taloženja u ekosustavima odabranih dominantnih šumskih vrsta u dvije mediteranske regije (Istra i Dalmacija) prikupili

su se uzorci kiše i odredila su im se fizikalno-kemijska svojstva. Odredili su se parametri: pH i provodljivost, kemijski sastav kiše (odredile su se koncentracije iona K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) i alkalitet. Dobivene vrijednosti dušikovih i kiselih spojeva koristile su se za izračun opterećenja dušikovim i kiselim spojevima (Posch i sur., 2015).

Istraživanja su pokazala da je veća količina kiše prikupljena kišomjerima izvan šume (BOF) nego kišomjerima u šumi (THR) kako su utvrdili i drugi autori (Balestrini i sur., 2007; Aguilhaume, 2016; Jakovljević i sur., 2019). Ploha s najvećom količinom kiše bila je ploha crnog bora, a slijedile su je plohe hrasta medunca i crnike u Istri. Ploha s najmanjom količinom kiše bila ploha alepskog bora. Ovakav raspored oborina rezultat je orografije mediteranskog dijela Hrvatske (Denamiel i sur., 2021). Crni bor je vrsta koja se nalazi u području submediterana koji inače karakteriziraju veće količine oborina u odnosu na eumediteran. Također, veće količine oborina karakteristične su za Istru u odnosu na Dalmaciju (Denamiel i sur., 2021).

Na ispitivanim plohama (Tablica 4) manja količina kiše prikupljena je u uzorcima THR-a nego BOF-a zbog prokapljivanja kiše kroz krošnju i zadržavanja na krošnji. Razlika u količini kiše prikupljene u uzorcima THR-a nego BOF-a bila je <10 % na plohi hrasta medunca te manje od <20 % na plohama hrasta crnike, alepskog i crnog bora (Lovreškov i sur., 2021). Slične vrijednosti utvrđene su i na odabranim plohama u Italiji, gdje su se vrijednosti prokapljivanja kretale od 10 do 15 % (Balestrini i sur., 2007). Također, količina kiše prikupljena u šumi ovisi o glavnoj vrsti na plohi (Tablica 2) i te gustoći krošnje. Veća količina kiše prikupljena je u kišomjerima na plohama s većom zastupljenošću četinjača. Istraživanjem razlike u količini prikupljene kiše u THR uzorcima ispod crnog bora (*Pinus nigra* Arnold) i obične breze (*Betula pendula* Roth.), utvrdilo se da je veća količina kiše prikupljena ispod stabala bora u odnosu na količinu kiše prikupljenu ispod stabala breze (Zabret i sur., 2018; Zabret i Šraj, 2018). Usporedbom ploha u Istri zaključuje se da je do većeg rasipanja došlo u šumi hrasta crnike nego u šumi hrasta medunca. Rezultat toga bi bio gušći sklop krošnje hrasta crnike u odnosu na krošnju hrasta medunaca. Borove vrste imale su vrlo slično rasipanje kiše. U ovom istraživanju količine kiše prikupljene ispod krošanja ispitivanih vrsta više su rezultatu orografije kako je već spomenuto, a manji bi bio utjecaj samog tipa krošnje.

Kiša koja prisprije do šumske krošnje, ispire atmosfersko taloženje s krošnji te dovodi do većih promjena u fizikalno-kemijskim svojstvima prikupljene kiše, što se najbrže utvrdi

mjerenjem pH i provodljivosti. U ovom istraživanju vidljivo je da se na ispitivanim plohama prosječne godišnje vrijednosti pH između dvije različite vrste uzoraka (BOF i THR) ne razlikuju (Tablica 4). Na većini ploha prosječne godišnje vrijednosti pH bile su veće od 5,50 što ukazuje da kiša koja je prikupljena u kišomjeru nije bila kisela. pH kiše, koja prolazi kroz atmosferu (bez prisutnog onečišćenja), prirodno ima pH vrijednost od 5,50 uslijed otapanja plinovitog CO₂ u vodi, prisutnog u atmosferi, tvoreći karbonatnu kiselinu (Keresztesi i sur., 2019). Utvrdilo se na plohama alepskog i crnog bora (izuzev pH na plohi alepskog bora u 2017) da je pH bio niži unutar šume nego izvan šume za sve tri istraživane godine. Do sličnih zaključaka došli su i autori istraživanjem pH atmosferskoga taloženja u šumi četinjača u Poljskoj (Kowalska i sur., 2016; Kozłowski i sur., 2020). pH kiše ovisi o prisutnoj količini kiselih spojeva prispjelih u atmosferu zbog ljudskog utjecaja, ali ovisi i o količini bazičnih spojeva koji će neutralizirati kisele spojeve prisutne u prikupljenoj kiši (Keresztesi i sur., 2019; Kozłowski i sur., 2020). Na vrijednost pH utječu i bazični ioni. Bazični ioni (K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) imaju neutralizirajući učinak u slučaju pojave kiselih kiša, a uglavnom potječu s mora ili s površine tla što su potvrdili i drugi autori u istraživanjima provedenih u Italiji, Španjolskoj i Grčkoj (Mosello i sur., 2002; Araujo i sur., 2015; Karavoltos i sur., 2017). S obzirom da su u ovom istraživanju Ca²⁺, uz Na⁺ i Mg²⁺ bili najzastupljeniji ioni na ispitivanim plohama (Tablica 4), utvrđene prosječne godišnje vrijednosti pH na ispitivanim plohama bile su veće u usporedbi s vrijednostima utvrđenim u Europi. Istraživanje kemijskog sastava kiše provedenog u 27 europskih zemalja od 2000. do 2017. utvrdilo je prisutnost visokih koncentracija onečišćujućih tvari (NO_x i SO₂) u atmosferi iznad Europe. Prosjek utvrđenih pH vrijednosti kiše bio je 4,80 što ukazuje na prisutnost kiselih spojeva u zraku (Keresztesi i sur., 2019). Ti rezultati nude opće stanje o kemijskom sastavu kiše u Europi, pridonoseći boljem razumijevanju onečišćenja zraka u europskim državama. Budući da se onečišćujuće tvari mogu prenijeti na velike udaljenosti, moguće je da prekogranično onečišćenje utjecalo na kemijski sastav kiše i na ispitivanim plohama.

Provodljivost je sposobnost otopine da provodi struju, a ovisi o količini prisutnih iona, o njihovoj ukupnoj koncentraciji, o pokretljivosti i valenciji iona i o temperaturi mjerenja (Fürst i sur., 2020). Za provodljivost je utvrđeno da su veće vrijednosti bile u THR uzorcima u usporedbi s BOF uzorcima na svim plohama s najvišim vrijednostima utvrđenim na plohi hrasta crnike u sve tri godine. Prikupljeni uzorci atmosferskog taloženja u THR-u sadrže i ione suhog taloženja ispranog s krošnje za razliku od uzoraka prikupljenih u BOF-u što doprinosi višim vrijednostima provodljivosti (Jakovljević i sur., 2013; Ferretti i sur., 2014).

Kemijski sastav prikupljenih uzoraka kiše razlikovao se od plohe do plohe, ovisno o godini kao i o vrsti uzorka (THR ili BOF) (Tablica 4). Razlika u taloženju iona između uzoraka prikupljenih u THR-u i BOF-u uzrokovana je ispiranjem suhih, nataloženih čestica s lišća i iglica što rezultira većim taloženjem iona u THR uzorcima. Ispiranje čestica s krošnji drveća četinjača i zimzelenih vrsta očekivano je tijekom cijele godine zbog lišća i iglica koji su prisutni tijekom cijele godine.

Taloženja Ca^{2+} na svim plohama bila su vrlo visoka, uglavnom veća u odnosu na taloženja ostalih iona (Tablica 4, Slika 13). Najveće taloženje Ca^{2+} utvrđeno je u THR uzorcima na plohi crnog bora u 2018. i 2019. godini (Tablica 4). Velike utvrđene vrijednosti uzrokovane su geografskim položajem, vrstom tla i vrstom podloge na kojoj se ploha nalazi. Na području mediteranskog dijela Hrvatske prevladava crvenica i smeđe tlo na vapnenačkoj podlozi, a vapnenačka podloga glavni je izvor Ca^{2+} na ispitivanim plohama (Tablica 11) (Pernar i sur., 2011; Zebec i sur., 2012). Taloženje Ca^{2+} u THR uzorcima općenito je visokih vrijednosti i u cijeloj Južnoj Europi, što se povezuje s doprinosom saharske prašine, osobito u proljeće i ljeto (Michel i Seidling, 2016; Jakovljević i sur., 2019). Saharski pijesak, tijekom transporta zračnim strujama sa sjevera Afrike prema Europi djelomično se otapa, transformira i taloži uglavnom mokrim taloženjem (Díaz-Hernández i Párraga, 2008).

Uz Ca^{2+} , i Mg^{2+} također djeluje kao pufer u kiši, tj. i jedan i drugi ion smanjuju učinak kiselih spojeva (Michel i Seidling, 2016). Najveća taloženja Mg^{2+} utvrđena su na plohi hrasta crnike u 2017. i 2018. godini. Izvor Mg^{2+} uglavnom dolazi zračnim masama s mora, ali i ispiranjem s lišća (Mosello i sur., 2002; Araujo i sur., 2015; Jakovljević i sur., 2019). Manji doprinos taloženju Mg^{2+} pridonose emisije čestica topljivih u vodi koje nastaju prilikom izgaranja biomase (Araujo i sur., 2015).

Najveće količine taloženja K^{+} utvrđene su u THR uzorcima u 2019. godini na plohama hrasta medunca i crnike. Kalij se može naći u atmosferi, kao i Mg^{2+} , uslijed spaljivanja biomase npr. gorenje biomase tijekom požara koji su česta pojava u ovim područjima, ali i kao posljedica poljoprivrednih aktivnosti (Šiljković i Mamut, 2016; Keresztesi i sur., 2019). Tijekom poljoprivrednih radova odvija se ciljano paljenje biomase u obje regije. Na dalmatinskom području Hrvatske u prosjeku godišnje bukne preko 2500 požara, najviše tijekom ljeta, spaljujući stotine hektara šuma, makije kao i poljoprivrednih površina tako da doprinos iz gorenja biomase je vrlo izgledan na ispitivanim plohama (Šiljković i Mamut, 2016).

Najveće vrijednosti taloženja Na^+ i Cl^- (Tablica 4) utvrđena su na plohi hrasta crnike. Ovakvi rezultati posljedica su neposredne blizine mora, budući da se ova ploha nalazi neposredno uz more. Ovi ioni sastavni su dio morske soli i smatraju se prepoznatljivim ionima morske zračne struje (Araujo i sur., 2015; Jakovljević i sur., 2019; Keresztesi i sur., 2019). Omjer između ta dva iona u uzorcima atmosferskoga taloženja je sličan onom u morskoj soli (0,5-1,5) te ovaj omjer služi kao provjera valjanosti prikupljenih uzoraka (Clarke i sur., 2021).

Alkalitet je parametar koji se utvrđivao za sve uzorke čiji je pH bio veći od 5 (Clarke i sur., 2020). U THR uzorcima, alkalitet je bio veći od BOF uzoraka (Tablica 4). Zabilježene su veće vrijednosti alkaliteta na hrastovim plohamu u odnosu na borove plohe. Također, rezultati dobiveni Wilcoxonovim testom utvrdili su značajne razlike u taloženju između BOF i THR uzoraka na istim plohamu (Tablica 5). Ovi rezultati sugeriraju ispiranje nataložene vapnenačke prašine s krošnje. Slični rezultati pronađeni su i u literaturi (Aguillaume i sur., 2017; Jakovljević i sur., 2019).

Primjenom Wilcoxonovog testa (Tablica 5) utvrđena je značajna razlika taloženja Ca^{2+} između BOF i THR uzoraka na plohi hrasta crnike i alepskog bora. Razlike za Mg^{2+} , Na^+ i SO_4^{2-} utvrđene su na hrastovim plohamu, dok je za K^+ i Cl^- utvrđeno na hrastovim plohamu i na plohi crnog bora. Za NO_3^- , razlika je utvrđena samo na plohi hrasta medunca. Na svim plohamu, nije bilo utvrđene razlike za NH_4^+ . Primjenom Wilcoxonovog testa između BOF i THR uzoraka (Tablica 5) utvrđeno je da jedino na plohi crnog bora nije uočena značajna razlika. Utvrđene razlike iona između uzoraka THR-a i BOF-a rezultat su utjecaja krošnje. Na krošnji se talože suhe čestice koje se ispiru tijekom kiše. Te čestice dolaze u kontakt s listom te može doći do ispiranja i/ili do razmjene iona (apsorpcija iona) što u krajnjem slučaju može rezultirati manjom koncentracijom iona u THR uzorcima u odnosu na BOF uzorke (Ferretti i sur., 2014; Jakovljević i sur., 2019).

Na svim plohamu, utvrđene su značajne korelacije za većinu iona na sve četiri plohe, izuzev na plohi crnog bora za Ca^{2+} , za NH_4^+ na plohi alepskog bora, te za alkalitet na hrastovim plohamu. Ovi rezultati upućuju na isti izvor navedenih iona u prikupljenim uzorcima, a mogući izvori mogu biti spaljivanje biomase ili poljoprivredni radovi (Jakovljević i sur., 2019; Lovreškov i sur., 2021). Korelacije između Na^+ i Cl^- kao i SO_4^{2-} i NO_3^- upućuju na utjecaj zračnih masa s mora, što nije neobično budući da su plohe smještene nedaleko od obale gdje još uvijek postoji utjecaj mora (Jakovljević i sur., 2019). Obje ispitivane regije

poznate su po poljoprivrednim radovima što se vidi iz korelacije Mg^{2+} i K^+ između BOF i THR uzoraka. Ove korelacije su rezultat gorenja biomase te produkata nastalih gorenjem, a talože se podjednako u šumi i izvan šume (Jakovljević i sur., 2019). Budući da je na ispitivanim plohama vapnena podloga, bila je očekivana korelacija Ca^{2+} između BOF i THR uzoraka s obzirom da je glavni izvor Ca^{2+} prašina. Mogući značajan utjecaj tijekom proljeća i ljeta ima i saharski pijesak (Díaz-Hernández i Párraga, 2008; Michel i Seidling, 2016).

Primjenom analize varijance (Slika 13) utvrđene značajne razlike iona i alkaliteta na ispitivanim plohama koje ukazuju da je došlo do razlika u taloženju u 2019. godini u odnosu na 2017. i 2018. godinu. Mogući razlog je taj što je 2019. godina bila godina s najvećom količinom kiše u odnosu na druge dvije godine, što je rezultiralo učestalijim ispiranjima taloženja s krošnja (Jakovljević i sur., 2019; Lovreškov i sur., 2021). Na plohi hrasta medunca utvrđene su značajne razlike za K^+ te na plohi hrasta crnike u THR uzorcima u 2017. godini u odnosu na 2019. godinu. Rezultati upućuju na moguće intenzivnije poljoprivredne radove poput spaljivanja biomase i izgaranja goriva radnih strojeva u 2019. godini u odnosu na 2017. godinu. Poljoprivredni radovi u ovoj regiji su sezonski te se odvijaju u blizini ispitivane plohe. Slične zaključke su utvrdili i na plohama u Španjolskoj gdje su količine dušikovih spojeva bile pod utjecajem poljoprivrede, korištenjem gnojiva kao i onečišćenja iz urbanih sredina (Izquieta-Rojano i sur., 2016). U ovom istraživanju utvrđene su značajne razlike za Mg^{2+} između BOF na plohi alepskog bora uzoraka u 2018. i 2019. Jedan od najutjecajnijih faktora na količine Mg^{2+} su morske zračne mase te od čestih požara koji se odvijaju tijekom ljeta (Šiljković i Mamut, 2016; Jakovljević i sur., 2019).

Taloženje dušikovih i sumporovih spojeva zaslužno je za eutrofikaciju i zakiseljavanja tla u prošlom stoljeću (Keresztesi i sur., 2019). Iz tog razloga poduzete su mjere kako bi se spriječilo daljnje narušavanje ekosustava. Uvođenjem restriktivnijih ograničenja o sadržaju sumpora u tekućim gorivima te korištenjem prirodnog plina u zamjenu za kruta goriva, rezultiralo je trendom smanjenja onečišćenja (De Marco i sur., 2019). Glavni izvor SO_2 nastalog ljudskim utjecajem potječe još uvijek najvećim dijelom od izgaranja goriva u industrijskom sektoru (De Marco i sur., 2019).

Najveća utvrđena taloženja SO_4^{2-} bila su na plohi hrasta crnike za sve tri godine (Tablica 4). Na ispitivanim plohama jedan od izvora SO_4^{2-} je ljudski utjecaj (poput izgaranja fosilnih goriva, industrija i dr.) što se utvrdilo i u drugim mediteranskim zemljama (Anatolaki

i Tsitouridou, 2007; Aguilhaume i sur., 2017). Drugi izvor su morske zračne mase koje imaju utjecaj na sve ispitivane plohe (Jakovljević i sur., 2019).

Taloženja NO_3^- i NH_4^+ su bila su veća u THR-u na hrastovim plohama. Taloženja NO_3^- i NH_4^+ u THR uzorcima bila su manja u usporedbi s uzorcima BOF-a u 2017. godini na plohi crnog bora, a na plohama crnog i alepskog bora u 2018. godini (Tablica 4). Najveće taloženje NO_3^- utvrđeno je u uzorcima THR-a na plohi hrasta medunca u 2019. godini. Glavni izvor NO_3^- su vlažne zračne mase koje dolaze s Jadranskog mora (Jakovljević i sur., 2019). Manje taloženje u THR uzorcima ukazuju na moguće zadržavanje tih iona na krošnji (Jakovljević i sur., 2019). Također, koncentraciji NO_3^- i SO_4^{2-} u atmosferi pridonosi i sagorijevanje fosilnih goriva iz industrija dok NH_4^+ potječe uglavnom od poljoprivrednih radova (Skevin-Sovic i sur., 2012). Istraživanja su dokazala da su manje količine NH_4^+ u uzorcima THR-a u odnosu na BOF, rezultat apsorpcije NH_4^+ kroz krošnju pristiglih mokrim i suhim taloženjem. Naime, izmjena NH_3 na površini lista može se odvijati kroz puči, putem fizičke adsorpcije na list, ili otapanjem u tankim vodenim slojevima na lišću. Ioni NO_3^- , NH_4^+ i SO_4^{2-} mogu se taložiti iz aerosola amonijevog sulfata i nitrata nastalih reakcijom amonijaka u plinskoj fazi sa sumpornom i dušičnom kiselinom tijekom taloženja (Jakovljević i sur., 2013).

Na svim plohama, izuzev plohe hrasta medunca, nije utvrđena statistički značajna razlika za NO_3^- (Tablica 5) što upućuje na isti izvor ovog iona te na mogući utjecaj onečišćenja iz industrije, intenzivnijeg prometa te susjednih zemalja (Skevin-Sovic i sur., 2012). Uspoređujući rezultate dobivene Wilcoxonovim testom (Tablica 5), utvrdilo se da na plohama nema razlike za NH_4^+ u BOF i THR uzorcima s obzirom da atmosferski NH_3 uglavnom sudjeluje u neutralizaciji SO_2 u stvaranju aerosola amonijevog sulfata, smanjenje emisije SO_2 uspješnom provedbom politika smanjenja onečišćenja, rezultiralo je manjom formacijom amonijevih aerosola kao i olakšanom suhom taloženju NH_3 u blizini izvora (Aguillaume i sur., 2017).

Iako je ljudski utjecaj jedan od važnih izvora onečišćenja sumporovim spojevima, na ispitivanim plohama jedan od glavnih izvora SO_4^{2-} su i zračne mase s mora što potvrđuju dobiveni rezultati koji su u značajnoj korelaciji na svim plohama (Tablica 6). Analizom varijance (Slika 13a i d) utvrdilo se da na plohi hrasta medunca za NO_3^- postoji razlika u taloženju između 2017. i 2019. godine. Također, na plohi crnog bora za NH_4^+ i NO_3^- postoji razlika u taloženju između 2017. i 2018. godine. Rezultati upućuju da je suho taloženje glavni izvor dušika. Razlika se može vidjeti i u Tablici 7 gdje je veće opterećenje dušikovim spojevima bilo u 2019. godini u odnosu na 2017. i 2018. godinu za navedene plohe. U

istraživanju u Španjolskoj, utvrđeno je da je glavni izvor dušika na plohama hrasta crnike bilo suho taloženje te čini oko 60 do 80 % dušika na plohama (Aguillaume i sur., 2017). Ovaj rezultat upućuje da su najveće količine dušikovih spojeva pristigle atmosferskim taloženjem u šumske ekosustave. Dobiveni rezultati na istraživanim plohama upućuju na sličan rezultat.

