Ispitivanje potencijala hiperakumulacije Lunaria annua L. na metale bakra i olova

Marijanović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:692903

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ISPITIVANJE POTENCIJALA HIPERAKUMULACIJE *LUNARIA ANNUA* L. NA METALE BAKRA I OLOVA

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJANOVIĆ

Matični broj: 77

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ISPITIVANJE POTENCIJALA HIPERAKUMULACIJE *LUNARIA ANNUA* L. NA METALE BAKRA I OLOVA

DIPLOMSKI RAD

ANA MARIJANOVIĆ

Matični broj: 77

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

ASSESSMENT OF *LUNARIA ANNUA* L. HYPERACCUMULATION POTENTIAL OF COPPER AND LEAD

DIPLOMA THESIS

ANA MARIJANOVIĆ

Parent number: 77

Split, October 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: doc. dr. sc. Maša Buljac
Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Marijo Buzuk

ISPITIVANJE POTENCIJALA HIPERAKUMULACIJE *LUNARIA ANNUA* L. NA METALE BAKRA I OLOVA

Ana Marijanović, 77

Sažetak:

Poznato je da mnoge biljke iz obitelji Brassicaceae hiperakumuliraju metale. Budući da su mnogi metali koji mogu biti hiperakumulirani također bitni hranjivi sastojci, utvrđivanje hrane i fitoremedijacija mogu se smatrati dvjema stranama iste kovanice. Dakle, analiza kapaciteta akumulacije biljaka prema metalima predstavlja obećavajući aspekt korištenja tih biljaka.

Lunaria annua L. (jednogodišnja mjesečnica), biljka iz obitelji Brassicaceae, uljarica je poznata po farmaceutskim i nutraceutičkim primjenama. U ovom diplomskom radu je istraživana *L. annua* zbog njenog hiperakumulacijskog potencijala u tlu kontaminiranim bakrom i olovom. Koncentracije bakra i olova izmjerene su prije sijanja (u sjemenkama), nakon što su biljke izrasle, te u ispitivanom tlu. Istraživane su dvije vrste tla: komercijalno dostupni organski mineralni supstrat (COMPO SANA) i uzorak tla uzorkovan u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Za određivanje bakra i olova primijenjena je metoda anodne voltametrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWASV), pri čemu se koristio živin film na staklenoj ugljičnoj elektrodi. Koncentracije Cu i Pb u uzorcima izračunate su korištenjem standardne metode dodavanja.

Eksperimentom je dokazano da je *L. annua* hiperakumulator olova a potencijalni akumulator bakra te da je koncentracija Pb i Cu manja u uzorku botaničkog tla (Pb 53,82 mg/kg; Cu 102,7 mg/kg) nego u uzorku komercijalno dostupnog organskog tla (Pb 869 mg/kg; Cu 341,5 mg/kg).

Izmjerene vrijednosti pH pokazuju da je tlo, koje je uzeto iz botaničkog vrta, TLO 1 (pH=8,58) umjereno lužnato tlo, dok je kupljeno organsko TLO 3 (pH=6,35) slabo kiselo do neutralno. Eksperimentom je pokazano da što je pH tla veći, to je manja mogućnost akumulacije metala.

Ključne riječi: Lunaria annua**,** hiperakumulacija, olovo, bakar, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV), metoda standardnog dodatka

Rad sadrži: 71 stranica, 58 slika, 14 tablica, 44 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. doc. dr. sc. Marijo Buzuk - član
3. doc. dr. sc. Maša Buljac - član-mentor

Datum obrane: 29.10.2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
Graduate study of chemisty

Scientific area: Natural Sciences
Scientific field: Chemisty
Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3
Mentor: Maša Buljac, PhD, assistant prof.
Technical assistance: Marijo Buzuk, PhD, assistant prof.

ASSESSMENT OF *LUNARIA ANNUA L.* HYPERACCUMULATION POTENTIAL OF COPPER AND LEAD

Ana Marijanović,77

Abstract:

Many plants of Brassicaceae family are known to hyperaccumulate metals. As many of the metals that can be hyperaccumulated are also essential nutrients, food fortification and phytoremediation might be considered as two sides of the same coin. Thus, an analysis of the plant accumulation capacity toward metals represents promising aspect of the plant usage.