Stvarna opterećenja taloženja dušikovim spojevima na ispitivanim plohama kretala su se od 4 kg N ha⁻¹ g⁻¹ u šumi alepskog bora u 2017. do 2019., 20 kg N ha⁻¹ g⁻¹ u šumi hrasta medunca (Tablica 7). Dobivene vrijednosti u ovom istraživanju su manje ili na granici od literaturnih vrijednosti (Bobbink i Hettelingh, 2011). Veće količine N taloženja mogu dovesti ove osjetljive ekosustave u opasnost zbog neravnomjerne opskrbe ostalim hranjivim tvarima (Braun i sur., 2020). Velike količine nataloženog dušika u šumskim ekosustavima mogu dovesti do niza negativnih posljedica što može dovesti do smanjenje biološke raznolikosti. Taloženje dušika može utjecati i na biološku raznolikost ekosustava općenito kroz eutrofikacija, zakiseljavanje tla, što uzrokuje da ekosustavi postaju podložniji abiotičkim i biotičkim izvorima stresa (npr. požar, suša, nametnici) (Bobbink i Hettelingh, 2011; Clark i sur., 2013).

Na području Mediterana rađeno je samo nekoliko istraživanja na temelju kojih su izračunata stvarna opterećenja dušikovim spojevima (Anatolaki i Tsitouridou, 2007; Avila i sur., 2010; Ferretti i sur., 2014; Aguilhaume i sur., 2017). Istraživanja su pretežno rađena na najznačajnijim mediteranskim vrstama poput hrasta crnike i alepskog bora. Opterećenje dušikom na otvorenoj plohi na staništu alepskog bora u blizini Atene (Grčka) utvrdila se vrijednost od 15 kg N ha⁻¹ g⁻¹ (Anatolaki i Tsitouridou, 2007). Znatno veće opterećenje od 38 kg N ha⁻¹ g⁻¹ bilo je u šumi, što ukazuje na zadržavanje suhog taloženja na krošnjama i naknadno ispiranje. Slične vrijednosti taloženja dušika (15 kg N ha⁻¹ g⁻¹) izmjerene su u centru Soluna (Grčka), pri čemu je suho taloženje činilo 70 % do 90 % ukupnog unosa dušika (Anatolaki i Tsitouridou, 2007). Utvrđena opterećenja dušikom u Španjolskoj bila su unutar kritičnih vrijednosti opterećenja predloženih za sredozemne zimzelene šume hrasta crnike (od 15 do 17,5 kg ha⁻¹ g⁻¹) (Aguillaume i sur., 2017). U Italiji su se prosječna opterećenja dušikom određena za više šumskih vrsta (npr. hrastu crnici, bukvi, smreki i dr.) kretala su se od 4 do 29 kg N ha⁻¹ g⁻¹ (Ferretti i sur., 2014). Jedan od glavnih faktora u tom istraživanju bila je lokacija plohe gdje su plohe smještene u dolini Po ili u njenoj blizini (dio poznat po industrijskoj i stočarskoj proizvodnji) imale najveće opterećenje dušikovim spojevima (Ferretti i sur., 2014). U ovom istraživanju, plohe u Istri smještene su u blizini doline Po, ali i sama Istra i Dalmacija poznate su po poljoprivrednim radovima, te opterećenje dušikovim spojevima moglo bi biti rezultat lokalnog i regionalnog onečišćenja.

5.2. Utjecaj prizemnog ozona na mediteranske šumske ekosustave

Ozon je snažno oksidativno sredstvo koje uzrokuje vidljiva oštećenja uključujući klorozu i nekrozu (Sicard i sur., 2016b; Araminienè i sur., 2019). S povećanjem atmosferskog onečišćenja, povećala se i koncentracija prizemnog ozona stoga je bitno pratiti njegove koncentracije, osobito u izloženijim područjima poput Mediteranske regije, jer utjecaj na biljke ovisi o njegovoj koncentraciji prisutnoj u troposferi (Sicard i sur., 2016b).

Na svim ispitivanim plohama (Slika 14) utvrđene su visoke koncentracije ozona. Najveće koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeračima pronađene su na plohi hrasta medunca, a slijede ploha hrasta crnike, alepskog te crnog bora. Koncentracije ozona na sve četiri ispitivane plohe bile su blizu ili su dosegnule gornju granicu od 100 ppb (Slika 14).

Uz AOT40 koji predstavlja okolnu koncentraciju ozona, PODY je biološki bitniji parametar koji se temelji na protoku ozona kroz puči. Zbog toga je uveden parametar koji predstavlja protok fitotoksičnog ozona, PODY (eng. Phytotoxic Ozone Dose over above a threshold flux of Y), jer unos ozona ovisi o vanjskim uvjetima kao i o samoj vrsti biljke (Anav i sur., 2016, 2019; Araminienè i sur., 2019; De Marco i sur., 2019; Eghdami i sur., 2022; Paoletti i sur., 2019). U ovom istraživanju, utvrđene koncentracije ozona pasivnim mjeračima preračunale su na jednosatne vrijednosti kako bi se izračunali parametri za procjenu rizika od ozona u svrhu zaštite šuma. Pomoću preračunatih vrijednosti koncentracija pasivnog ozona, izračunati su parametri ozona (AOT40 i PODY) na tri različita načina: parametri akumuliranog ozona, AOT40, (AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}) i fitotoksičnog ozona, PODY (POD0, POD1, POD2). Izračunate vrijednosti akumuliranog ozona, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno} za plohe hrasta crnike, alepskog i crnog bora imaju iste vrijednosti jer se pri izračunu tih parametara uzelo u obzir isto vegetacijsko razdoblje za sve tri vrste s obzirom da se radi o zimzelenoj vrsti i dvije četinjače (Tablica 9). Ploha crnog bora imala je najveće vrijednosti oba parametra (AOT40 i PODY). Ova ploha se nalazi na najvećoj nadmorskoj visini (Tablica 9). Visinski gradijent važan je parametar koji treba uzeti u obzir jer se koncentracija ozona povećava s nadmorskom visinom (Sicard i Dalstein-Richier, 2015).

Izračunati podaci za AOT40_{dir} bili su veći od 5000 ppb h na svim plohama osim na plohi hrasta crnike u 2017. i 2018. godini (Tablica 9). Vrijednost od 5000 ppb h uzima se kao gornja granica AOT40_{dir} za zaštitu šuma (CLRTAP, 2017). Prema dobivenim rezultatima ispitivane šumske vrste (hrast medunac, alepski i crni bor) nalaze se u uvjetima u kojima može doći do negativnih posljedica uzrokovanih ozonom. Istraživanje u Italiji i Španjolskoj

na mediteranskim šumskim plohama utvrdilo je također više vrijednosti $AOT40_{ICP}$ od 5000 ppb h, a istaknuli su da su manje koncentracije utvrđene na sjeveru Francuske u usporedbi s mediteranskim zemljama, Italijom i Španjolskom (Gerosa i sur., 2007.). Nadalje, istraživanjem utjecaja ozona na šumske ekosustave u tri europske države, Italiji, Francuskoj u Rumunjskoj također su utvrdili da su $AOT40$ vrijednosti prešle vrijednost granicu za zaštitu šuma od ozona (5000 ppb h) (Paoletti i sur., 2019). Prema navedenom istraživanju određivane su $AOT40$ vrijednosti i u ovom istraživanju uz razliku da su autori koristili aktivne mjerače za odrađivanje koncentracija ozona dok su u ovom istraživanju korišteni pasivni mjerači.

Za ispitivane šumske ekosustave vidljivo je da su izračunate vrijednosti fitotoksične doze ozona ovisile o vrsti. S povećanjem vrijednosti Y (0, 1 i 2 $\text{nmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) smanjuju se vrijednosti $PODY$ -a. Najveće izračunate vrijednosti za $POD0$, $POD1$ i $POD2$ (Tablica 9) bile su na plohi crnog bora, zatim na plohi hrasta medunaca, alepskog bora te hrasta crnike s najnižim vrijednostima. Hrast crnika jedna je od najotpornijih vrsta na ozon. Očekivalo se, po uzoru na druga istraživanja, da će imati najveće vrijednosti fitotoksičnog ozona (Calatayud i sur., 2011; De Marco i sur., 2016). Istraživanjem u Španjolskoj, na četiri vrste hrasta (*Quercus pyrenaica*, *Quercus robur*, *Quercus ilex* i *Quercus faginea*), utvrdilo se da je hrast crnika imao najveće vrijednosti izračunatih $POD0$ i $POD1$ (Calatayud i sur., 2011). Te vrijednosti bile su daleko veće nego vrijednosti utvrđene na ispitivanoj plohi hrasta crnike u Istri. Nadalje, u istraživanju De Marco i sur. (2016), rezultati $POD0$, $POD1$ i $POD2$ za mediteranske vrste (*Quercus ilex*, *Quercus suber*, *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster* i *Pinus pinea*) bile su veće u odnosu na vrijednosti izračunate za kontinentalne vrste (*Fagus sylvatica*, *Pinus cembra*, *Pinus sylvestris* i *Abies alba*) (De Marco i sur., 2016). U jugoistočnoj Francuskoj i sjeverozapadnoj Italiji, na plohama alepskoga bora izračunate su vrijednosti za $POD0$ i $POD1$ (Sicard i sur., 2016b). Usporede li se te vrijednosti s izračunatim vrijednostima na istraživanoj plohi alepskog bora, njihove vrijednosti bile su od 3 do 9 puta veće u odnosu na vrijednosti u ovom istraživanju (Tablica 9).

Na temelju istraživanja predložene su kritične vrijednosti fitotoksičnog ozona temeljene na protoku (eng. *Critical level flux*, $CLef$) za Y postavljen na 0 $\text{nmol O}_3 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ specifične za svaku vrstu u svrhu zaštite šuma od oštećenja ozonom (Sicard i sur., 2016b). Vrsta alepski bor (Tablica 9) je umjereno osjetljiva na ozon i u ovom istraživanju dobivene su vrijednosti manje od predložene vrijednosti $CLef$ od 32 mmol m^{-2} . Na plohi hrasta medunca i crnike (Tablica 9) vrijednosti su bile ispod predložene vrijednosti $CLef$ za tolerantne listače

od 25 mmol m⁻². Na plohi crnog bora (Tablica 9) u obje godine dosegnuta je vrijednost predloženog CLef, iako, vidljiva oštećenja nisu bila uočena promatranjem na terenu.

U ovom istraživanju na istraživanim plohama utvrđene su visoke koncentracije prizemnog ozona (Slika 14). Visoke koncentracije prizemnog ozona mogu uzrokovati vidljiva oštećenja na mediteranskim šumskim vrstama (Paoletti i sur., 2019). Vizualna procjena na istraživanim vrstama hrasta medunca i crnike nisu utvrđena vidljiva oštećenja. Vidljiva oštećenja nisu utvrđena ni na plohama alepskog i crnog bora što potvrđuje da su ovo tolerantne vrste na visoke koncentracije prizemnog ozona. Do sličnih zapažanja došli su i Calatayud i sur. (2011) proučavajući oštećenja na hrastovim vrstama (*Quercus cerris* L. i *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). Vizualnom procjenom utvrdile su se vrlo niske razine vidljivih oštećenja uzrokovanih ozonom te su klasificirane kao vrste tolerantne na ozon. Mediteranske zimzelene listače vrste poput hrasta crnike tolerantnije su na ozon nego mezofilne listače (Calatayud i sur., 2011; Bükler i sur., 2015). Ovim istraživanjem utvrđeno je da su hrast crnika, ali i hrast medunac, jedne od tolerantnijih vrsta na ozon. Također, ovo istraživanje je dalo je po prvi puta rezultate tolerancije ozona hrasta medunca i crnog bora u terenskim uvjetima.

5.3. Odnosi između varijabli okoliša i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma

Mediteranski šumski ekosustavi podložni su utjecajima klimatskim promjena kao i ekstremnim promjenama u klimi poput dugih suša i intenzivnog sunčevog zračenja (Sicard i sur., 2013; Sicard i sur., 2016a; De Marco i sur., 2022). U ovom dijelu opisani su odnosi okolišnih faktora (kiše, temperature, vlažnosti zraka, sunčevog zračenja, sadržaja vode u tlu) i jednog od najagresivnijih onečišćivača, ozona, na prirast i osutoststabala ispitivanih vrsta.

Osutost krošnje jedan je od glavnih indikatora stanja stabla te je definirana kao smanjenje gustoće lišća u odnosu na referentno stablo (Eichhorn i sur., 2016). Odbacivanje lišća biljci služi kao jedan od mehanizama obrane od izvora stresa, poput suše (Guada i sur., 2016a). Osutost stabala jedan je od nespecifičnih pokazatelja zdravstvenog stanja šume jer može bit povezana s različitim abiotičkim i biotičkim izvorima stresa kao što su razni okolišni čimbenici (visoka temperatura, suša, salinitet) ili patogeni (Sicard i sur., 2016b). U isto vrijeme, osutost je odraz stanja stabla iz posljednjih nekoliko godina sezona rasta (Polák i sur., 2006). Iako nespecifičan pokazatelj, osutost se još uvijek koristi u praksi za procjenu

zdravstvenog stanja šuma i uvrštena je kao parametar koji se prati prema u međunarodnom programu ICP Forests (Eichhorn i sur., 2016).

Praćenjem osutosti na istraživanim plohama kroz tri godine, utvrđeno je da se osutost mijenjala ovisno o godini. Smanjenje osutosti hrasta medunca bilo je u 2018. godini te se povećala u 2019. (Slika 22a). Ploha hrasta medunca bila je jedina ploha na kojoj su uočena odumrla stabla (osutost 100 %, Slika 22a), što ne čudi s obzirom na veću starost sastojine. Ploha alepskog bora (Slika 22c) bila je ploha s najvećom osutosti u ispitivanom razdoblju i među procijenjenim vrstama. Na istoj plohi utvrđena je najveća promjena pada osutosti (Slika 21). Visok postotak stabala sa značajnom osutosti uočen je na plohi alepskog i crnog bora, s time da na plohi alepskog bora nisu uočena stabla nulte klase (osutost 0 - 10 %, Slika 22c), dok na plohi crnog bora nisu uočena stabla treće i četvrte klase (osutost 61 – 99 % i 100 %, Slika 22a). Najmanja osutost procijenjena je na plohi hrasta crnike (Slika 22b). Hrast crnika bila je najvitalnija ploha u ovom istraživanju i potvrđuje tezu da je jedna od najotpornijih vrsta na Mediteranu (Cotrozzi i sur., 2016, 2017; Hoshika i sur., 2017; Pellegrini i sur., 2019). Sličan rezultat utvrđen je i u Francuskoj gdje je utvrđena veća osutost za alepski bor u usporedbi s običnim borom (*Pinus sylvestris*) i švicarskim borom (*Pinus cembra*) (Sicard i sur., 2016b).

Nadalje, istraživanjem u šumama Mediteranske regije, pokazalo se da su pojave sušnih razdoblja glavni pokretači osutosti (Carnicer i sur., 2011). Istraživanje u Francuskoj i Italiji također je potvrdilo da su četinjače imale veći postotak stabala značajne osutosti u odnosu na listače (Sicard i sur., 2016b). Također, poznato je i to da četinjače u sušnom razdoblju odbacuju iglice što služi kao jedan od mehanizama obrane od abiotičkog stresa (Poyatos i sur., 2013; Sicard i Dalstein-Richier, 2015). Na ispitivanim plohama jedan od mogućih uzročnika visokog postotka značajno osutih stabala alepskog i crnog bora je gljiva iz roda *Lophodermium* (Pernek i sur., 2012).

Nadalje, ispitala su se korelacije utvrđenih vrijednosti osutosti s okolišnim parametrima kako bi se vidjelo postoji li odnos među njima. Dobiveni rezultati na istraživanim plohama pokazali su slične rezultate gdje je osutost bila u korelaciji sa sadržajem vode u tlu, SWC, (eng. *Soil water content*) na sve četiri dubine (SWC1 - 4) i s POD0 kada se temperatura koristila kao konstantna varijabla (Tablica 10). Samo u slučaju kada su SWC i temperatura bili konstantni, osutost je bila negativno povezana s parametrima AOT40. Prema podacima iz literature, najrelevantniji parametri koji utječu na osutost i vidljiva oštećenja na lišću su SWC i temperatura zraka (Paoletti i sur., 2019; Sicard i sur., 2016). Istraživanje De

Marco i sur. (2014) istaknulo je da se s povećanjem suše i temperature, osutost vidljivo povećava u mediteranskoj regiji u odnosu na druge europske regije.

Uz osutost, prirast je još jedan od pokazatelja zdravstvenog stanja šuma. Prirast se često koristi kao indikator vitalnosti stabla (McMahon i Parker, 2015). Vitalnost stabla može se definirati kao sposobnost stabla da se asimilira, da preživi stresne uvjete, da reagira na promjenjivo okruženje i da se razmnožava (Brang, 1998). Za Srednju Europu, istraživanje prirasta pokazala su značajno povećanje rasta tijekom posljednjih desetljeća, s povećanom dostupnošću dušika kao jednim od mogućih uzroka. Kao što je prikazano u literaturi, povećanje od $1 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ g}^{-1}$ odgovara povećanju prirasta bazalne površine između 1,20 % i 1,49 % ovisno o vrsti (Laubhann i sur., 2009). Poznato je da dušik potiče rast i prirast biljke. U situaciji kada osjetljivi ekosustavi, uključujući i mediteranske ekosustave, više nisu ograničeni dušikom, već fosforom, dolazi do neravnoteže u ishrani, biljka više nije u ravnoteži s hranjivima, te postaje podložnija biotičkim i abiotičkim uzročnicima stresa poput štetnika ili ozonu (Bobbink i Hettelingh, 2011). Budući da je rast stabla vrlo osjetljiv na abiotički stres, aktivnost kambija (tj. rast stabla) predstavlja snažan pokazatelj vitalnosti i zdravlja stabala (Guada i sur., 2016; Paoletti i sur., 2019).

Najveći prirast na ispitivanim plohama utvrđen je u 2019. godini, izuzev na plohi hrasta medunca. Najmanji prirast utvrđen je u 2017. godini, izuzev na plohi alepskog bora koji je najmanji prirast imao u 2018. godini (Tablica 12). Godišnji prirast BAI (eng. *basal area increment*) hrasta crnike utvrđeno je da prirasta dva puta godišnje (proljetno razdoblje rasta i rano jesensko razdoblje rasta, Prilog 2). Slična dinamika prirasta na ispitivanim plohama bila je zabilježena i na plohi alepskog bora (Prilog 2). U ovom istraživanju pokazalo se da su uvjeti tijekom proljeća bili glavni pokretači godišnjeg rasta bazalne površine za hrast crniku i hrast medunac. S druge strane, vrsta alepskog bora također prirasta dva puta godišnje dok je crni bor je pokazao kontinuirani unutargodišnji rast u 2018. (Prilog 2).

Slični rezultati prirasta utvrđeni su i u Francuskoj u šumi hrasta crnike te u Španjolskoj u šumi alepskog bora (Camarero i sur., 2010; Lempereur i sur., 2015). Istraživanje u Španjolskoj sugerira da je suša bila ključni klimatski čimbenik koji objašnjava varijacije u prirastu alepskog i crnog bora (Martinez del Castillo i sur., 2018). Za mediteranske vrste bora (*Pinusa sp.*) poznato je da pod povoljnim uvjetima rasta, kambij može biti aktivan tijekom cijele godine, to jest da može prirastati tijekom cijele godine (Prislan i sur., 2016).

S obzirom da na navedenim ispitivanim plohama provedbom parcijalne korelacije s temperaturom i SWC1 kao konstantnim varijablama, utvrdilo se da sunčevo zračenje (Rad)

pozitivno korelira s prirastom dok je relativna vlaga (RH) bila u negativnoj korelaciji (Tablica 10). Dobiveni rezultati na ispitivanim vrstama pokazali su da je rast pozitivno povezan sa sunčevim zračenjem i negativno povezan sa vlagom (Tablica 10). Ozon je imao pozitivan utjecaj na prirast za sve četiri provedene korelacije (Tablica 10). Nadalje, analize koje su proveli Ferretti i sur. (2018.) pokazale su da ni AOT40 ni POD0 nisu značajno povezani s godišnjim prirastom u šumama na području Alpa. Dobiven rezultat je u suprotnosti s rezultatima istraživanja u šumama bukve i u šumama na području Alpa (Matyssek i sur., 2010; Paoletti i sur., 2018). Da bi se razjasnilo ovo zapažanje, potrebno je više ovakvih istraživanja o stanju na terenu na mediteranskom području.

U prirodnim uvjetima teško je razlikovati utjecaj ozona na biljke od ostalih okolišnih parametara poput suše, temperature i slično (De Marco i sur., 2013). Stoga se statistički alat RFA (eng. *Random forest analysis*) pokazao kao koristan alat za prepoznavanje najvažnijih prediktora koji utječu na prirast, a može se i primijeniti za dobivanje informacija o utjecaju ozona na biljke u stvarnim uvjetima na terenu (Jakovljević i sur., 2021). Ispitivanje utjecaja ozona na ispitivanim vrstama koristeći RFA analizu, pokazalo je da parametri ozona imaju značajan utjecaj na rast hrasta medunca (AOT40_{pheno}), hrasta crnike (AOT40, POD0) te na rast crnog bora (POD0, POD1 i AOT_{ICP}) (Slika 19). Na rast crnog bora najveći utjecaj imao je POD0. Vrlo bitni prediktori bili su i PODY te SWC (Slika 19). Utjecaj ozona na rast drveća slabo je istražen u terenskim uvjetima stoga trenutne koncentracije prizemnog ozona smatraju se dovoljno visokima da uzrokuju štetu biljkama time i smanjen rast i produktivnost (Mills i sur., 2018; Paoletti i sur., 2019; Proietti i sur., 2016). Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da se zbog utjecaja ozona smanjio prsni promjer bukve za 11 % i njena produktivnost za 44 % nakon osam godina izloženosti ozonu (Matyssek i sur., 2010). Petogodišnje istraživanje provedeno u periodu od 2001.-2005. na području Italije u šumama gdje je dominantna vrsta bukva naglasilo je potrebu za preciznijim istraživanjima, tj. za manjim vremenskim intervalima (s učestalijim podacima tijekom godine) kako bi se preciznije i točnije procijenio utjecaj ozona na rast šuma (Paoletti i sur., 2018.). Autori u provedenom istraživanju nisu pronašli značajnu korelaciju između prirasta i parametara ozona zato što je količina prikupljenih podataka bila nedostatna da bi se uzelo u procjenu uz druge varijable koje utječu na rast stabala.

5.4. Status hranjivih tvari u tlu i lišću i iglicama

Kruženje i unos hranjivih tvari važni su procesi za vitalnost šuma. U doticaju s površinom biljaka, kiša mijenja svoja fizikalno-kemijska svojstva ispirući nataložene ione na krošnji, i dolazi do izmjene iona između biljke i kiše (Kozłowski i sur., 2020). Stoga vegetacija značajno utječe na biogeokemijski ciklus elemenata (Kozłowski i sur., 2020). Hranjive tvari te njihovi omjeri u biljnom materijalu daju uvid u hranidbeni status stabla u smislu nedostatka ili viška u odnosu na druge hranjive tvari (de Vries i sur., 2001). Analiza biljnog materijala izravan je pokazatelj dostupnosti hranjivih tvari u tlu i ishrane biljaka. Analizom hranjivih tvari u tlu i biljnom materijalu (lišću i iglicama) dobiva se cjelovita slika opskrbljenosti tla hranjivim tvarima i dostupnosti hranjivih tvari biljkama (de Vries i sur., 2014). Stoga je ključno uzeti u obzir ograničenje i samu dostupnost hranjivih tvari pri proučavanju ponašanja šuma na klimatske promjene jer nedostatak kao i prekomjerne količine mogu utjecati na ravnotežu cijelog ekosustava (Jonard i sur., 2015).

Na ispitivanim plohama, analizom biljnog materijala utvrđeno je da su fosfor, kalij i magnezij za sve vrste bili u optimalnom rasponu, dok je kalcij bilo u prekomjernim količinama na svim plohama izuzev na plohi hrasta crnike (Slika 20a-d). Sadržaj hranjivih tvari u lišću stabala, zapravo odražava stanje atmosfere i stanje tla (Rautio i sur., 2020). Ravnoteža hranjivim tvarima u tlu bitan je čimbenik za rast biljaka koji se može primijeniti na sve biljke, pri čemu se optimalni rast može postići samo ako su prisutni svi čimbenici rasta i u pravilnom odnosu (Taiz i sur., 2015). Iako se percipira kao nespecifičan pokazatelj vitalnosti stabala, osutost je povezana s nutritivnim statusom stabala. Utvrđeno je da se udio stabala bukve s osutosti većom od 25 % povećava s povećanjem omjera dušika u biljnom materijalu s kalcijem i kalijem, što ukazuje na to da je osutost povezana s neravnotežom hranjivih tvari u lišću (Ferretti i sur., 2015).

Za utvrđivanje stanja hranjivih tvari u tlu na ispitivanim plohama uzet je gornji mineralni sloj (0-10 cm) jer pokazuje brze promjene na atmosferska taloženja (Ferretti i sur., 2014). Opskrbljenost tla dušikom, kao jednog od najbitnijeg biogenog elementa, bila je u optimalnom rasponu na svim plohama u sve tri godine. Najmanje vrijednosti utvrđene su na plohi crnog bora (Slika 20).

Iako su atmosferskim taloženjem prispjele velike količine dušikovih i kiselih spojeva (Tablica 7 i 8) u ispitivane mediteranske šumske ekosustave, nije došlo do značajne promjene pH tla tijekom istraživanja. Na području Istre, plohe hrasta medunca i crnike imale su slabo kiselu reakciju tla (Tablica 11). Najveća promjena pH vrijednosti utvrđena je na plohi hrasta

crnike, gdje je najniža vrijednost pH bila u 2017. godini i povećala se u 2018. najveća je bila u 2019. godini (Tablica 11). U 2019. godini utvrđene su veće vrijednosti pH tla bez obzira što je utvrđeno veće opterećenje dušikovim spojevima (Tablica 7) i kiselim spojevima (Tablica 89). U Dalmaciji, na plohama alepskog i crnog bora, utvrđena je neutralna do alkalna reakcija tla prema dobivenim pH vrijednostima (Tablica 11) što upućuje da nije došlo do zakiseljavanja tijekom tri godine istraživanja. Na ispitivanim plohama, bazični ioni su neutralizirali prisutne kisele spojeve na krošnji, a podignuti su kao prašina s karbonatnih tala u atmosferu te suhim taloženjem prispjeli na krošnje. Do sličnog zaključka došli su i autori u istraživanjima provedenim u Italiji i Poljskoj (Mosello i sur., 2002; Keresztesi i sur., 2019). Na plohama u Istri utvrđene su nešto niže vrijednosti pH u odnosu na literaturne podatke za crvenicu, dok su na plohama u Dalmaciji utvrđene više vrijednosti u odnosu na literaturne podatke za tip tla kalkokambisol (Pernar i sur., 2011). Tlo na ispitivanim plohama bilo je vrlo slabo opskrbljeno fosforom na svim plohama za sve tri istraživane godine (Tablica 11). Iako utvrđene količine fosfora u lišću i iglicama (Slika 20) bile su u optimalnim rasponima za sve četiri vrste. Kod hrasta crnike koncentracija kalija bila je u niskom rasponu, vjerojatno zbog fiksacije kalija u glinovitom tlu prisutnom na plohi. Gubitak hranjivih tvari iz ekosustava, poremećaj kruženja i unosa hranjivih tvari ili neravnoteža u sastavu hranjivih tvari mogu biti povezani sa smanjenom produktivnošću drveća. Nedostatak određenog biogenog elementa rezultirat će neravnotežom osnovnih fizioloških funkcija, ovisno o stupnju nedostatka. Do smanjenja dostupnosti hranjivih tvari može doći uslijed zakiseljavanja tla te time uzrokovati gubitak bazičnih iona (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) koji su vrlo bitni za normalno funkcioniranje biljke (Taiz i sur., 2015). Također, pretjeran rast uslijed povećanog unosa dušika u ekosustave može uzrokovati neravnotežu drugim hranjivima, osobito fosfora koji je postao limitirajući faktor za optimalni rast i razvitak šuma (Bobbink i Hettelingh, 2011; Braun i sur., 2020). Unos kalija uvelike ovisi o njegovoj dostupnosti (Mengel i Kirkby, 2012). Budući da nedostatak kalija smanjuje otpornost biljaka na abiotičke i biotičke čimbenike, razmatra se u okviru hipoteze o propadanju šuma (Bergmann i sur., 1980). Budući da nije došlo do značajne promjene u pH tla tijekom ovog istraživanja, nije bilo ni značajnih promjena u količini hranjivih tvari utvrđenim u tlu kao i ni u biljnom materijalu.

5.5. Utjecaj abiotičkog stresa na mediteranske šumske vrste

Onečišćenje zraka i klimatske promjene te složene interakcije između okolišnih parametara i same biljke mogu utjecati na zdravlje i produktivnost šuma (Proietti i sur., 2016). Na primjer, na šume može utjecati povećanje koncentracija prizemnog ozona, koji je fitotoksičan te može uzrokovat klorozu i nekrozu, taloženje dušika koje može uzrokovati njihovo propadanje zbog zakiseljavanja te promjene u učestalosti i intenzitetu klimatskih ekstrema (npr. toplinski valovi, oborine, oluje). Sve navedeno može utjecati na strukturu, sastav i funkcioniranje šumskih ekosustava (de Vries i sur., 2014; Guada i sur., 2016). U takvim stresnim okolnostima vrlo bitnu ulogu ima i antioksidativni obrambeni mehanizam kako bi biljke mogle preživjeti u takvim uvjetima. Sam biokemijski odgovor biljke ovisit će o okolini u kojoj raste te o vanjskim izvorima stresa koji utječu na nju kao i o vrsti same biljke (Contran i sur., 2013).

Motrenjem četiri plohe u dvije mediteranske regije, dvije hrastove plohe (hrast medunac i hrast crnika) koje se nalaze u Istri te dvije borove plohe (alepski bor i crni bor) u Dalmaciji, uočena su različita opterećenja ploha atmosferskim taloženjem i ozonom te su primijećene i različitosti u osutosti stabala ovisno o vrsti. Zbog navedenih rezultata odlučilo se ispitati postoji li korelacija između stanje šuma i vizualnog pregleda pojedinih biljnih vrsta te biokemijskih parametara s ciljem utvrđivanja stanja šuma na razini biokemijskih pokazatelja oksidativnog stresa.

U mjerenom razdoblju, od 2017. do 2019. godine, zabilježene su veće vrijednosti pojedinih uzročnika stresa, poput dušikovih i kiselih spojeva te ozona. U 2019. godini pale su i najveće količine kiše na svim plohama u šumi i izvan šume, s najvećom količinom na plohi crnog bora (Tablica 4). Također, u 2019. godini utvrđena su najveća taloženja dušikovih i kiselih spojeva na svim plohama, izuzev plohe alepskog bora s najvećom količinom dušikovih spojeva na plohi hrasta medunca te s najvećom količinom kiselih spojeva na plohi hrasta crnike (Tablica 7 i 8). Prosječne koncentracije ozona izmjerene pasivnim mjeracima bile su najveće u 2019. godini na svim plohama, s najvećom prosječnom koncentracijom na plohi hrasta medunca (Slika 14). Nadalje, određivana je i osutost na četiri ispitivane vrste u 2019. godini. Najveći prosječni postoci značajno osutih stabala s $> 40\%$ utvrđeni su na plohama hrasta medunca, alepskog i crnog bora, a na plohi hrasta crnike zabilježen je najmanji postotak u odnosu na druge plohe, $< 10\%$ (Slika 22). Uzorci biljnog materijala prikupljeni su na terenskim uvjetima u 2019. godini sa stabala bili su podijeljeni prema osutosti u 2 kategorije: kategorija stabala male osutosti (osutost $< 25\%$) i kategorija stabala značajne

osutosti (osutost > 25 %) u prikupljenim uzorcima odredile su se količine fotosintetskih pigmenata (Chl-a, Chl-b, Chl-tot) mjerenjem razine lipidne peroksidacije (LPO/MDA) i količine H₂O₂, te su analizirane aktivnosti antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APX), nespecifičnih peroksidaza (POD).

Količine klorofila ovise o raznim izvorima stresa, a neki od njih su i onečišćenje atmosfere i tla (Agathokleous i sur., 2020a; Landi i sur., 2019). Za hrast medunac i crniku kao i za crni bor utvrđene su značajno veće količine fotosintetskih pigmenata (klorofil a, Chl-a, te za ukupnu količinu klorofila, Chl-tot) za stabla male u odnosu na stabla značajne osutosti na što upućuje Tablica 13. Za hrast crniku, značajno veće vrijednosti u stablima male osutosti u odnosu na značajno osuta stabla utvrđena je i za klorofil b, Chl-b, količinu fotosintetskih pigmenata. Iznimno, za alepski bor utvrđeno je značajno više Chl-b u značajno osutim stablima u odnosu na stabla male osutosti (Tablica 13). U literaturi nema mnogo sličnih istraživanja u terenskim uvjetima zbog kompleksnog odnosa stabala s raznim okolišnim varijablama te je većina istraživanja rađena u kontroliranim uvjetima (Marabottini i sur., 2001; Contran i sur., 2013; Cotrozzi i sur., 2017; Fusaro i sur., 2017; Zhang, i sur., 2018b; Landi i sur., 2019; Pellegrini i sur., 2019). No, neki od dobivenih rezultata u ovom istraživanju mogu se usporediti s rezultatima dobivenim u kontroliranim uvjetima. Istraživanja su utvrdila da na količinu fotosintetskih pigmenata utječu razni faktori, a ozon, visoka temperatura te suša jedni su od najutjecajnijih faktora u Mediteranskoj regiji (Contran i sur., 2013). U istraživanju na sadnicama topole (*Populus maximoviczii* Henry × *Populus berolinensis* Dippel) utvrđeno je da ozon negativno utječe na sadržaj klorofila (Zhang i sur., 2018b). Oštećenje pigmenata rezultira njihovim manjim brojem, što u konačnici može biti vidljivo kao žućenje lista i u krajnjem slučaju nekroza (Agathokleous i sur., 2020b). U istraživanju u kontroliranim uvjetima (kontrolirano dodavanje vode i doziranje ozona) pokazalo se da su sadnice hrasta medunca u uvjetima suše i više koncentracije ozona imale najveći broj mrtvih stanica (Landi i sur., 2019). Sadnice su prvotno bile izložene suši kao prvom izvoru stresa te naknadno izložene ozonu. Budući da su stanice umrle već pri prvom izvoru stresa (suša), biljke su bile ograničene u aktivaciji odgovarajućih mehanizama obrane od ozona što je rezultiralo akumuliranjem velikih količina ROS-a te rezultiralo vidljivim oštećenjima na listu (Landi i sur., 2019). Nadalje, u istraživanjima na različitim hrastovim stablima (dvije zimzelene vrste, *Quercus acuta* i *Quercus glauca*, i dvije listopadne vrste, *Quercus serrata* i *Quercus crispula*) (Takashima i sur., 2004) utvrđeno je da prilikom stresnih uvjeta, listopadne vrste su usmjerene na sintezu klorofila i održavanje fotosinteze kako bi stvorile dovoljno energije za reprodukciju u vegetacijskom razdoblju. Zimzelene vrste su više

usmjerene na očuvanje što rezultira manjim rastom (manja fotosinteza) te im je u cilju opstanak lista (i do dvije godine). Stoga zimzelene vrste više energije ulažu u produljenje životnog vijeka lista, a manje energije se ulaže u stvaranje klorofila (Takashima i sur., 2004). Suša utječe na smanjenje klorofila, osobito ako su uključeni i drugi izvori stresa, poput ozona. U istraživanju u kontroliranim uvjetima autori su istraživali kako ozon utječe na sadnice hrasta crnike koje su prethodno bile izložene sušnim uvjetima te na sadnice koje su bile redovito zalijevane (Cotrozzi i sur., 2017). Istraživanjem se utvrdilo da sadnice u oba tretmana (zalijevane ili ne) nisu pokazale vidljiva oštećenja nakon izlaganja ozonu. Iako na istim biljkama nije bilo vizualnog oštećenja, mikroskopska analiza je utvrdila mrtve stanice, tj. oštećenja na lišću nakon izlaganja ozonu u oba tretmana (Cotrozzi i sur., 2017). Omjer klorofila a i b (Chl-a/Chl-b) mijenja se ovisno o vanjskim uvjetima. Utvrđeno je da se omjer Chl-a/Chl-b značajno smanjio u sadnicama hrasta medunca izloženim sušnom stresu te povišenom temperaturom (simulirajući povišenje temperature kao rezultat globalnog zatopljenja) u odnosu na kontrolne sadnice (Contran i sur., 2013). U ovom istraživanju utvrđene su značajno manje količine Chl-a, Chl-b i Chl-tot hrasta crnike u značajno osutim stablima te se zaključuje da su ova stabla pod određenim stresom. Za alepski i crni bor utvrđene su značajno veće količine klorofila kod značajno osutih stabla (alepski bor Chl-b i crni bor Chl-a i Chl-tot) upućujući da borove vrste ulažu energiju u sintezu klorofila. Poznato je da borovi odbacuju iglice kako bi se zaštitili od, na primjer, suše što je jedan od mehanizama obrane (Poyatos i sur., 2013; Sicard i Dalstein-Richier, 2015). Moguće je da zbog manjka lisne površine usmjeravaju energiju u sintezu klorofila kako bi nadoknadili taj gubitak.

Molekula H_2O_2 pri normalnim uvjetima stvara se unutar stanice kao produkt metabolizma stanice i služi kao signalna molekula (Gill i Tuteja, 2010). Prilikom stresnih uvjeta stvara se u prekomjernim količinama i uzrokuje štetu unutar stanice te je jedna od reaktivnih kisikovih čestica koja stvara oštećenja unutar stanice (Sharma i sur., 2012). Za H_2O_2 (Tablica 16), značajna razlika između stabala male i značajne osutosti utvrđena je samo na stablima crnog bora i to s višim vrijednostima H_2O_2 u stablima male osutosti. U raznim istraživanjima određivane su količine H_2O_2 nastale u biljkama u kontroliranim uvjetima primjenom različitih uzročnika stresa poput ozona i suše (Contran i sur., 2013; Landi i sur., 2019). Značajne razlike u sadnicama hrasta medunca utvrđene su za količinu H_2O_2 u sadnicama tretiranim sušom, povišenom temperaturom ili s oba stresora u odnosu na kontrolne sadnice (Contran i sur., 2013). Također, u istom istraživanju autori su utvrdili razliku u količini H_2O_2 ovisno o pH tla, gdje su značajno veće količine H_2O_2 utvrđene u sadnicama koje su rasle na kiselom u odnosu

na bazično tlo (Contran i sur., 2013). S obzirom da je u ovom istraživanju utvrđena slabo kisela reakcija tla na plohi hrasta medunca (Tablica 11), moguće da je i ono utjecalo na utvrđene količine H_2O_2 na ovoj plohi kao jedan od izvora stresa. Nadalje, u istraživanju gdje su sadnice bile izložene suši sedam dana podijeljene su u grupe gdje je dio sadnica (zalijevanih i nezalijevanih) izloženo ozonu u trajanju od pet sati (Landi i sur., 2019). Istraživanjem se utvrdilo je da se količina H_2O_2 sintetizirala ovisno kojim tretmanom je biljka prethodno bila tretirana (dobro zalijevana bez utjecaja ozona, dobro zalijevana s utjecajem ozona, tretirana sušom bez utjecaja ozona, tretirana sušom s utjecajem ozona). Najznačajniji pad u količini H_2O_2 utvrđen je bio u biljkama koje su prethodno bile izložene i suši i ozonu (Landi i sur., 2019).