Lunaria annua L. (annual honesty), a plant from Brassicaceae family, is oilseed crop known for its pharmaceutical and nutraceutical applications. In this thesis, *L. annua* was investigated for its hyperaccumulation potential in copper and lead-contaminated soil. The metal concentrations of copper and lead were measured before planting (seeds) and after the plants were harvested. Two types of soils were used: commercially available organic mineral substrate (COMPO SANA) and a soil sample collected from the Botanical garden Faculty of Science, University of Split.

For the determination of copper and lead, square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV), using mercury film on glassy carbon electrode, was applied. The concentrations of Cu and Pb were calculated in the sample using the standard addition method.

The experiment has shown that L. annua is a lead accumulator and a potential copper accumulator, and that the concentration of Pb and Cu is smaller in a botanical sample (Pb 53,82 mg/kg; Cu 102,7 mg/kg) than in a commercially available organic soil sample (Pb 869 mg/kg; Cu 341,5 mg/kg).

Measured pH values show that the soil, which was taken from a botanical garden - SOIL 1 (pH = 8.58), is moderately alkaline soil. On the other hand, the purchased organic soil - SOIL 3 (pH = 6.35) is slighty acidic to neutral. The experiment has shown that the higher the pH is, the lower possibility of metal accumulation exists.

Keywords: Lunaria annua, hyperaccumulation, lead, copper, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, standard addition method

Thesis contains: 71 pages, 58 figures, 14 tables, 44 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević - PhD, associate prof.	chair person
2. Marijo Buzuk - PhD, assistant prof.	member
3. Maša Buljac- PhD, assistant prof.	supervisor

Defence date: 29 October, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library od Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za kemiju okoliša Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maše Buljac u razdoblju od ožujka do srpnja 2018. godine.

Rad je financiran od HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

Zahvaljujem se:

- mentorici doc. dr. sc. Maši Buljac, na pomoći, stručnim savjetima te na susretljivosti i razumijevanju prilikom izrade ovoga diplomskog rada
- posebna zahvala doc. dr. sc. Mariju Buzuku na nesebičnoj pomoći i podršci pri izradi ovoga rada
- hvala kolegici Ani Đaković na pomoći i potpori tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada
- svojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju i stalnoj potpori.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog rada je određivanje hiperakumulacijskog potencijala biljke *Lunaria annua* L. u tlu kontaminiranim bakrom i olovom i to prije sijanja (u sjemenkama), nakon što se biljka ubrala, te u ispitivanom tlu.

SAŽETAK

Poznato je da mnoge biljke iz obitelji Brassicaceae hiperakumuliraju metale. Budući da su mnogi metali koji mogu biti hiperakumulirani također bitni hranjivi sastojci, utvrđivanje hrane i fitoremedijacija mogu se smatrati dvjema stranama iste kovanice. Dakle, analiza kapaciteta akumulacije biljaka prema metalima predstavlja obećavajući aspekt korištenja tih biljaka.

Lunaria annua L. (jednogodišnja mjesečnica), biljka iz obitelji Brassicaceae, uljarica je poznata po farmaceutskim i nutraceutičkim primjenama. U ovom diplomskom radu je istraživana *L. annua* zbog njenog hiperakumulacijskog potencijala u tlu kontaminiranim bakrom i olovom. Koncentracije bakra i olova izmjerene su prije sijanja (u sjemenkama), nakon što su biljke izrasle, te u ispitivanom tlu. Istraživane su dvije vrste tla: komercijalno dostupni organski mineralni supstrat (COMPO SANA) i uzorak tla uzorkovan u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Za određivanje bakra i olova primijenjena je metoda anodne voltametrije s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWASV), pri čemu se koristio živin film na staklenoj ugljičnoj elektrodi. Koncentracije Cu i Pb u uzorcima izračunate su korištenjem standardne metode dodavanja.

Eksperimentom je dokazano da je *L. annua* hiperakumulator olova a potencijalni akumulator bakra te da je koncentracija Pb i Cu manja u uzorku botaničkog tla (Pb 53,82 mg/kg; Cu 102,7 mg/kg) nego u uzorku komercijalno dostupnog organskog tla (Pb 869 mg/kg; Cu 341,5 mg/kg).