Nadalje, H_2O_2 jedan je od glavnih prekursora lipidne peroksidacije (LPO). Lipidna peroksidacija je oštećenje stanične membrane, a nastaje kao posljedica intenzivnog oksidativnog stresa i nedovoljno učinkovitog uklanjanja ROS-a (Sharma i sur., 2012). Kao posljedica oštećenja lipidne membrane nastaje produkt malondildehi, MDA (Gill i Tuteja, 2010). U ovom istraživanju značajne razlike izmjerenih količina MDA utvrđene su između stabala male i značajne osutosti za sve vrste izuzev crnog bora. Za hrast medunac značajno veća količina MDA utvrđena je u stablima male osutosti, dok su veće količine MDA utvrđene u značajno osutim stablima za hrast crniku i alepski bor. Generalno, ploha hrasta crnike bila je najvitalnija ploha (prosječna osutost <10 %) te se zaključuje da su odabrana stabla značajne osutosti bila pod određenom vrstom stresa (neki biotički stres poput štetnika) koja su zahvatila samo ispitane jedinke. Klimatski ekstremi, kao i atmosferska taloženja i visoke koncentracije ozona, mogu se smatrati osnovnim nepovoljnim čimbenicima na ispitivanim plohama koji su uzrokovali stres i fiziološko slabljenje ispitivanih vrsta. Ovakva oslabljena stabla uslijed oksidativnog stresa laka su meta za napad različitih vrsta štetnika te podložnija bolestima. Stoga je bitno pratiti i stabla male i značajne osutosti kako bi se moglo pravovremeno reagirati s ciljem očuvanja ovih osjetljivih šumskih ekosustava.

Istraživanja na različitim biljnim vrstama prateći količine MDA utvrdila su pojavu lipidne peroksidacije koje su nastale pod utjecajem raznih izvora stresa. Na primjer, istraživanjem na sadnicama hrasta crnike ispitivao se utjecaja ozona i saliniteta te se određivala i lipidna peroksidacija nakon izlaganja navedenim izvorima stresa (Guidi i sur., 2017). Uspoređivanjem količina MDA utvrđenim u biljkama koje nisu bile izložene ozonu i salinitetu utvrđena je značajna razlika u usporedbi s biljkama koje su bile izložene jednom ili oba izvora stresa (Guidi i sur., 2017). U istom istraživanju autori su utvrdili da nema značajne razlike u količini MDA između biljaka koje su bile izložene salinitetu te ozonu i salinitetu

istovremeno. Zanimljivo je da kad je hrast crnika izložen salinitetu, da ovaj izvor stresa smanjuje negativni utjecaj ozona na način da zbog pada osmotskog tlaka dolazi do zatvaranja puči i nemogućnosti ulaska ozona u biljku, te posljedično ne dolazi do oštećenja unutar stanice (Guidi i sur., 2017). Nadalje, ispitivanje utjecaja ozona i suše, koji su dva tipična izvora stresa na Mediteranu tijekom proljeća i ljeta, na sadnicama hrasta medunca, hrasta crnike i hrasta cera utvrdilo se da su značajno veće količine MDA bile u sadnicama koje su bile izložene suši i ozonu u odnosu na kontrolne sadnice. Također, istraživanje na sadnicama hrasta medunca (kontrolne sadnice) na različitim pH tla utvrdilo je da su sadnice na kiselom tlu bile pod većim stresom u odnosu na sadnice na bazičnom tlu (Contran i sur., 2013). Nadalje, rezultati istraživanja na vrsti hrasta (*Quercus brantii* Lindl.) su pokazali da količina MDA s povećanjem osutosti prvo raste, a zatim opada. Rezultati su pokazali da je povećanje sušnog stresa uzrokovalo povećanje sadržaja MDA i rezultiralo povećanjem kalcija u listovima. U ovom istraživanju, od ispitivanih vrsta ni za jednu vrstu izuzev crnog bora nisu utvrđene značajno različite količine H_2O_2 između stabala male i značajne osutosti. Također, jedino za crni bor nisu utvrđene značajne razlike količine MDA između stabala male i značajne osutosti dok za sve ostale vrste jest. Ovi rezultati upućuju da je stvorena količina H_2O_2 aktivirala obrambene mehanizme kod stabala male osutosti dok su kod stabala značajne osutosti već bili aktivirani što je rezultiralo da nije utvrđena značajna razlika u količini MDA. Ova vrsta pokazala se kao najtolerantnija vrsta na ozon budući da je za nju izračunata najveća vrijednost fitotoksičnog ozona, POD0, POD1 i POD2 (Tablica 9).

Za normalan rast i razvoj biljke u promjenjivoj okolini, bitno je održavati ravnotežu između proizvedenog ROS-a i djelovanja antioksidativnog obrambenog sustava koji se aktivira kao odgovor na pojavu oksidativnog stresa. Određivanjem aktivnosti enzima cilj je bio utvrditi postoje li razlike između stabala male i značajne osutosti za ispitivane vrste. U ovom istraživanju nisu utvrđene značajne razlike koje bi upućivale na razliku u aktivnosti enzima hrasta crnike u značajno osutim stablima u odnosu na stabla male osutosti. Za aktivnost SOD-a, značajne razlike između stabala male i značajne osutosti utvrđene su jedino za crni bor. Za ostale vrste nisu utvrđene značajne razlike. Značajne razlike aktivnosti enzima između stabala male i značajne osutosti za hrast medunac i alepski bor utvrđene su za APX i CAT, dok je značajna razlika svih enzima utvrđena za crni bor. Veća značajna razlika aktivnosti CAT-a izmjerena je u stablima manje osutosti za hrast medunac i crni bor. Za alepski bor, veća značajna razlika aktivnosti CAT-a utvrđena je u značajno osutim stablima (Slika 22).

Aktivnosti enzima istraživane su na sličnim vrstama u kontroliranim uvjetima (Alonso i sur., 2001; Contran i sur., 2013; Fusaro i sur., 2017). Istraživanje na sadnicama hrasta medunca utvrdile su manje aktivnosti APX-a u sadnicama na kiselom tlu u odnosu na aktivnosti sadnica na baznom tlu (Contran i sur., 2013). U ovom istraživanju, značajne razlike između stabala male i značajne osutosti crnog bora utvrđene za H_2O_2 i aktivnosti SOD-a sugeriraju da je glavni proizvod ROS-a bio superoksidni radikal, a slično su zaključili i autori pri istraživanju na vrsti hrasta medunca (Contran i sur., 2013). Uloga antioksidativnog enzima SOD-a, koji je prva linija obrane od oksidativnog stresa, je da izravno katalizira redukciju superoksidnog radikala u H_2O_2 (Contran i sur., 2013; Mittler i sur., 2004). Utvrđene količine H_2O_2 u ispitivanim jedinkama odrazilo se na aktivaciju obrambenog mehanizma aktivacijom enzima CAT, POD i APX koji kataliziraju H_2O_2 u vodu i oksidirani donor (Slike 21-23).

U kontroliranom okruženju, dodavanjem ozona u komore vrsti crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.) povećale su se količine ROS-a, shodno tome i aktivnosti enzima SOD-a i CAT-a, koji se podrazumijevaju kao prva linija obrane koja raspršuje O_2^- i H_2O_2 (Fusaro i sur., 2017). Ovo istraživanje je utvrdilo razliku u mehanizmima obrane uzrokovane ozonom između vrsta hrasta crnike i crnog jasena te da je crni jasen osjetljivija vrsta na ozon. Istraživanjem utjecaja ozona i suše na iglicama sadnica alepskog bora, utvrdilo se da je ozon izazvao veće aktivnosti POD-a, CAT-a i SOD-a dok je stres od suše povećao glutation reduktazu i SOD. Jednogodišnje iglice pokazale su manji kapacitet za aktiviranje ovih enzima kao odgovor na stres. Kombinirani učinci ozona i suše smanjili su aktivnosti antioksidativnih enzima i sposobnost oporavka nakon ponovnog zalijevanja (Alonso i sur., 2001). Na ispitivanim vrstama, mnogo faktora moglo je utjecati na aktivaciju obrambenih mehanizama, poput utvrđenih opterećenja dušikovim (Tablica 7) i kiselim spojevima (Tablici 8), visokih koncentracija ozona (Slika 14) te visokih temperatura koje vladaju u mediteranskoj regiji, nije neobično da su je za ove vrste utvrđena aktivacija antioksidativnih enzima (Contran i sur., 2013; Fusaro i sur., 2017; Guidi i sur., 2017; Landi i sur., 2019). Prema dobivenim rezultatima, za ispitivane vrste (izuzev hrasta crnike za koji nije utvrđena značajna razlika ni za jedan enzim) jedino aktivacija enzima APX mogla bi se smatrati kao indikatorom stresa. Njegovim utvrđivanjem moglo bi se utvrditi nalazi li se biljka pod stresom i prije nego nastupi vizualno oštećenje.

Manjak hranjivih tvari može uzrokovati nepravilni razvoj biljke te može biti i jedan od uzročnika abiotičkog stresa (Gill i Tuteja, 2010). Kako bi se dobio uvid u količine hranjivih tvari, odabranim stablima male i značajne osutosti odredile su se njihove količine (N, P, K, S, C, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu). U odabranim stablima na ispitivanim ploham, većina elemenata

je bila u optimalnom, dostatnom rasponu. Značajne razlike utvrđene u opskrbi utvrđene su samo za K za vrstu hrasta crnike, Ca i Zn za vrstu alepskog bora.

Značajne razlike utvrđene između stabala male i značajne osutosti za hrast crniku za elemente K, Fe i Mn. Sva tri elementa su vrlo bitna u procesu fotosinteze te nije iznenađujuće da je razlika uočena baš za ove elemente s obzirom da su značajno manje količine Chl-a i Chl-b te, posljedično, za Chl-tot utvrđene u značajno osutim u usporedbi sa stablima male osutosti. Pravilni omjeri dostupnih biogenih elemenata vrlo su bitni za neometan razvoj biljke. Uslijed raznih vanjskih utjecaja, moguće je da dođe do neravnoteže, a posljedice mogu biti manji rast, kloroza, nekroza ili, u krajnjem slučaju, smrt biljke (Cotrozzi i sur., 2017; Proietti i sur., 2016; Taiz i sur., 2015). Kalij, prisutan u biljkama kao ion K^+ , ima vrlo bitnu ulogu u stanici kao regulator osmotskog potencijala. Također, ima bitnu ulogu u aktivaciji enzima koji su uključeni u stanično disanje i fotosintezu. Istraživanje hrasta crnike u Španjolskoj pokazalo je važnost kalija u lišću, osobito ljeti kada se njegova koncentracija značajno povećala tijekom ljeta i ljetnih suša u odnosu na proljeće (Rivas-Ubach i sur., 2014). Kalij je bitan element jer sudjeluje u regulaciji vode u biljci kontrolirajući osmozu i regulirajući otvaranje i zatvaranje puči što je vrlo bitno tijekom ljetnih mjeseci u mediteranskoj regiji (Rivas-Ubach i sur., 2014). Željezo (Fe) ima bitnu ulogu jer je sastavni dio enzima koji su uključeni u prijenos elektrona (redoks reakcije). Željezo je sastavni dio procesa biosinteze klorofila, fotosinteze, disanja, fiksacije elementarnog dušika, redukcije nitrita i metabolizma ugljikohidrata. Mangan (Mn) ima značajnu ulogu u aktivnosti enzima u stanici i utječe na sintezu kloroplasta u biljkama. Nedostatak mangana javlja se u vapnenim i alkalnim tlima koja su karakteristična u mediteranskoj regiji (Taiz i sur., 2015). Ne iznenađuje da su količine Mn u ovom istraživanju bile u nedostatnoj količini na plohama alepskog i crnog bora s obzirom da rastu na alkalnom vapnenom tlu. Nadalje, u istraživanju na sadnicama topole (*Populus maximoviczii* Henry × *Populus berolinensis* Dippel) utvrđeno je da se dodatkom dušika povećava osjetljivost biljke na ozon, tj. smanjuje se kritična razina ozona koju topola može neutralizirati, a da pritom ne nastane oštećenje (Zhang i sur., 2018a). Dodavanje fosfora rezultiralo je povećanjem biomase topola i povećanjem kritične razine ozona, ali samo u slučaju kada je količina dušika bila mala (Zhang i sur., 2018b). U istraživanju na vrsti perzijskog hrasta (*Quercus brantii* Lindl.), ispitano je kako svojstva tla utječu na stabla podijeljena u kategorije po osutosti, 0-10 %, 10-25 %, >25 % i 100 %. U uzorkovanom lišću, utvrđeno je da se količina Ca u listu povećava s povećanjem osutosti, a omjer N/P smanjuje. Omjer N/P opadao je s povećanjem odumiranja (Azim Nejad i sur., 2021). Slično je uočeno u ovom ispitivanju za vrste hrasta medunca i crnog bora gdje su

utvrđene značajno veće količine P u stablima značajne osutosti u odnosu na stabla male osutosti. Kalcij je povezan s procesima poput diobe stanica, stabilnošću stanice i propusnošću staničnih membrana (Bhatla i Lal, 2018). Tijekom sušnog razdoblja, dioba stanica i rast lišća se smanjuje zbog smanjenog staničnog turgora. Dolazi i do smanjenje stope fotosinteze jer je tijekom suše ograničen unos CO₂, što naknadno ograničava rast listova (Nejad i sur., 2021). Dakle, zbog povećanja osutosti, preostali zeleni listovi stabala u kategorijama s većim stupnjem osutosti apsorbiraju veću količinu kalcija za obavljanje vitalnih aktivnosti kao što je fotosinteza. U ovom istraživanju to bi se moglo primijeniti na vrstu hrasta medunca i alepski bor za stabla male osutosti kao mehanizam obrane. S obzirom da je na obje plohe utvrđena prosječna osutost >40 % moguće je da su i stabla male osutosti pod stresom zbog okolišnih izvora stresa poput utvrđenih visokih koncentracija ozona i velike količine dušikovih i kiselih spojeva koje su prispjele u 2019. godini.

Iako rezultati pokazuju uglavnom optimalne količine hranjivih tvari, razni čimbenici utječu na otpornost ispitivanih vrsta i na njihovu količinu te se nedostatak hranjivih tvari ne može smatrati kao potencijalni uzročnik stresa u ispitivanim vrstama.

Biljka zbog raznih vanjskih utjecaja (biotičkih i abiotičkih) može doći u stanje oksidativnog stresa, a onečišćujuće tvari iz zraka su jedni od glavnih abiotičkih čimbenika koji uzrokuju oksidativni stres u šumskim ekosustavima. Postojanje razlike bilo je i za očekivati budući da se radi o četiri različite vrste. Prateći biokemijske pokazatelje oksidativnog stresa moguće je utvrditi nalazi li se stablo u stanju stresa i prije nego nastupi vizualno oštećenje. Biokemijske promjene javljaju se prije morfoloških i anatomskih promjena što ih čini korisnijima za rana upozorenja na stanje ekosustava (Sharma i sur., 2012). U ovom istraživanju, jedino se enzim APX može smatrati indikatorom oksidativnog stresa budući da su značajne razlike u stablima male osutosti utvrđene samo za ovaj enzim.

Ovo istraživanje pružilo je po prvi puta nove podatke i saznanja o utjecajima atmosferskog onečišćenja zraka na biogeokemijske cikluse elemenata u mediteranskim šumskim ekosustavima. Rezultati istraživanja pružaju informacije o ionima prispjelim atmosferskim taloženjem u odabrane šumske ekosustave, zdravstvenom statusu odabranih mediteranskih šumskih vrsta. Također, pruža informacije o uzročno-posljedičnim vezama između fizioloških parametara stabala i atmosferskih unosa i okolišnih parametara. Ovo istraživanje po prvi pruža i informacije o statusu biokemijskih pokazatelja oksidativnog stresa odabranih šumskih vrsta uzrokovanih oksidativnim stresom.

6. ZAKLJUČCI

Ovi rezultati su osobito bitni za hrast medunac i crni bor, koji nisu često istraživani u europskoj mediteranskoj regiji osobito u terenskim uvjetima.

1. Procijenjena atmosferska taloženja pokazala su najveće količine iona u šumi hrasta crnike. Na svim plohama, opterećenje dušikovim spojevima bila su blizu vrijednosti kritičnog opterećenja. Također, utvrđeno je opterećenje kiselim spojevima na svim plohama.
2. Koncentracije ozona na sve četiri plohe bile su blizu ili dosegnule 100 ppb, gornju vjerodostojnu granicu za pasivno praćenje ozona. Parametri akumuliranog ozona (parametri AOT40_{dir}, AOT40_{ICP} i AOT40_{pheno}) na svim plohama prešli su vrijednosti za očuvanje šuma. Parametri AOT40 bili su veći na plohama hrasta crnike i crnog bora nego na plohama hrasta medunca i alepskog bora. S druge strane, najveće vrijednosti fitotoksičnog ozona (PODY) utvrđene su na plohi crnog bora, a najniže na plohi hrasta crnike. Ipak, ove vrijednosti nisu premašile kritične razine fitotoksičnog ozona (PODY) predložene za zaštitu šuma.
3. Ispitivanjem odnosa okolišnih varijabli i pokazatelja zdravstvenog stanja šuma (osutost i prirast) utvrdilo se da je osutost značajno povezana sa sadržajem vode u tlu na različitim dubinama, dok je prirast bio pozitivno i negativno povezan sa sunčevim zračenjem i vlagom te pozitivno povezan sa svim parametrima ozona. RFA analize naglasile su da su AOT40_{pheno} i AOT40_{dir} bili najvažniji prediktori koji utječu na rast stabala hrasta medunca i hrasta crnike, dok je POD0 bio za crni bor.
4. Najmanja osutost utvrđena je na plohi hrasta crnike s <10 % dok je na ostale tri bila >40 %. U usporedbi s prosječnom procijenjenom defolijacije, vidljivo je da ploha s nižim BAI% (šuma hrasta crnike i šuma crnog bora) imaju manju defolijaciju, što može biti posljedica različitih vrsta drveća koje se uzimaju u obzir.
5. Prema rezultatima analiza hranjivih tvari u tlu i lišću i iglicama na odabranim plohama, vidljivo je da se kod većine ispitivanih vrsta maseni udjeli elemenata nalaze u optimalnom rasponu, izuzev fosfora u tlu na svim plohama izuzev plohe alepskog bora u 2019. kada je utvrđena osrednja opskrbljenost. Zaključuje se da nije došlo do značajnih promjena u kemiji tla i lišću i iglicama te da hranjive tvari nisu izvor neravnoteže ispitivanih vrsta.
6. Unatoč raznim izvorima stresa u mediteranskoj regiji (visoke temperature, visoke koncentracije ozona, mala količina kiše tijekom ljeta, intenzivno sunčevo zračenje,

salinitet) na ispitivanim vrstama nisu uočena vidljiva oštećenja. Međutim, iako nisu uočena vidljiva oštećenja, povećane koncentracije ozona mogu dovesti do oštećenja na staničnoj razini. Tada se biljka nalazi u stanju stresa te postaje podložnija utjecajima ostalih abiotičkih i biotičkih faktora.

7. Utvrđene su manje količine klorofila u hrastovim vrstama u značajno osutim stablima, dok je za borove vrste utvrđeno suprotno. Moguće je da borovi zbog manjka lisne površine usmjeravaju energiju u sintezu klorofila kako bi nadoknadili taj gubitak.
8. Prisutnost raznih izvora stresa utjecao je na sintezu H_2O_2 što se odrazilo na prisutnost lipidne peroksidacije u svim vrstama. Za crni bor nije utvrđena razlika među stablima. S obzirom na prisutnost reaktivnih čestica uslijed stresnih uvjeta prisutnih na terenu, sve vrste imale su aktivirane antioksidativni obrambeni mehanizam.
9. Prema dobivenim rezultatima, za ispitivane vrste jedino aktivacija enzima APX mogla bi se smatrati kao indikatorom stresa (izuzev hrasta crnike za koji nije utvrđena značajna razlika ni za jedan enzim). Njegovim utvrđivanjem moglo bi se utvrditi nalazi li se biljka pod stresom i prije nego nastupi vizualno oštećenje.
10. Zbog malog broja istraživanja na terenu te zbog mnogobrojnih varijabli koje mogu istovremeno djelovati na biljku i uzrokovati stres, teško je donijeti zaključak koji su sve faktori utjecali na aktivaciju obrambenih mehanizama ispitivanih vrsta te su ovakva istraživanja vrlo poželjna. Praćenjem istovremeno većeg broja okolišnih varijabli moglo bi dati uvid u ponašanje pojedine vrste na vanjske utjecaje.
11. Zaključuje se da je važno nastaviti s istraživanjem utjecaja atmosferskoga taloženja i ozona na mediteranske šume jer rezultat dugoročnih istraživanja imaju veći značaj od kratkoročnih. U tom kontekstu, ovim istraživanjem htjela se istaknuti važnost epidemioloških istraživanja u terenskim uvjetima na Mediteranu koja prate atmosferska taloženja i ozon u odnosu s pokazateljima zdravstvenog stanja šuma za bolje razumijevanje njegovog utjecaja na mediteranske vrste. Prikupljanjem takvih podataka omogućuje ekolozima i šumarima da koriste podatke za razne modele, proučavaju složene interakcije te procjenjuju buduće strategije gospodarenja šumama.
12. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na potrebu duljeg i detaljnijeg proučavanja mediteranskih šumskih ekosustava istočne obale Jadrana.