Izmjerene vrijednosti pH pokazuju da je tlo, koje je uzeto iz botaničkog vrta, TLO 1 (pH=8,58) umjereno lužnato tlo, dok je kupljeno organsko TLO 3 (pH=6,35) slabo kiselo do neutralno. Eksperimentom je pokazano da što je pH tla veći, to je manja mogućnost akumulacije metala

Ključne riječi: Lunaria annua, hiperakumulacija, olovo, bakar, ciklička voltametrija, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude (SWV), metoda standardnog dodatka

SUMMARY

Many plants of Brassicaceae family are known to hyperaccumulate metals. As many of the metals that can be hyperaccumulated are also essential nutrients, food fortification and phytoremediation might be considered as two sides of the same coin. Thus, an analysis of the plant accumulation capacity toward metals represents promising aspect of the plant usage.

Lunaria annua L. (annual honesty), a plant from Brassicaceae family, is oilseed crop known for its pharmaceutical and nutraceutical applications. In this thesis, *L. annua* was investigated for its hyperaccumulation potential in copper and lead-contaminated soil. The metal concentrations of copper and lead were measured before planting (seeds) and after the plants were harvested. Two types of soils were used: commercially available organic mineral substrate (COMPO SANA) and a soil sample collected from the Botanical garden Faculty of Science, University of *Split*.

For the determination of copper and lead, square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV), using mercury film on glassy carbon electrode, was applied. The concentrations of Cu and Pb were calculated in the sample using the standard addition method.

The experiment has shown that L. annua is a lead accumulator and a potential copper accumulator, and that the concentration of Pb and Cu is smaller in a botanical sample (Pb 53,82 mg/kg; Cu 102,7 mg/kg) than in a commercially available organic soil sample (Pb 869 mg/kg; Cu 341,5 mg/kg).

Measured pH values show that the soil, which was taken from a botanical garden - SOIL 1 (pH = 8.58), is moderately alkaline soil. On the other hand, the purchased organic soil - SOIL 3 (pH = 6.35) is slighty acidic to neutral. The experiment has shown that the higher the pH is, the lower possibility of metal accumulation exists.

Keywords: Lunaria annua, hyperaccumulation, lead, copper, cyclic voltammetry, square-wave voltammetry, standard addition method

Sadržaj

UVOD .....
1. OPĆI DIO 1
1.1. Karakteristike biljke *Lunaria annua* L. 2
1.2. Biljke kao hiperakumulatori metala 3
1.3. Tlo 4
1.3.1. Sastav tla 4
1.3.1.1. Organski dio tla 4
1.3.1.2. Mineralni dio tla 5
1.3.1.3. Humus 6
1.4. Kiselost i lužnatost tla 6
1.4.1. Određivanje kiselosti tla 7
1.5. Raspodjela teških metala u tlu 7
1.5.1. Olovo 9
1.5.2. Bakar 10
1.6. Elektrokemijske metode 11
1.6.1. Voltametrija 13
1.6.2. Voltametrija s linearnim signalom pobude 14
1.6.3. Ciklička voltametrija 16
1.6.4. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude 17
1.6.5. Elektrometrijske metode s otapanjem pretkoncentriranog analita – „Stripping analiza“ 18
1.6.5.1. Voltametrija anodnog otapanja 18
1.6.5.2. Voltametrija katodnog otapanja 20
1.6.6. Polarografija 20
1.6.7. Kapajuća živina elektroda 20
1.6.8. GCE u elektroanalitičkim mjerenjima 22
1.7. Kalibracijski postupci 23
1.7.1. Krivulja umjeravanja 23
1.7.2. Metoda standardnog dodatka 24
2. EKSPERIMENTALNI DIO 27
2.1. Priprava otopina 29
2.1.1. Priprava 0,1 M $Pb(NO_3)_2$ 29
2.1.1.1. Priprava standardnih otopina olovljevih (II) kationa 30

2.1.2. Priprava 0,1 M $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ ... 30
2.1.2.1. Priprava standardnih otopina bakrovih (II) kationa ... 30
2.1.3. Priprava 1 M HNO_3 ... 31
2.1.4. Priprava 0,01 M H_3PO_4 ... 31
2.1.5. Priprava otopine H_2SO_4 ... 31
2.1.6. Priprava otopine živinog (II) nitrata monohidrata ($Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ + HNO_3 + KNO_3) ... 31
2.1.7. Priprava otopine za nanošenje žive ($2 \cdot 10^{-4}$ M $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$; $1 \cdot 10^{-2}$ M HNO_3; $1 \cdot 10^{-1}$ M KNO_3) ... 31
2.1.8. Priprava otopine HNO_3 + H_3PO_4 ... 32
2.1.9. Priprava otopine zlatotopke ... 32
2.1.10. Priprava uzorka tla ... 32
2.1.10.1. Određivanje kiselosti tla prije sijanja ... 33
2.1.11. Priprava otopine sjemena biljke *Lunaria annua* L. ... 33
2.1.12. Priprava otopine za zalijevanje biljke (Pb/Cu) ... 34
2.2. Sijanje ... 34
2.2.1. Priprava otopina uzoraka tla nakon što je biljka izrasla ... 35
2.2.2. Priprava uzoraka biljaka ... 35
2.3. Aparatura i elektrodni materijal ... 35
2.3.1. Aparatura ... 35
2.3.2. Priprava radne elektrode ... 36
2.3.3. Taloženje žive na površinu radne elektrode ... 38
3. REZULTATI I RASPRAVA ... 39
3.1. Kiselost tla prije sijanja ... 40
3.2. Elektrokemijsko ponašanje i određivanje olovljevih (II) kationa na elektrodama od staklastog ugljika ... 40
3.2.1. Elektrokemijsko ponašanje olovljevih (II) kationa na modificiranim i nemodificiranim elektrodama od staklastog ugljika ... 40
3.2.2. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg ... 41
3.2.3. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom uz prisustvo zlatotopke ... 42
3.2.4. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg u realnim uzorcima ... 43
3.2.4.1. Prije sijanja biljke *Lunaria annua* L. ... 43

3.2.4.2. Poslije sijanja biljke *Lunaria annua* L. 46
3.3. Elektrokemijsko ponašanje i određivanje bakrovih (II) kationa na elektrodama od staklastog ugljika 51
3.3.1. Elektrokemijsko ponašanje bakrovih (II) kationa na modificiranim i nemodificiranim elektrodama od staklastog ugljika 51
3.3.2. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg 52
3.3.3. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg uz prisustvo zlatotopke 53
3.3.4. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg u realnim uzorcima 54
3.3.4.1. Prije sijanja biljke *Lunaria annua* L. 54
3.3.4.2. Poslije sijanja biljke *Lunaria annua* L. 57
3.4. Kombinacije olova i bakra 63
4. ZAKLJUČAK 65
5. LITERATURA 67

UVOD

Elementi poput Pb, Cu, Hg i drugih neki su od glavnih sastavnica Zemljine biosfere. Oni se ne razgrađuju već kruže u prirodi u različitim oksidacijskim i kemijskim oblicima. Čovjek svojim djelovanjem povećava prirodno prisutne razine tih elemenata u okolišu [1].

Stoga je cilj ovog istraživanja bilo odrediti hiperakumulacijski potencijal *Lunaria annuaa* L. u tlu i istraživanoj biljci prethodno kontaminirani olovom i bakrom.

Lunaria annua L. dvogodišnja je biljka iz porodice krstašica. Sastoji se od grubo zupčastih listova s velikim neuglednim cvjetovima, a sjemenke su joj spljoštene.

Koristeći elektrokemijske voltametrijske metode dobiven je uvid u potencijal hiperakumulacije istraživane biljke na metale olovo i bakar.

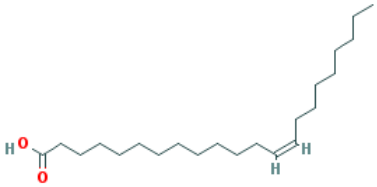
1. OPĆI DIO

1.1. Karakteristike biljke *Lunaria annua* L.

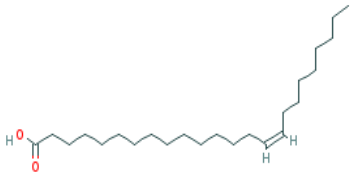
Lunaria annua L. (Slika 1.) pripada porodici krstašica. Može narasti oko 0,9 m dvogodišnja je to biljka koju većinom nalazimo u vrtovima i otpadnim mjesta diljem Europe i Sjeverne Amerike. Sastoji se od grubo zupčastih listova s velikim neuglednim cvjetovima, 25/30 mm u promjeru koje ako su ispunjeni uvjeti vernalizacije prethodnog jesenskog i zimskog razdoblja, cvjetaju od travnja do lipnja. Sjemenke su spljoštene, i gotovo okrugle, obično sadrže između pet i deset sjemena koji strše, a kada su zreli, približno su 7 mm u promjeru. Sjeme *L. annua* prinosi od 1000 do 2000 kg ha^{-1}, s udjelom ulja od približno 30-35%. Glavni sastojci su: 44% erukinske kiseline (Slika 2.) i 23% nervonske kiseline (Slika 3.). Ulja su od interesa za oleokemijsku industriju, a oba ulja su prikladna kao mazivo dok nervonska kiselina ima potencijal kao lijek za multiplu sklerozu [2].