7. LITERATURA

Agathokleous, E., Feng, Z., Oksanen, E., Sicard, P., Wang, Q., Saitanis, C. J., Araminiene, V., Blande, J. D., Hayes, F., Calatayud, V., Domingos, M., Veresoglou, S. D., Peñuelas, J., Wardle, D. A., De Marco, A., Li, Z., Harmens, H., Yuan, X., Vitale, M., Paoletti, E. (2020) Ozone affects plant, insect, and soil microbial communities: A threat to terrestrial ecosystems and biodiversity. *Science Advances* **6**, 1-17.

<https://doi.org/10.1126/sciadv.abc1176>

Agathokleous, E., Feng, Z., Peñuelas, J. (2020) Chlorophyll hormesis: Are chlorophylls major components of stress biology in higher plants? *Sci. Total Environ.* **726**, 138637.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138637>

Aguillaume, L. (2016) The deposition of nitrogen in Mediterranean holm oaks: loads and indicators. *ECOSISTEMAS* **25**, 110–113.

Aguillaume, L., Izquieta-Rojano, S., García-Gómez, H., Elustondo, D., Santamaría, J. M., Alonso, R., Avila, A. (2017) Dry deposition and canopy uptake in Mediterranean holm-oak forests estimated with a canopy budget model: A focus on N estimations. *Atmos. Environ.* **152**, 191–200.

<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.12.038>

Aguillaume, L., Rodrigo, A., Avila, A. (2016) Long-term effects of changing atmospheric pollution on throughfall, bulk deposition and streamwaters in a Mediterranean forest. *Sci. Total Environ.* **544**, 919–928.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.017>

Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D. D., Hogg, E. H. (Ted), Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S. W., Semerci, A., Cobb, N. (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecol. Manag.* **259**,

660–684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>

Alonso, R., Elvira, S., Castillo, F. J., Gimeno, B. S. (2001) Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Environ.* **24**, 905–916.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00738.x>

Alonso, R., Elvira, S., González-Fernández, I., Calvete, H., García-Gómez, H., Bermejo, V. (2014) Drought stress does not protect *Quercus ilex* L. from ozone effects: results from a comparative study of two subspecies differing in ozone sensitivity. *Plant Biol.* **16**, 375–384. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/plb.12073>

Ambriović-Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007) *Metode u molekularnoj biologiji*, 1. izd., Institut Ruđer Bošković, Zagreb. <http://library.foi.hr/lib/knjiga.php?B=31&sqlx=96077&H=>

Anatolaki, C., Tsitouridou, R. (2007) Atmospheric deposition of nitrogen, sulfur and chloride in Thessaloniki, Greece. *Atmos. Res* **85**, 413–428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2007.02.010>

Anav, A., De Marco, A., Friedlingstein, P., Savi, F., Sicard, P., Sitch, S., Vitale, M., Paoletti, E. (2019) Growing season extension affects ozone uptake by European forests. *Sci. Total Environ.* **669**, 1043–1052. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.020>

Anav, A., Liu, Q., De Marco, A., Proietti, C., Savi, F., Paoletti, E., Piao, S. (2017) The role of plant phenology in stomatal ozone flux modeling. *Glob. Change Biol.* **24**, 235–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.13823>

Anav, A., De Marco, A., Proietti, C., Alessandri, A., Dell'Aquila, A., Cionni, I., Friedlingstein, P., Khvorostyanov, D., Menut, L., Paoletti, E., Sicard, P., Sitch, S., Vitale, M. (2016) Comparing concentration-based (AOT40) and stomatal uptake (PODY) metrics for ozone risk assessment to European forests. *Glob. Change Biol.* **22**, 1608–1627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.13138>

Araminienė, V., Sicard, P., Anav, A., Agathokleous, E., Stakėnas, V., De Marco, A., Varnagirytė-Kabašinskienė, I., Paoletti, E., Girgždienė, R. (2019) Trends and inter-relationships of ground-level ozone metrics and forest health in Lithuania. *Sci. Total Environ.* **658**, 1265–1277. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.092>

Araujo, T. G., Souza, M. F. L., De Mello, W. Z., Da Silva, D. M. L. (2015) Bulk

Atmospheric Deposition of Major Ions and Dissolved Organic Nitrogen in the Lower Course of a Tropical River Basin, Southern Bahia, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 1692–1701. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150143>

Avila, A., Molowny-Horas, R., Gimeno, B. S., Peñuelas, J. (2010) Analysis of Decadal Time Series in Wet N Concentrations at Five Rural Sites in NE Spain. *Water Air Soil Poll.* **207**, 123–138. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0124-7>

Azim Nejad, Z., Badehian, Z., Rezaei Nejad, A., Bazot, S. (2021) Do soil properties and ecophysiological responses of oak (*Quercus brantii* Lindl.) correlate with the rate of dieback? *Trees* **35**, 1639–1650. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02142-7>

Balestrini, R., Arisci, S., Brizzio, M. C., Mosello, R., Rogora, M., Tagliaferri, A. (2007) Dry deposition of particles and canopy exchange: Comparison of wet, bulk and throughfall deposition at five forest sites in Italy. *Atmos. Environ.* **41**, 745–756. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.09.002>

Bergmann, L., Möhrle, R., Bernhardt, R., Chandy, K. M., Reiser, M., Grant, R., Guide, G. D. D., Hansen, H. R., Schröder, K. T., Weihe, H. J. (1980) Benutzertreffen Buchbesprechungen. *Gen* **50**, 27.

Bhatla, S. C., Lal, M. A. (2018) *Plant physiology, development and metabolism* Springer.

Bobbink, R., Hettelingh, J. P. (2011) Effects of nitrogen deposition on woodland, forest and other wooded land (EUNIS class G). *Review and Revision of Empirical Critical Loads and Dose–Response Relationships. RIVM Report 680359002*, 135–171.

Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinderby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.-W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L., De Vries, W. (2010) Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: a synthesis. *Ecol. Appl.* **20**, 30–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1890/08-1140.1>

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Brang, P. (1998) *Sanasilva-Bericht 1997*.

Braun, S., Schindler, C., Rihm, B. (2020) Foliar Nutrient Concentrations of European Beech in Switzerland: Relations With Nitrogen Deposition, Ozone, Climate and Soil Chemistry. *Front. For. Glob. Change* **3**, 33.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/ffgc.2020.00033>

Breiman, L., Cutler, A. (2003) Random Forests. Version 4.0.

<https://www.stat.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/>.

Büker, P., Feng, Z., Uddling, J., Briolat, A., Alonso, R., Braun, S., Elvira, S., Gerosa, G., Karlsson, P. E., Le Thiec, D., Marzuoli, R., Mills, G., Oksanen, E., Wieser, G., Wilkinson, M., Emberson, L. D. (2015) New flux based dose–response relationships for ozone for European forest tree species. *Environ. Pollut.* **206**, 163–174.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.06.033>

Burbano- Garcés, M. L., Figueroa-Casas, A., Peña, M. (2014) Bulk precipitation, throughfall and stemflow deposition of N-NH₄⁺, N-NH₃ and N-NO₃⁻ in an Andean forest. *J. Trop. For. Sci.* **26**, 446–457. <http://www.jstor.org/stable/43150931>

Calatayud, V., Cerveró, J., Calvo, E., García-Breijo, F.-J., Reig-Armiñana, J., Sanz, M. J. (2011) Responses of evergreen and deciduous *Quercus* species to enhanced ozone levels. *Environ. Pollut.* **159**, 55–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.09.024>

Camarero, J. J., Olano, J. M., Parras, A. (2010) Plastic bimodal xylogenesis in conifers from continental Mediterranean climates. *New Phytol.* **185**, 471–480.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03073.x>

Carnicer, J., Coll, M., Ninyerola, M., Pons, X., Sánchez, G., Peñuelas, J. (2011) Widespread crown condition decline, food web disruption, and amplified tree mortality with increased climate change-type drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 1474 – 1478. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010070108>

Clark, C. M., Bai, Y., Bowman, W. D., Cowles, J. M., Fenn, M. E., Gilliam, F. S., Phoenix, G. K., Siddique, I., Stevens, C. J., Sverdrup, H. U., Throop, H. L. (2013) Nitrogen Deposition and Terrestrial Biodiversity. U: Encyclopedia of Biodiversity (Levin, S., ured.) Academic Press, str. 519–536. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719->

5.00366-X

Clark, C. M., Cleland, E. E., Collins, S. L., Fargione, J. E., Gough, L., Gross, K. L., Pennings, S. C., Suding, K. N., Grace, J. B. (2007) Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment. *Ecol. Lett.* **10**, 596–607.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01053.x>

Clarke, N., Zlindra, D., Ulrich, E., Mosello, R., Derome, J., Derome, K., König, N., Lövblad, G., Draaijers, G. P. J., Hansen, K. (2020) Part XIV: Sampling and analysis of deposition. U: *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests and analysis of the effects of air pollution on forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 34 p. + Annex [<http://www.icpforests.org/Manual.htm>]

CLRTAP (2017) Mapping critical levels for vegetation, chapter III. U: *Manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads and levels and air pollution effects, risks and trends*. CLRTAP - Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, UNECE. http://icpmapping.org/Publications_CLRTAP. Pristupljeno 11. siječnja 2022.

Contran, N., Günthardt-Goerg, M. S., Kuster, T. M., Cerana, R., Crosti, P., Paoletti, E. (2013) Physiological and biochemical responses of *Quercus pubescens* to air warming and drought on acidic and calcareous soils. *Plant Biol.* **15**, 157–168.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00627.x>

Cools, N., De Vos, B. (2020) Part X: Sampling and Analysis of Soil. U: *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 29 p + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>]

Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Guidi, L., Landi, M., Lorenzini, G., Massai, R., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Vernieri, P., Nali, C. (2017) Losing the Warning Signal: Drought Compromises the Cross-Talk of Signaling Molecules in *Quercus ilex* Exposed to Ozone. *Front. Plant Sci* **8**, 1020.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01020>

Cotrozzi, L., Remorini, D., Pellegrini, E., Landi, M., Massai, R., Nali, C., Guidi, L.,

Lorenzini, G. (2016) Variations in physiological and biochemical traits of oak seedlings grown under drought and ozone stress. *Physiol. Plantarum* **157**, 69–84.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppl.12402>

De Marco, A., Sicard, P., Feng, Z., Agathokleous, E., Alonso, R., Araminiene, V., Augustaitis, A., Badea, O., Beasley, J. C., Branquinho, C., Bruckman, V. J., Collalti, A., David-Schwartz, R., Domingos, M., Du, E., Garcia Gomez, H., Hashimoto, S., Hoshika, Y., Jakovljevic, T., Paoletti, E. (2022) Strategic roadmap to assess forest vulnerability under air pollution and climate change. *Glob. Change Biol.* **28**, 5062-5085.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.16278>

De Marco, A., Proietti, C., Anav, A., Ciancarella, L., D'Elia, I., Fares, S., Fornasier, M. F., Fusaro, L., Gualtieri, M., Manes, F., Marchetto, A., Mircea, M., Paoletti, E., Piersanti, A., Rogora, M., Salvati, L., Salvatori, E., Screpanti, A., Vialetto, G., Leonardi, C. (2019) Impacts of air pollution on human and ecosystem health, and implications for the National Emission Ceilings Directive: Insights from Italy. *Environ. Int.* **125**, 320–333.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.064>

De Marco, A., Vitale, M., Popa, I., Anav, A., Badea, O., Silaghi, D., Leca, S., Screpanti, A., Paoletti, E. (2017) Ozone exposure affects tree defoliation in a continental climate. *Sci. Total Environ.* **596–597**, 396–404.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.135>

De Marco, A., Sicard, P., Fares, S., Tuovinen, J.-P., Anav, A., Paoletti, E. (2016). Assessing the role of soil water limitation in determining the Phytotoxic Ozone Dose (PODY) thresholds. *Atmos. Environ.* **147**, 88–97.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.09.066>

De Marco, A., Proietti, C., Cionni, I., Fischer, R., Screpanti, A., Vitale, M. (2014) Future impacts of nitrogen deposition and climate change scenarios on forest crown defoliation. *Environ. Pollut.* **194**, 171–180.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.027>

De Marco, A., Screpanti, A., Attorre, F., Proietti, C., Vitale, M. (2013) Assessing ozone and nitrogen impact on net primary productivity with a Generalised non-Linear Model. *Environ. Pollut.* **172**, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.015>

- de Vries, W., Dobbertin, M. H., Solberg, S., van Dobben, H. F., Schaub, M. (2014) Impacts of acid deposition, ozone exposure and weather conditions on forest ecosystems in Europe: an overview. *Plant and Soil* **380**, 1–45. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2056-2>
- de Vries, W., Vel, E., Reinds, G. J., Deelstra, H., Klap, J. M., Leeters, E. E. J. M., Hendriks, C. M. A., Kerkvoorden, M., Landmann, G., Herkendell, J., Hausmann, T., Erisman, J. W. (2003) Intensive monitoring of forest ecosystems in Europe: 1. Objectives, set-up and evaluation strategy. *For. Ecol. Manag.* **174**, 77-95.
- Denamiel, C., Pranić, P., Ivanković, D., Tojčić, I., Vilibić, I. (2021) Performance of the Adriatic Sea and Coast (AdriSC) climate component -- a COAWST V3.3-based coupled atmosphere--ocean modelling suite: atmospheric dataset. *Geosci. Model Dev.* **14**, 3995–4017. <https://doi.org/10.5194/gmd-14-3995-2021>
- Dobbertin, M., Neumann, M., Levanič, T., Sanders, T. G. M., Skudnik M., Krüger, I. (2020) Part V: Tree Growth Level II. U: *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 19 p. + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>]
- EC (2008) Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe. *OJ L/152*, EC – European Commission, Bruxelles, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32008L0050>. Pristupljeno 28. svibnja 2022.
- EEA, 2021. Exposure of forest area to ozone in EEA member countries. EEA -European Environmental Agency, Copenhagen, Denmark. https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/daviz/exposure-of-forest-area-to-7#tab-chart_2. Pristupljeno 21. svibnja 2022.
- EEA, 2020. Rural Concentration of the Ozone Indicator AOT40 for Forest, 2018. EEA - European Environmental Agency, Copenhagen, Denmark. <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/rural-concentration-of-the-ozone-6>. Pristupljeno 21. svibnja 2022.
- EEA, 2019. Rural Concentration of the Ozone Indicator AOT40 for Forest, 2017. EEA - European Environmental Agency, Copenhagen, Denmark <https://www.eea.europa.eu>

eu/data-and-maps/figures/rural-concentration-of-the-ozone-5. Pristupljeno 21. svibnja 2022.

EMEP, 2018. Transboundary particulate matter, photo-oxidants, acidifying and eutrophying components. EMEP Status Report 1/2018, European Monitoring and Evaluation Programme. Norwegian Meteorological Institute, Oslo, Norway https://emep.int/publ/reports/2018/EMEP_Status_Report_1_2018.pdf. Pristupljeno 23. veljače 2022.

Eghdami, H., Werner, W., Büker, P., Sicard, P. (2022) Assessment of ozone risk to Central European forests: Time series indicates perennial exceedance of ozone critical levels. *Environ. Res.* **203**, 111798.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111798>

Eichhorn, J., Roskams, P., Potočić, N., Timmermann, V., Ferretti, M., Mues, V., Szepesi, A., Durrant, D., Seletković, I., Schröck, H., Nevalainen, S., Bussotti, F., Garcia, P., Wulff, S. 2020: Part IV: Visual Assessment of Crown Condition and Damaging Agents. U: *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 49 p. + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>].

Emberson, L. D., Ashmore, M. R., Cambridge, H. M., Simpson, D., Tuovinen, J. P. (2000) Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environ. Pollut.* **109**, 403–413. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00043-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00043-9).

FAO (2018) State of Mediterranean Forests 2018. FAO - Food and agriculture organization of the united nations, Rim. <https://planbleu.org/wp-content/uploads/2018/11/somf2018.pdf>. Pristupljeno 07. travnja 2022.

FAO (2015) World Reference Base for Soil Resources 2014. International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps. FAO - Food and agriculture organization of the united nations, Rim. <http://www.fao.org/3/a-i3794e.pdf>. Pristupljeno 07. travnja 2022.

Ferretti, M., Calderisi, M., Marchetto, A., Waldner, P., Thimonier, A., Jonard, M., Cools, N., Rautio, P., Clarke, N., Hansen, K., Merilä, P., Potočić, N. (2015) Variables related to nitrogen deposition improve defoliation models for European forests. *Ann. For. Sci.* **72**,

897–906. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0445-6>

Ferretti, M., Marchetto, A., Arisci, S., Bussotti, F., Calderisi, M., Carnicelli, S., Cecchini, G., Fabbio, G., Bertini, G., Matteucci, G., de Cinti, B., Salvati, L., Pompei, E. (2014a) On the tracks of Nitrogen deposition effects on temperate forests at their southern European range - an observational study from Italy. *Glob. Change Biol.* **20**, 3423–3438.

<https://doi.org/10.1111/gcb.12552>

Fürst, A., Kowalska, A., Brunialti, G., Clarke, N., Cools, N., De Vos, B., Derome, J., Derome, K., Ferretti, M., Jakovljević, T., König, N., Marchetto, A., Mosello, R., O’Dea, P., Tartari, G., Ulrich, E. (2020) Part XVI: Quality assurance and control in laboratories. U: *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 46 p. + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>].

Fusaro, L., Palma, A., Salvatori, E., Basile, A., Maresca, V., Asadi Karam, E., Manes, F. (2017) Functional indicators of response mechanisms to nitrogen deposition, ozone, and their interaction in two Mediterranean tree species. *PLOS ONE* **12**, e0185836.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185836>

García-Gómez, H., Izquieta-Rojano, S., Aguiillaume, L., González-Fernández, I., Valiño, F., Elustondo, D., Santamaría, J. M., Àvila, A., Bytnerowicz, A., Bermejo, V., Alonso, R. (2018) Joining empirical and modelling approaches to estimate dry deposition of nitrogen in Mediterranean forests. *Environ. Pollut.* **243**, 427–436.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.015>

Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Mishra, P., Sabat, S. C., Tuteja, N. (2015) Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 10375–10394.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4532-5>

Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 909–930.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gottardini, E., Cristofolini, F., Cristofori, A., Pollastrini, M., Camin, F., Ferretti, M.

(2020) A multi-proxy approach reveals common and species-specific features associated with tree defoliation in broadleaved species. *For. Ecol. Manag.* **467**, 118151.

<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118151>

Guada, G., Camarero, J. J., Sánchez-Salguero, R., Cerrillo, R. M. N. (2016a) Limited Growth Recovery after Drought-Induced Forest Dieback in Very Defoliated Trees of Two Pine Species. *Front. Plant Sci.* **7**, 418.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00418>

Guidi, L., Remorini, D., Cotrozzi, L., Giordani, T., Lorenzini, G., Massai, R., Nali, C., Natali, L., Pellegrini, E., Trivellini, A., Vangelisti, A., Vernieri, P., Landi, M. (2017) The harsh life of an urban tree: the effect of a single pulse of ozone in salt-stressed *Quercus ilex* saplings. *Tree Physiol.* **37**, 246–260. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw103>

Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. *Abiotic and biotic stress in plants* (de Oliveira, A., ured.), IntechOpen, London, str. 1-19.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>

HAOP, 2018. Izvješće o praćenju kvalitete zraka na području Republike Hrvatske za 2017. godinu. HAOP - Hrvatska agencija za okoliš i prirodu.

http://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/011_zrak/Izvjesca/Izvj%C5%A1%C4%87e_KZ_2017_final_za%20web.pdf. Pristupljeno 11. siječnja 2022.

HAOP, 2019. Izvješće o praćenju kvalitete zraka na području Republike Hrvatske za 2018. godinu. HAOP - Hrvatska agencija za okoliš i prirodu.

http://www.haop.hr/sites/default/files/uploads/dokumenti/011_zrak/Izvjesca/Godi%C5%A1nje%20izvj%C5%A1%C4%87e%20o%20pra%C4%87enju%20kvalitete%20zraka%20na%20podru%C4%8Dju%20RH%20u%202018.%20godini.pdf. Pristupljeno 11. siječnja 2022.

Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. H. M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. Al, Fujita, M., Fotopoulos, V. (2020) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **9**, 681.

<https://doi.org/10.3390/antiox9080681>

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M., Roychowdhury, R., Fujita, M. (2013)

Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 9643–9684.

Hoshika, Y., Fares, S., Savi, F., Gruening, C., Goded, I., De Marco, A., Sicard, P., Paoletti, E. (2017) Stomatal conductance models for ozone risk assessment at canopy level in two Mediterranean evergreen forests. *Agr. Forest Meteorol.* **234–235**, 212–221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.01.005>

Hoshika, Y., Katata, G., Deushi, M., Watanabe, M., Koike, T., Paoletti, E. (2015) Ozone-induced stomatal sluggishness changes carbon and water balance of temperate deciduous forests. *Sci. Rep.* **5**, 9871. <https://doi.org/10.1038/srep09871>

Izquieta-Rojano, S., García-Gomez, H., Aguilhaume, L., Santamaría, J. M., Tang, Y. S., Santamaría, C., Valiño, F., Lasheras, E., Alonso, R., Àvila, A., Cape, J. N., Elustondo, D. (2016) Throughfall and bulk deposition of dissolved organic nitrogen to holm oak forests in the Iberian Peninsula: Flux estimation and identification of potential sources. *Environ. Pollut.* **210**, 104–112. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.002>

Jakovljević, T., Lovreškov, L., Jelić, G., Anav, A., Popa, I., Fornasier, M. F., Proietti, C., Limić, I., Butorac, L., Vitale, M., De Marco, A. (2021) Impact of ground-level ozone on Mediterranean forest ecosystems health. *Sci. Total Environ.* **783**, 147063. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147063>

Jakovljević, T., Marchetto, A., Berković, K., Roša, J., Potočki, A. (2013) Atmospheric deposition measurement in the lowland forest ecosystem of Pokupsko basin in Croatia. *Period. Biol.* **115**, 363-370.

Jakovljević, T., Marchetto, A., Lovreškov, L., Potočić, N., Seletković, I., Indir, K., Jelić, G., Butorac, L., Zgrablić, Ž., De Marco, A., Simioni, G., Ognjenović, M., Jurinjak Tušek, A. (2019) Assessment of Atmospheric Deposition and Vitality Indicators in Mediterranean Forest Ecosystems. *Sustainability* **11**, 6805. <https://doi.org/10.3390/su11236805>

Jonard, M., Fürst, A., Verstraeten, A., Thimonier, A., Timmermann, V., Potočić, N., Waldner, P., Benham, S., Hansen, K., Merilä, P., Ponette, Q., de la Cruz, A. C., Roskams, P., Nicolas, M., Croisé, L., Ingerslev, M., Matteucci, G., Decinti, B., Bascietto, M., Rautio, P. (2015) Tree mineral nutrition is deteriorating in Europe. *Glob. Change Biol.* **21**,

418–430. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/gcb.12657>

Karavoltzos, S., Fotiadis, F., Michopoulos, P., Sakellari, A., Plavšić, M., Bourletsikas, A., Kaoukis, K., Thomaidis, N. S., Dassenakis, M., Scoullas, M. (2017) Organic complexation of copper in throughfall and open field bulk deposition: Influence of the tree canopy of Mediterranean forest ecosystems. *Chemosphere* **167**, 28–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.131>

Keresztesi, Á., Birsan, M.-V., Nita, I.-A., Bodor, Z., Szép, R. (2019) Assessing the neutralisation, wet deposition and source contributions of the precipitation chemistry over Europe during 2000–2017. *Environ. Sci. Eur.* **31**, 50. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0234-9>

König, N., Kowalska, A., Brunialti, G., Ferretti, M., Clarke, N., Cools, N., Derome, J., Derome, K., De Vos, B., Fuerst, A., Jakovljević, T., Marchetto, A., Mosello, R., O’Dea, P., Tartari, G. A., Ulrich, E. (2016) Part XVI: Quality Assurance and Control in Laboratories, U: *Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests*. Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 46 p. + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>]

Kowalska, A., Astel, A., Boczoń, A., Polkowska, Ż. (2016) Atmospheric deposition in coniferous and deciduous tree stands in Poland. *Atmos. Environ.* **133**, 145–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.03.033>

Kozłowski, R., Kruszyk, R., Małek, S. (2020) The Effect of Environmental Conditions on Pollution Deposition and Canopy Leaching in Two Pine Stands (West Pomerania and Świętokrzyskie Mountains, Poland). *Forests* **11**, 535. <https://doi.org/10.3390/f11050535>

Landi, M., Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Remorini, D., Tonelli, M., Trivellini, A., Nali, C., Guidi, L., Massai, R., Vernieri, P., Lorenzini, G. (2019) When “thirsty” means “less able to activate the signalling wave triggered by a pulse of ozone”: A case of study in two Mediterranean deciduous oak species with different drought sensitivity. *Sci. Total Environ.* **657**, 379–390. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.012>

Laubhann, D., Sterba, H., Reinds, G. J., De Vries, W. (2009) The impact of atmospheric deposition and climate on forest growth in European monitoring plots: An individual tree

growth model. *For. Ecol. Manag.* **258**, 1751–1761.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.09.050>

Lempereur, M., Martin-StPaul, N. K., Damesin, C., Joffre, R., Ourcival, J.-M., Rocheteau, A., Rambal, S. (2015) Growth duration is a better predictor of stem increment than carbon supply in a Mediterranean oak forest: implications for assessing forest productivity under climate change. *New Phytol.* **207**, 579–590.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.13400>

Loibl, W. (1994) Trend prognosis of the regional maximum ozone concentrations under the influence of temperature 1991 and 1992; Trendprognose der regionalen ozonmaxima unter einbezug der temperaturdaten am beispiel der ozonepisoden. 1991 und 1992.

Umweltbundesamt, Vienna, Austria, str. 67 . <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/195252>.

Lovreškov, L., Limić, I., Butorac, L., Jakovljević, T. (2021) Nitrogen Deposition in Different Mediterranean Forest Types along the Eastern Adriatic Coast. *South-east Eur. For.* **12**, 115–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.15177/see-for.21-15>.

Marabottini, R., Schraml, C., Paolacci, A. R., Sorgona', A., Raschi, A., Rennenberg, H., Badiani, M. (2001) Foliar antioxidant status of adult Mediterranean oak species (*Quercus ilex* L. and *Q. pubescens* Willd.) exposed to permanent CO₂-enrichment and to seasonal water stress. *Environ. Pollut.* **115**, 413–423. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00231-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00231-7)

Martinez del Castillo, E., Prislán, P., Gričar, J., Gryc, V., Merela, M., Giagli, K., de Luis, M., Vavrčík, H., Čufar, K. (2018) Challenges for growth of beech and co-occurring conifers in a changing climate context. *Dendrochronologia* **52**, 1–10.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dendro.2018.09.001>

Matyssek, R., Wieser, G., Ceulemans, R., Rennenberg, H., Pretzsch, H., Haberer, K., Löw, M., Nunn, A. J., Werner, H., Wipfler, P., Obwald, W., Nikolova, P., Hanke, D. E., Kraigher, H., Tausz, M., Bahnweg, G., Kitao, M., Dieler, J., Sandermann, H., Häberle, K.-H. (2010) Enhanced ozone strongly reduces carbon sink strength of adult beech (*Fagus sylvatica*) – Resume from the free-air fumigation study at Kranzberg Forest. *Environ. Pollut.* **158**, 2527–2532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.009>

McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut,

J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., Yezzer, E. A. (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol.* **178**, 719–739. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x)

McMahon, S. M., Parker, G. G. (2015) A general model of intra-annual tree growth using dendrometer bands. *Ecol. Evol.* **5**, 243–254.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.1117](https://doi.org/10.1002/ece3.1117)

Mellert, K. H., Göttelein, A. (2012) Comparison of new foliar nutrient thresholds derived from van den Burg's literature compilation with established central European references. *Eur. J. For. Res.* **131**, 1461–1472. <https://doi.org/10.1007/s10342-012-0615-8>

Mengel, K., Kirkby, E. A. (2012) *Principles of plant nutrition*, 5. izd. Springer Science & Business Media, Nizozemska.

Michel, A., Seidling, W. (2016) Forest Condition in Europe: 2016 Technical Report of ICP Forests. *Report under the UNECE Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution (CLRTAP)*. BFW Dokumentation 23/2016. Vienna: BFW Austrian Research Centre for Forests. str. 206. <https://www.icp-forests.org/pdf/TR2016.pdf>. Pristupljeno: 4. svibnja 2022.

Mills, G., Pleijel, H., Malley, C. S., Sinha, B., Cooper, O. R., Schultz, M. G., Neufeld, H. S., Simpson, D., Sharps, K., Feng, Z., Gerosa, G., Harmens, H., Kobayashi, K., Saxena, P., Paoletti, E., Sinha, V., Xu, X. (2018) Tropospheric Ozone Assessment Report: Present-day tropospheric ozone distribution and trends relevant to vegetation. *Elem. Sci. Anth.* **6**, 47. <https://doi.org/10.1525/elementa.302>

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**, 405–410. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* **9**, 490–498.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>

Monks, P. S., Archibald, A. T., Colette, A., Cooper, O., Coyle, M., Derwent, R., Fowler, D., Granier, C., Law, K. S., Mills, G. E., Stevenson, D. S., Tarasova, O., Thouret, V., von

- Schneidmesser, E., Sommariva, R., Wild, O., Williams, M. L. (2015) Tropospheric ozone and its precursors from the urban to the global scale from air quality to short-lived climate forcer. *Atmos. Chem. Phys.* **15**, 8889–8973. <https://doi.org/10.5194/acp-15-8889-2015>
- Mosello, R., Brizzio, M. C., Kotzias, D., Marchetto, A., Rembges, D., Tartari, G. (2002) The chemistry of atmospheric deposition in Italy in the framework of the National Programme for Forest Ecosystems Control (CONECOFOR). *J. Limnol.* **61**, 77–92. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2002.s1.77>
- Musselman, R. C., Lefohn, A. S., Massman, W. J., Heath, R. L. (2006) A critical review and analysis of the use of exposure- and flux-based ozone indices for predicting vegetation effects. *Atmos. Environ.* **40**, 1869–1888. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.10.064>
- Muzyło, A., Llorens, P., Domingo, F. (2012) Rainfall partitioning in a deciduous forest plot in leafed and leafless periods. *Ecohydrology* **5**, 759–767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/eco.266>
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**, 853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Ochoa-Hueso, R., Allen, E. B., Branquinho, C., Cruz, C., Dias, T., Fenn, M. E., Manrique, E., Pérez-Corona, M. E., Sheppard, L. J., Stock, W. D. (2011) Nitrogen deposition effects on Mediterranean-type ecosystems: An ecological assessment. *Environ. Pollut.* **159**, 2265–2279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.12.019>
- Ogawa, 2001. Protocol for ozone measurement using the ozone passive sampler badge. Harvard School of Public Health Environmental Science and Engineering Program Department of Environmental Health 665 Huntington Avenue Boston, MA 02115, USA. str. 1–15. <http://ogawausa.com/wp-content/uploads/2014/04/proozone.pdf>.
- Pacyna, J. M. (2008) Atmospheric Deposition. U: *Encyclopedia of Ecology* (Jørgensen S. E., Fath. B. D., ured.), Academic Press, SAD, str. 275–285. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00258-5>

- Paoletti, E. (2006) Impact of ozone on Mediterranean forests: a review. *Environ. Pollut.* **144**, 463–474. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.051>
- Paoletti, E., Alivernini, A., Anav, A., Badea, O., Carrari, E., Chivulescu, S., Conte, A., Ciriani, M. L., Dalstein-Richier, L., De Marco, A., Fares, S., Fasano, G., Giovannelli, A., Lazzara, M., Leca, S., Materassi, A., Moretti, V., Pitar, D., Popa, I., Sabatini, F., Salvati, L., Sicard, P., Sorgi, T., Hoshika, Y. (2019) Toward stomatal–flux based forest protection against ozone: The MOTTLES approach. *Sci. Total Environ.* **691**, 516–527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.525>
- Paoletti, E., De Marco, A., Anav, A., Gasparini, P., Pompei, E. (2018) Five-year volume growth of European beech does not respond to ozone pollution in Italy. *Environ. Sci. Pollut. R.* **25** (9), 8233–8239. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9264-2>
- Pellegrini, E., Hoshika, Y., Dusart, N., Cotrozzi, L., Gérard, J., Nali, C., Vaultier, M.-N., Jolivet, Y., Lorenzini, G., Paoletti, E. (2019) Antioxidative responses of three oak species under ozone and water stress conditions. *Sci. Total Environ.* **647**, 390–399. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.413>
- Pernar, N., Vrbek, B., Bakšić, D. (2011) Tlo. In S. Matić (Ed.), *Šume hrvatskog Sredozemlja* (pp. 130–140) Akademija šumarskih znanosti.
- Pernek, M., Novak Agbaba, S., Lacković, N., Dođ, N., Lukić, I., Wirth, S. (2012) Uloga biotičkih čimbenika u sušenju borova (*Pinus* spp.) na području sjeverne Dalmacije. *Šumarski List* **136**, 343–353.
- Polák, T., Rock, B. N., Campbell, P. E., Soukupová, J., Solcová, B., Zvára, K., Albrechtová, J. (2006) Shoot growth processes, assessed by bud development types, reflect Norway spruce vitality and sink prioritization. *For. Ecol. Manag.* **225**, 337–348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.01.027>
- Posch, M., de Vries, W., Sverdrup, H. U. (2015). Mass balance models to derive critical loads of nitrogen and acidity for terrestrial and aquatic ecosystems. U: *Critical Loads and Dynamic Risk Assessments* Springer, Dordrecht, str. 171-205.
- Potočić, N., Seletković, I., Jakovljević, T., Marjanović, H., Indir, K., Medak, J., Ognjenović, M., Zorić, N., Anić, M., Kaliger, A. (2018) Oštećenost šumskih ekosustava

Republike Hrvatske. Izvješće za 2017. godinu. Hrvatski šumarski institut, Jastrebarsko.
http://www.icp.sumins.hr/Izvjesca/O%C5%A1te%C4%87enost_%C5%A1umskih_ekosustava_Republike_Hrvatske_u_2017._godini.pdf

Potočić, N., Seletković, I. (2011) Defoliation of forest trees in Croatia in the period 2006-2009. *Šumar. list* **135**, 149-158.

Poyatos, R., Aguiar, D., Galiano, L., Mencuccini, M., Martínez-Vilalta, J. (2013) Drought-induced defoliation and long periods of near-zero gas exchange play a key role in accentuating metabolic decline of Scots pine. *New Phytol.* **200**, 388–401.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.12278>

Prislan, P., Gričar, J., de Luis, M., Novak, K., Martínez del Castillo, E., Schmitt, U., Koch, G., Štrus, J., Mrak, P., Žnidarič, M. T., Čufar, K. (2016) Annual Cambial Rhythm in *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* as Indicator for Climate Adaptation. *Fronti. Plant Sci.* **7**, 1923. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01923>

Proietti, C., Anav, A., De Marco, A., Sicard, P., Vitale, M. (2016) A multi-sites analysis on the ozone effects on Gross Primary Production of European forests. *Sci. Total Environ.* **556**, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.187>

Prpić, B., Pernar, R., Jurjević, P., Milković, I., Vrebčević, M., Petreš, S. (2011a) Kartiranje općekorisnih funkcija šuma u Sredozemlju. U: *Šume hrvatskog Sredozemlja* (Matić, S., ured.), Akademija Šumarskih Znanosti, Zagreb, str. 288–294.

Prpić, B., Tikvić, I., Idžojtić, M., Seletković, Z. (2011b) Ekološka konstitucija značajnijih vrsta drveća i grmlja. U: *Šume hrvatskog Sredozemlja* (Matić, S., ured.), Akademija Šumarskih Znanosti, Zagreb, str. 245-287.

Rautio, P., Fürst, A., Stefan, K., Rautio, H., Bartels, U. (2020) Part XII: Sampling and analysis of needles and leaves. *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests.* (UNECE ICP Forests Programme Co-ordinating Centre Ed). Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 19.

Rivas-Ubach, A., Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Oravec, M., Mateu-Castell, L., Pérez-Trujillo, M., Parella, T., Ogaya, R., Urban, O., Peñuelas, J. (2014) Drought enhances

folivory by shifting foliar metabolomes in *Quercus ilex* trees. *The New Phytol.* **202**, 874–885. <http://www.jstor.org/stable/newphytologist.202.3.874>

Saunier, A., Ormeño, E., Havaux, M., Wortham, H., Ksas, B., Temime-Roussel, B., Blande, J. D., Lecareux, C., Mévy, J.-P., Bousquet-Mélou, A., Gauquelin, T., Fernandez, C. (2018) Resistance of native oak to recurrent drought conditions simulating predicted climatic changes in the Mediterranean region. *Plant Cell Environ.* **41** (10), 2299–2312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pce.13331>

Schaub, M., Calatayud, V. (2013) Chapter 11 - Assessment of Visible Foliar Injury Induced by Ozone. U: *Forest Monitoring: Methods for terrestrial investigations in Europe with an overview of North America and Asia*. 12. izd. [online] (Ferretti, M., Fischer, R., ured.) Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098222-9.00011-X>

Schaub, M., Calatayud, V., Ferretti, M., Pitar, D., Brunialti, G., Lövblad, G., Krause, G., Sanz, M. J. (2020) Part XV: Monitoring of air quality. U: *Manual on Methods and Criteria for Harmonized Sampling, Assessment, Monitoring and Analysis of the Effects of Air Pollution on Forests*, Thünen Institute of Forest Ecosystems, Eberswalde, Germany, 11 p. + Annex [<http://www.icp-forests.org/manual.htm>]

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* **2012** 217037. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

Sicard, P., Augustaitis, A., Belyazid, S., Calfapietra, C., de Marco, A., Fenn, M., Bytnerowicz, A., Grulke, N., He, S., Matyssek, R., Serengil, Y., Wieser, G., Paoletti, E. (2016a) Global topics and novel approaches in the study of air pollution, climate change and forest ecosystems. *Environ. Pollut.* **213**, 977–987. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.075>

Sicard, P., De Marco, A., Dalstein-Richier, L., Tagliaferro, F., Renou, C., Paoletti, E. (2016b) An epidemiological assessment of stomatal ozone flux-based critical levels for visible ozone injury in Southern European forests. *Sci. Total Environ.* **541**, 729–741. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.113>

Sicard, P., Serra, R., Rossello, P. (2016c) Spatiotemporal trends in ground-level ozone concentrations and metrics in France over the time period 1999–2012. *Environ. Res.* **149**,

122–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.014>

Sicard, P., Dalstein-Richier, L. (2015) Health and vitality assessment of two common pine species in the context of climate change in southern Europe. *Environ. Res.* **137**, 235–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.025>

Sicard, P., De Marco, A., Troussier, F., Renou, C., Vas, N., Paoletti, E. (2013) Decrease in surface ozone concentrations at Mediterranean remote sites and increase in the cities. *Atmos. Environ.* **79**, 705–715.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.07.042>

Šiljković, Ž., Mamut, M. (2016) Forest fires in Dalmatia. *Bull. Geogr. Socio-Econom. Series* **32**, 117–130. <https://doi.org/doi:10.1515/bog-2016-0019>

Skevin-Sovic, J., Djuricic, V., Kosanovic, C. (2012) Major ions wet deposition and trends during the last decade on the eastern Adriatic coast. *WIT Trans. Ecol. Environ.* **157**, 339–349.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.* **35**, 259–270.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02336.x>

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., Murphy, A. (2015) *Plant physiology and development*. (Issue Ed. 6) Sinauer Associates Incorporated.

Takashima, T., Hikosaka, K., Hirose, T. (2004) Photosynthesis or persistence: nitrogen allocation in leaves of evergreen and deciduous *Quercus* species. *Plant, Cell & Environment* **27**, 1047–1054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01209.x>

Uredba (2009) Uredba o emisijskim kvotama za određene onečišćujuće tvari u Republici Hrvatskoj. Prijedlog: Programa postupnog smanjivanja emisija za određene onečišćujuće tvari u Republici Hrvatskoj za razdoblje do kraja 2010. godine s projekcijama emisija za razdoblje od 2010. do 2020. godine. *Narodne novine* **141**, Zagreb.

<https://vlada.gov.hr/UserDocsImages//2016/Sjednice/Arhiva//30-02.pdf>. Pristupljeno 03. veljače 2022.

- Wittig, V. E., Ainsworth, E. A., Naidu, S. L., Karnosky, D. F., Long, S. P. (2009) Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Glob. Change Biol.* **15** (2), 396–424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2008.01774.x>
- Xie, X., He, Z., Chen, N., Tang, Z., Wang, Q., Cai, Y. (2019) The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *Bio Med Res. Int.* **2019**, 9732325. <https://doi.org/10.1155/2019/9732325>
- Zabret, K., Rakovec, J., Šraj, M. (2018) Influence of meteorological variables on rainfall partitioning for deciduous and coniferous tree species in urban area. *Journal of Hydrology* **558**, 29–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2018.01.025>
- Zabret, K., Šraj, M. (2018) Spatial variability of throughfall under single birch and pine tree canopies. *Acta Hydrotechnica* **31** (54), 1–20.
- Zalloni, E., Battipaglia, G., Cherubini, P., Saurer, M., De Micco, V. (2019) Wood Growth in Pure and Mixed *Quercus ilex* L. Forests: Drought Influence Depends on Site Conditions. *Front. Plant Sci.* **10**, 397. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00397>
- Zebec, V., Crnjaković, M., Pernar, N. (2012) Mineraloško-petrološko-geološki aspekt stijenskog supstrata Istre, Primorja i Dalmacije, U: *Šume hrvatskog Sredozemlja* (Matić, S., ured.), Akademija Šumarskih Znanosti, Zagreb, str. 115–129.
- Zhang, L., Hoshika, Y., Carrari, E., Badea, O., Paoletti, E. (2018) Ozone risk assessment is affected by nutrient availability: Evidence from a simulation experiment under free air controlled exposure (FACE). *Environ. Pollut.* **238**, 812–822. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.102>
- Zhang, L., Hoshika, Y., Carrari, E., Cotrozzi, L., Pellegrini, E., Paoletti, E. (2018) Effects of nitrogen and phosphorus imbalance on photosynthetic traits of poplar Oxford clone under ozone pollution. *J. Plant Res.* **131** (6), 915–924. <https://doi.org/10.1007/s10265-018-1071-4>

8. PRILOZI

Prilog 1.

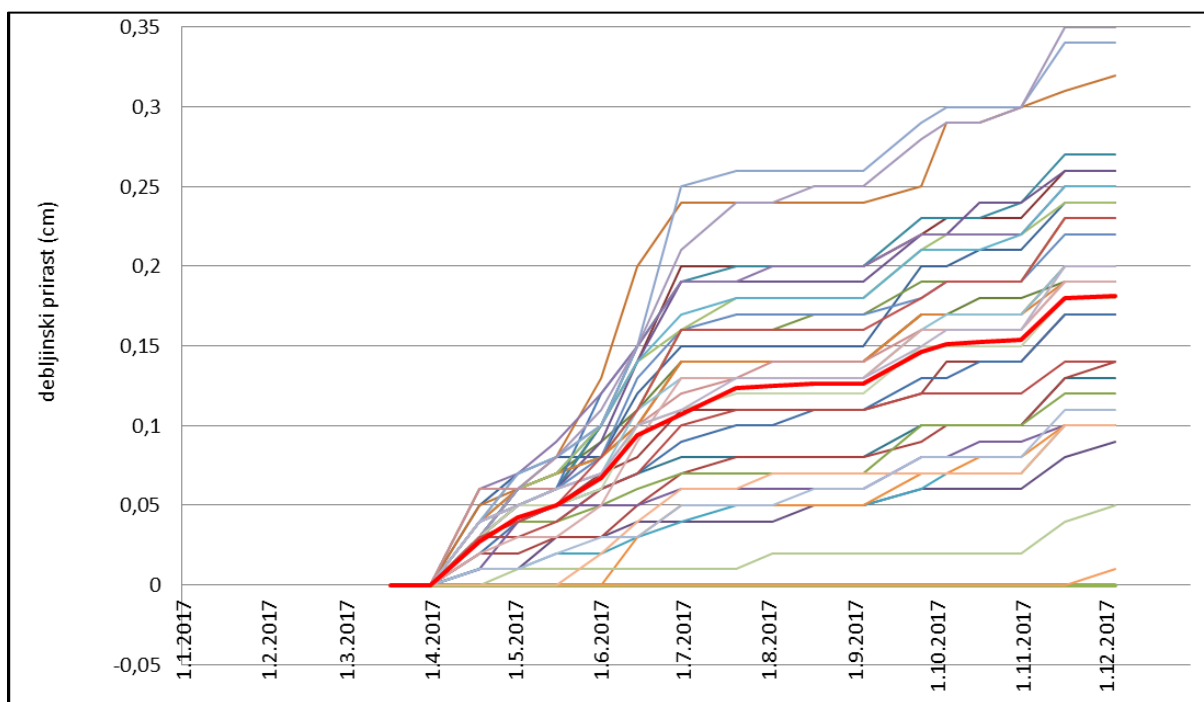
Tablica 1. Popis kratica i simbola

Kratica	Puni naziv
CLRTAP	Konvencija o dalekosežnom prekograničnom onečišćenju zraka
•OH	hidroksilni radikal
¹ O ₂	singlet kisik
AOT40	akumulirani ozon
AOT40 _{dir}	akumulirani ozon izračunat prema Direktivi 2008/50/EC
AOT40 _{ICP}	akumulirani ozon izračunat prema ICP Vegetation-u
AOT40 _{pheno}	akumulirani ozon izračunat prema radu Paoletti i sur., 2019.
APX	askorbat peroksidaza
AsA	askorbat
AsA-GSH	askorbat-glutationa
CAT	katalaza
CH ₄	metan
CO	ugljikov monoksid
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
EEA	Europska agencija za okoliš
EMEP	Program suradnje za praćenje i procjenu daljinskog prijenosa atmosferskog onečišćenja u Europi
GPX	glutation peroksidaza
GSH	reducirani glutacion
GSSG	oksidirani glutacion
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HAOP	Hrvatska agencija za okoliš i prirodu
ICP Forests	Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na šume
ICP Vegetation	Međunarodnog programa za procjenu i motrenje utjecaja zračnog onečišćenja na vegetaciju i usjeve
MDHAR	monodehidroaskorbat reduktaza
NH ₃	amonijak
NO _x	dušikovi oksidi (NO i NO ₂)
O ₂	kisik
O ₂ • ⁻	superoksidni anion

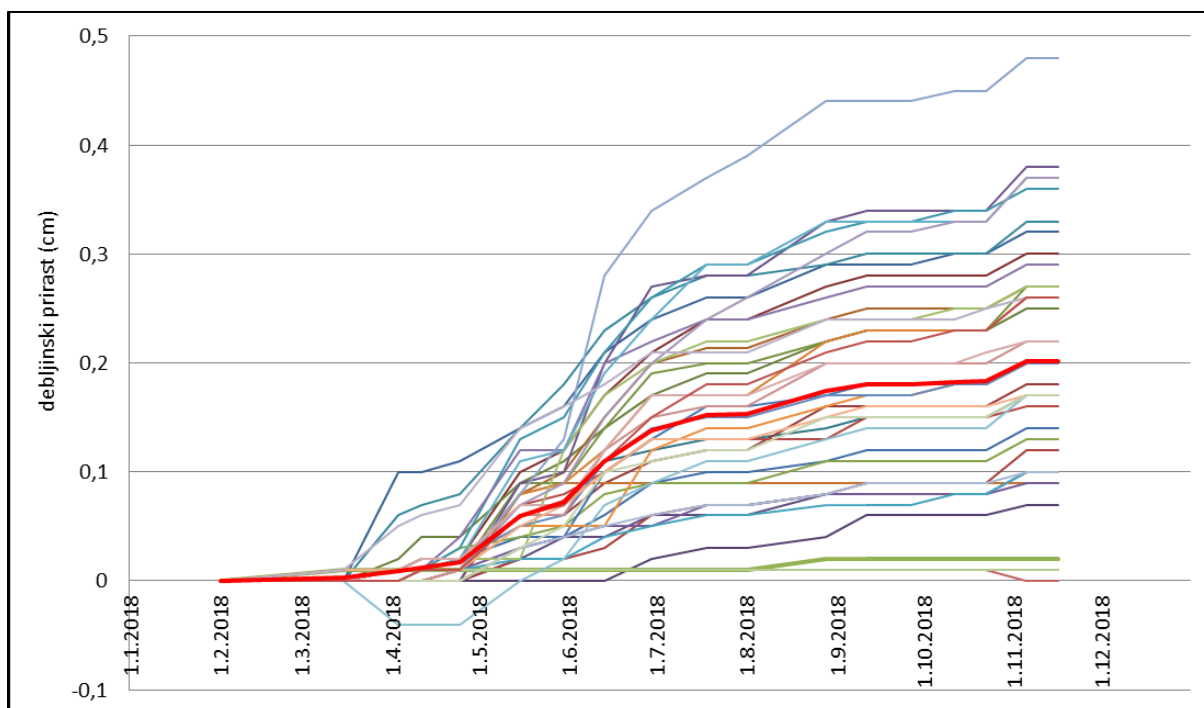
Prilozi

O ₃	ozon
PM	lebdeće čestice
PM ₁₀	lebdeće čestice aerodinamičnog promjera manjeg od 10 µm
PM _{2,5}	lebdeće čestice aerodinamičnog promjera manjeg od 2,5 µm
POD	nespecifična peroksidaza
POD	peroksidaza
POD0	doza fitotoksičnog ozona za prag Y=0
POD1	doza fitotoksičnog ozona za prag Y=1
POD2	doza fitotoksičnog ozona za prag Y=2
PODY	doza fitotoksičnog ozona za prag Y
ROS	Reaktivne kisikove čestice
SO ₂	sumporov dioksid
SOD	superoksid dizmutaza
UNECE	Gospodarska komisija Ujedinjenih naroda za Europu
VOC	hlapljivi organski spojevi

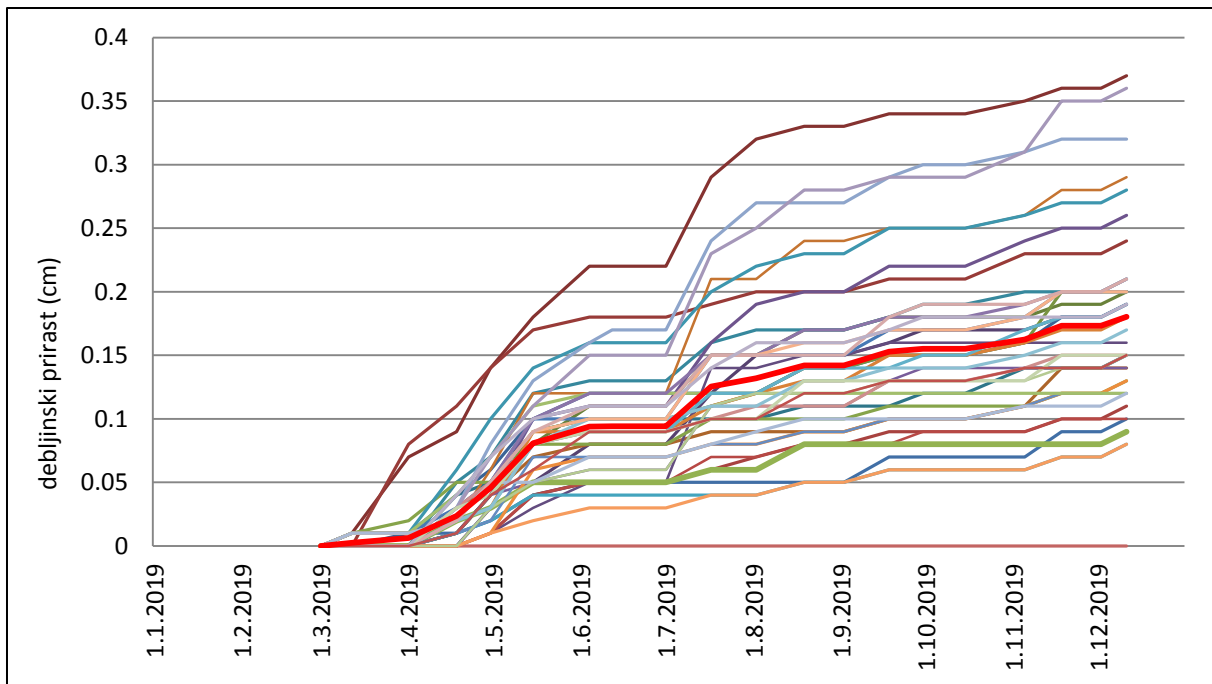
Prilog 2.



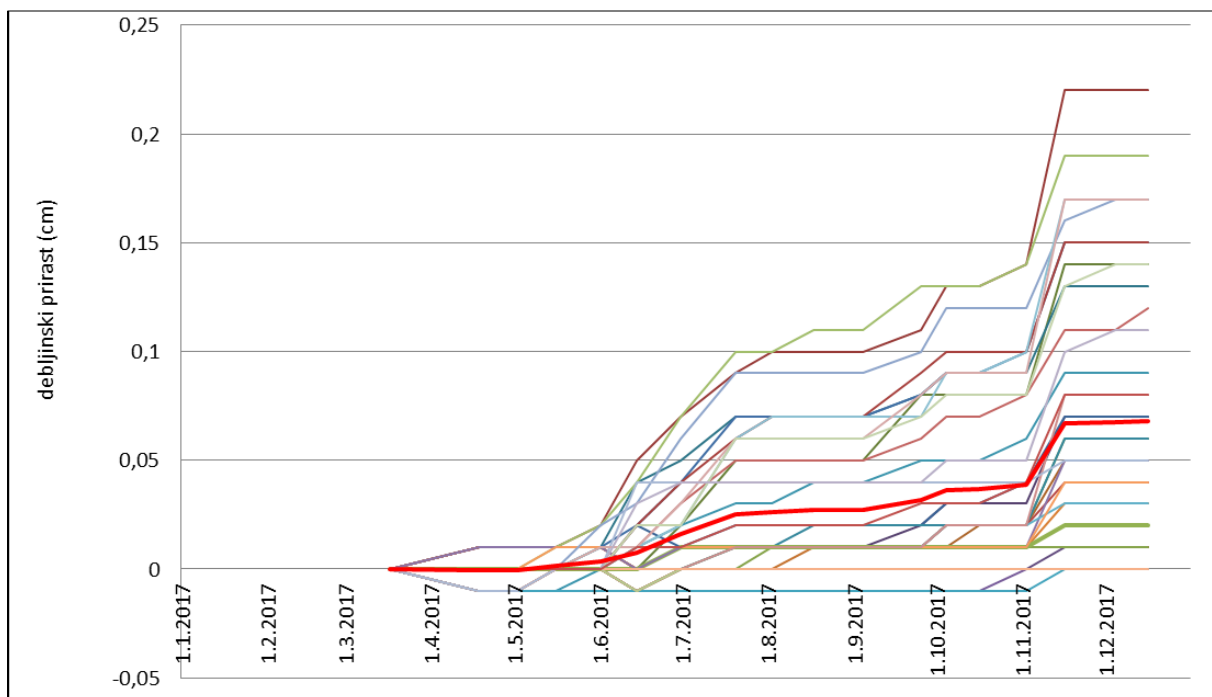
Slika 1. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala hrasta medunca na plohi Poreč u 2017. godini



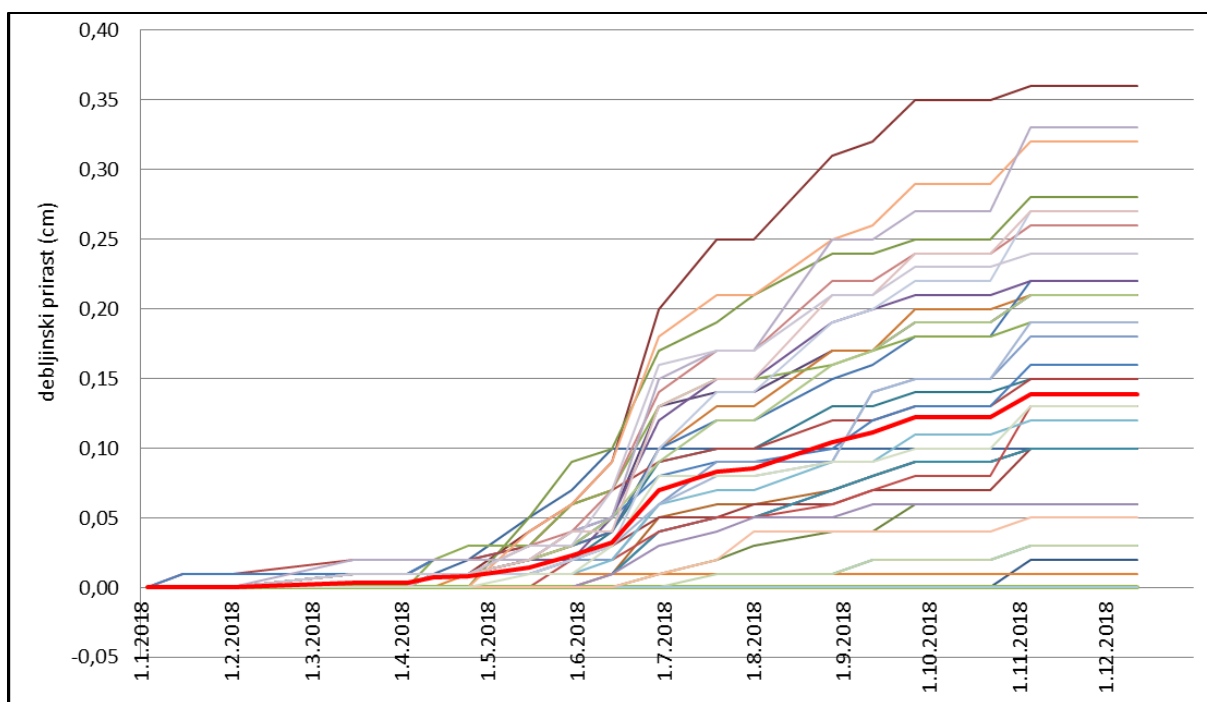
Slika 2. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala hrasta medunca na plohi Poreč u 2018. godini



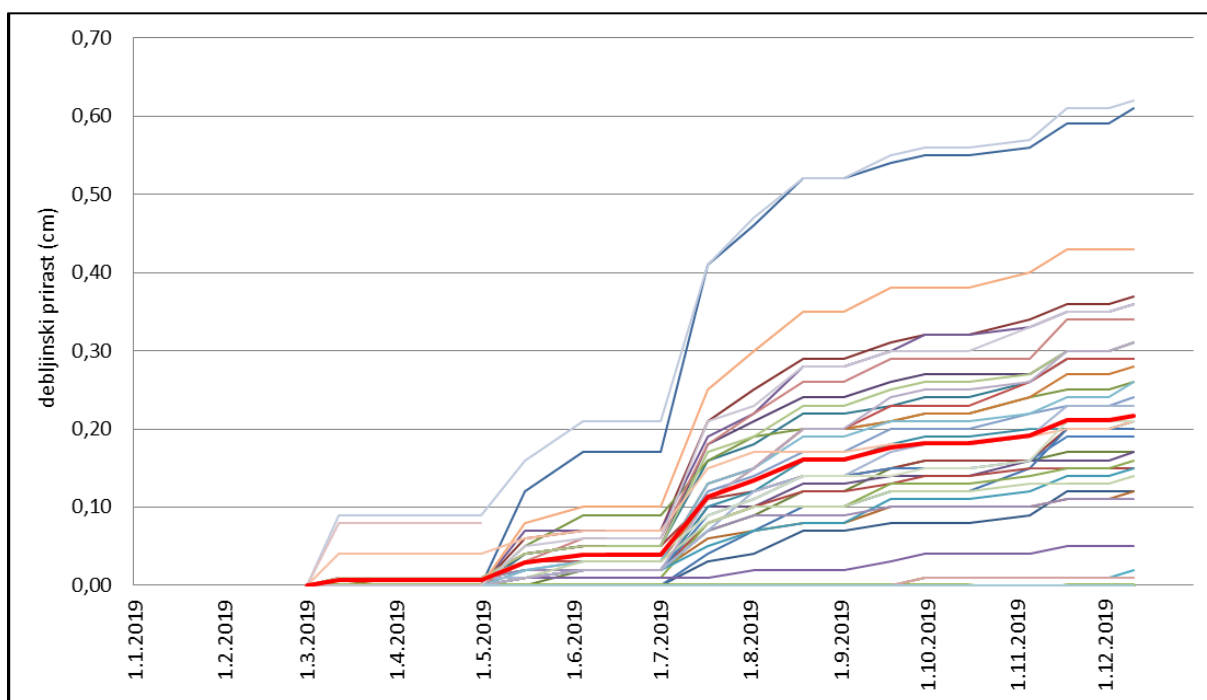
Slika 3. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala hrasta medunca na plohi Poreč u 2019. godini



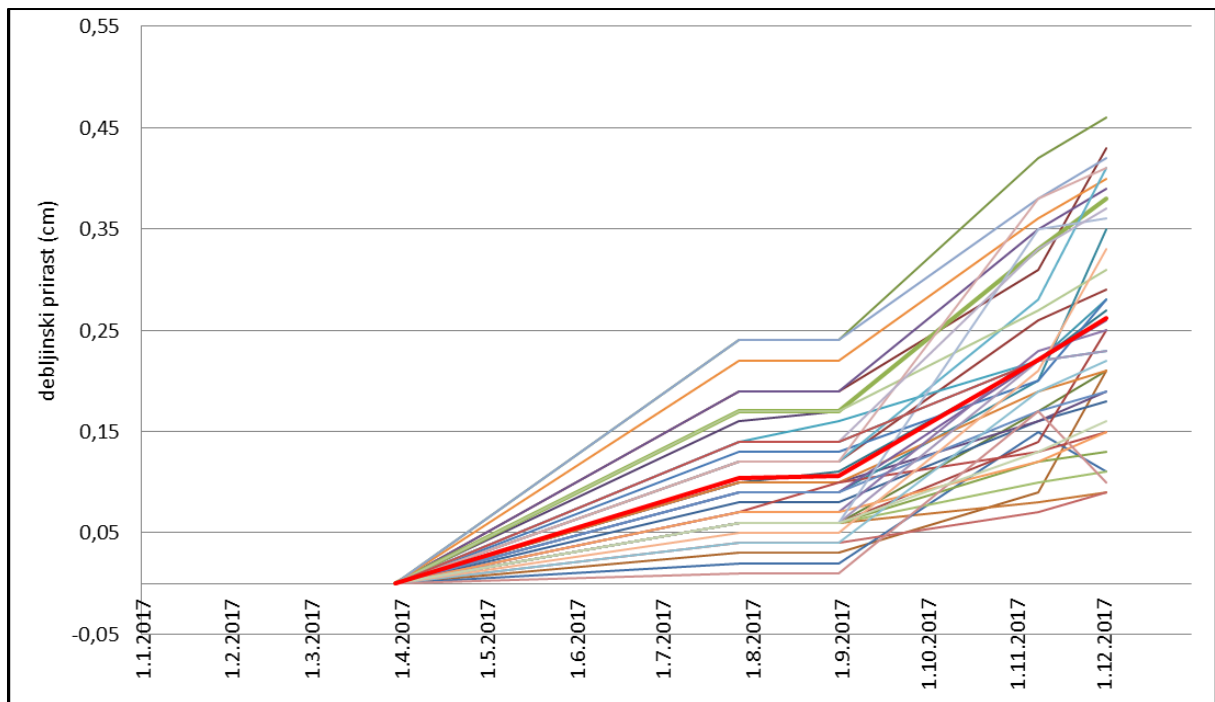
Slika 4. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala hrasta crnike na plohi Šišan u 2017. godini



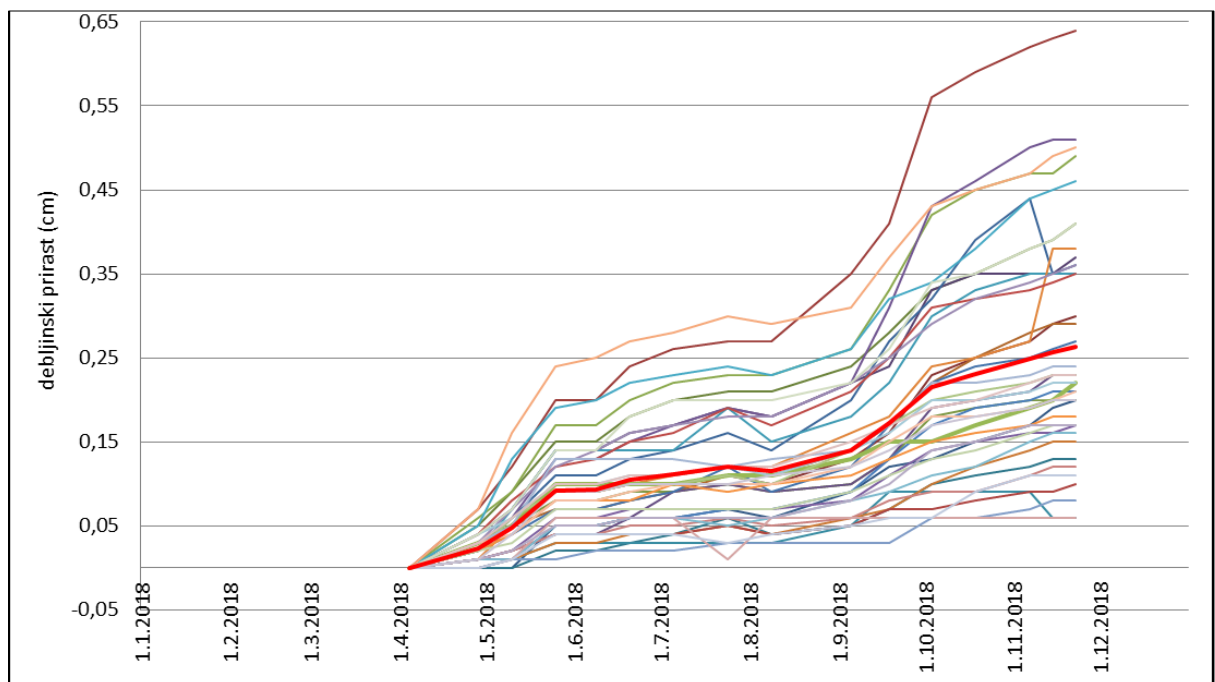
Slika 5. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala crnike na plohi Šišan u 2018. Godini



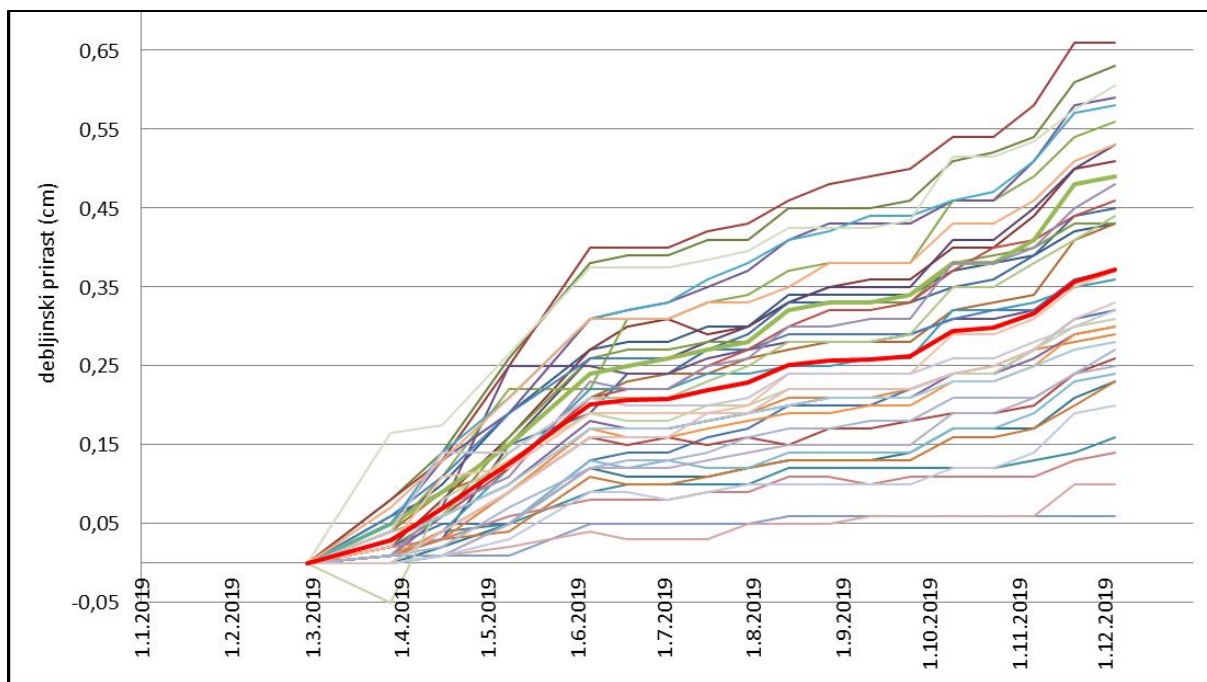
Slika 6. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala crnike na plohi Šišan u 2019. godini



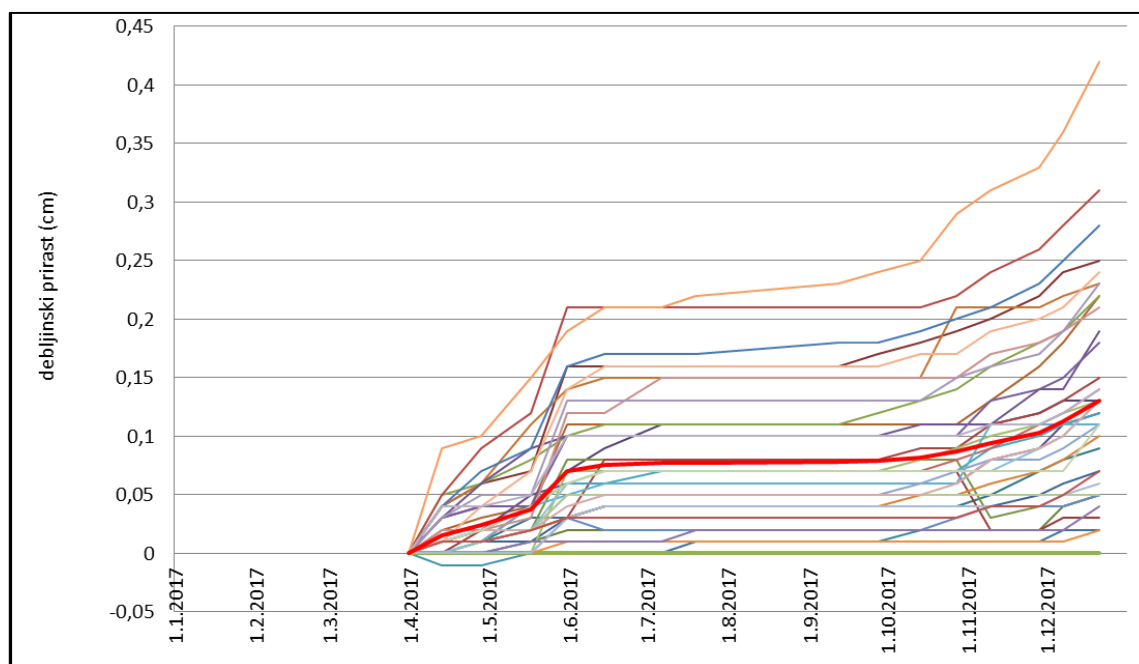
Slika 7. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala alepskoga bora na plohi Vrana u 2017. godini



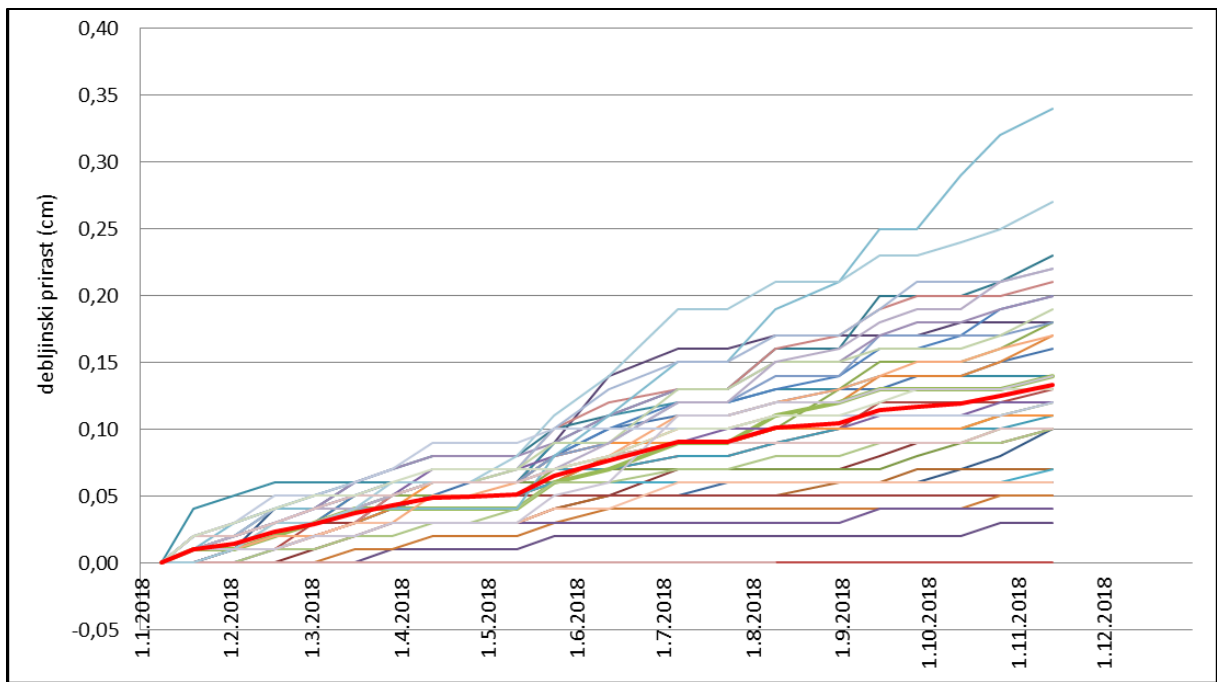
Slika 8. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala alepskoga bora na plohi Vrana u 2018. godini



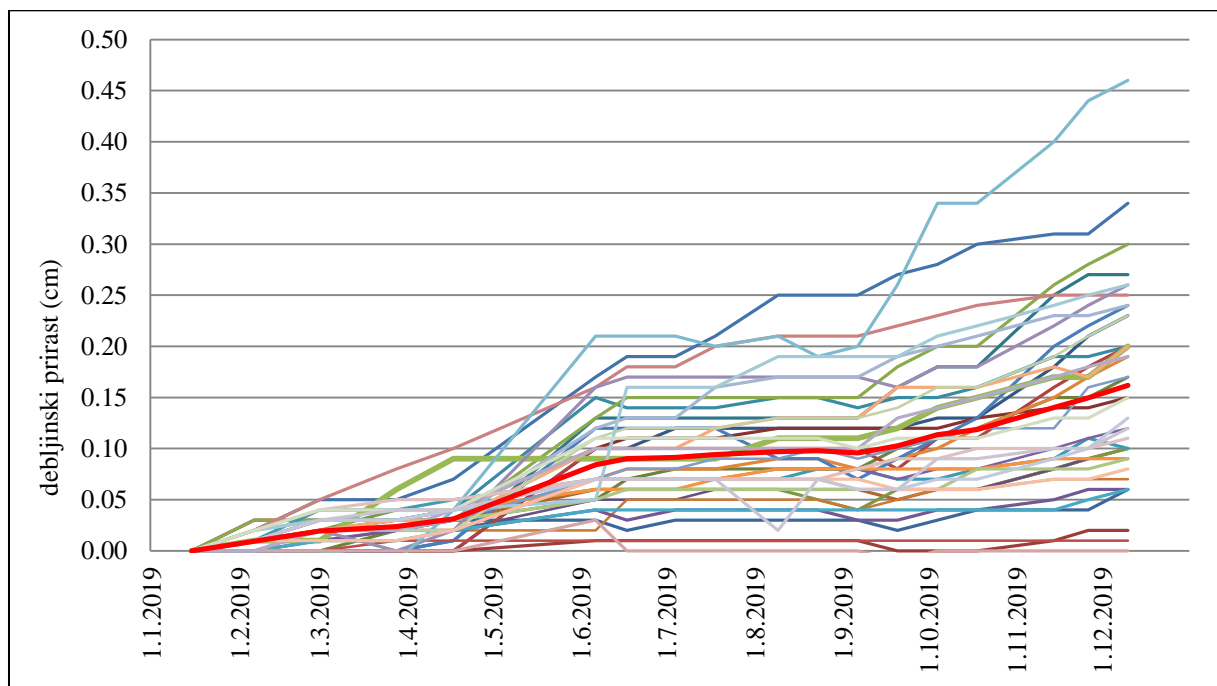
Slika 9. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala alepskoga bora na plohi Vrana u 2019. godini



Slika 10. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala crnoga bora na plohi Split u 2017. godini



Slika 11. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala crnoga bora na plohi Split u 2018. godini



Slika 12. Kretanje kumulativnih vrijednosti debljinskog prirasta za 40 stabala crnoga bora na plohi Split u 2019. godini

Životopis

Lucija Lovreškov rođena je 05. svibnja 1991. godine u Zagrebu. Godine 2015. diplomirala je Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu s izvrsnim uspjehom, a diplomski rad izradila je na Zavodu za tehnologiju nafte i petrokemiju pod mentorstvom prof.dr.sc. Ante Jukića. Poslijediplomski studij *Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam* upisuje na Prehrambeno-biotehnoškome fakultetu 2018. godine pod mentorstvom dr.sc. Ivane Radojčić Redovniković, red. prof.

Od 3. prosinca 2018. zaposlena je na Hrvatskom šumarskom institutu na radnu poziciju suradnika na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Procjena atmosferskog taloženja i razine ozona u mediteranskim šumskim ekosustavima“ (IP-06-2016-3337.) pod vodstvom mentorice dr. sc. Tamare Jakovljević. Tijekom poslijediplomskog studija bila je na stručnom usavršavanju u Italiji na Institutu CNR-IRSA u trajanju od dva tjedna te u talijanskoj Nacionalnoj agenciji za nove tehnologije, energiju i održivi ekonomski razvoj (ENEA) u trajanju od dva tjedna.

Do sada je objavila tri znanstvena a1 rada. Sudjelovala je dvije međunarodne konferencije, 1 domaćem skupu, sudjelovala na 6 radionica i prisustvovala na 2 stručne radionice.

Objavljeni radovi

a1

1. Jakovljević, T., **Lovreškov, L.**, Jelić, G., Anav, A., Popa, I., Fornasier, M. F., Proietti, C., Limić, I., Butorac, L., Vitale, M., De Marco, A. (2021) Impact of ground-level ozone on Mediterranean forest ecosystems health. *Sci. Total Environ.* **783**, 147063. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147063>
2. Jakovljević, T., Marchetto, A., **Lovreškov, L.**, Potočić, N., Seletković, I., Indir, K., Jelić, G., Butorac, L., Zgrablić, Ž., De Marco, A., Simioni, G., Ognjenović, M., Jurinjak Tušek, A. (2019) Assessment of Atmospheric Deposition and Vitality Indicators in Mediterranean Forest Ecosystems. *Sustainability* **11** (23), 6805. <https://doi.org/10.3390/su11236805>
3. **Lovreškov L.**, Limić I, Butorac L, Jakovljević T, 2021. Nitrogen Deposition in Different Mediterranean Forest Types along the Eastern Adriatic Coast. *South-east Eur. For.* **12**(2), 115-122. <https://doi.org/10.15177/seefor.21-15>.