Slika 1. *Lunaria annua* L. [3]



Slika 2. Erukinska kiselina [4]



Slika 3. Nervonska kiselina [4]

1.2. Biljke kao hiperakumulatori metala

Onečišćenje tla metalima značajno se razlikuje od onečišćenja zraka ili voda u tome što se teški metali u tlu zadržavaju znatno dulje nego u ostalim dijelovima biosfere.

Najčešći izvori kontaminacije tla teškim metalima su metalurška, metaloprerađivačka i elektronička industrija, rudarenje, postrojenja za tretman otpadnih voda, područja zahvaćena ratnim djelovanjima ili vojni poligoni, odlagališta otpada i poljoprivredna gnojiva. Osim ovih velik doprinos onečišćenju tla teškim metalima potječe i od cestovnog prometa (promet autocestama, održavanje prometnica posebno tijekom zimske sezone kada se prometnice tretiraju solima, trošenje kolnika, abrazija kočnica i korozija najčešće se spominju kao izvor teških metala uz prometnice). Od toga izravno od pogonskog i kočničkog sustava potječu Cd, Cu i Ni, od maziva Cd, Cu i Zn, od emisije ispušnih plinova Pb, od abrazije pneumatika Zn, itd.

Sve biljke imaju mogućnost akumuliranja, iz tla i vode, onih metala koji su esencijalni za njihov rast i razvoj. To su: Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, Ni. Neke biljke također imaju mogućnost akumulacije teških metala koji nemaju poznatu biološku funkciju, a to su: Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se i Hg. Međutim pretjerana akumulacija ovih metala u biljkama može biti toksična. Mogućnost da toleriraju povišene koncentracije teških metala te da ih akumuliraju u neobično visokim koncentracijama ima znatan broj biljaka. Do sada su poznati hiperakumulatori nikla, kobalta i bakra, mangana, olova i cinka te selena [5].

1.3. Tlo

Tlo je gornji sloj Zemljine kore, smješten između kamene podloge i površine. Sastoji se od čestica minerala, organske tvari, vode, zraka i živih organizama. Tlo je neobnovljivo dobro i mora se koristiti održivo uz očuvanje njegovih funkcija. Nepovoljni učinci na tlo moraju se izbjegavati u najvećoj mogućoj mjeri. Tlo je uz zrak, vode, more, krajobraz, biljni i životinjski svijet te zemljinu kamenu koru, sastavni dio okoliša [6].

1.3.1. Sastav tla

Sastav tla ovisi o nizu čimbenika, posebice o geološkim i klimatskim uvjetima. Mineraloški sastav tla ovisi prvenstveno o vrsti tla, ali njegova kemijska svojstva variraju u skladu s dinamikom procesa u tlu. U tlu su zastupljeni svi elementi Zemljine kore, ali i mnogi drugi. Udjel čvrste faze u tlu je 50%, a čini je mineralni (anorganski) dio (45%) i organski dio (5%). Njegovu tekuću fazu čini voda s otopljenim sastojcima (25%), a plinovitu zrak (25%) [7].



Slika 4. Sastav tla [8]

1.3.1.1. Organski dio tla

Organska tvar je frakcija tla koju čine sve organske komponente koje su nekada bile žive, odnosno koje su manje ili više raspadnute. U navedeno se ubrajaju nadzemni i podzemni ostaci biljaka, ostaci životinja, te ostaci makro- i mikroorganizama. U većini poljoprivrednih tala svijeta, pa tako i kod nas, sadržaj organske tvari je manji od 5%

volumno (Slika 5.). Tako je količina organske tvari, u odnosu na ostale komponente (frakcije) tla (mineralni dio, voda, zrak), relativno mala, ali je njena uloga nezamjenjiva u životu tla, ali i za život na Zemlji [8].

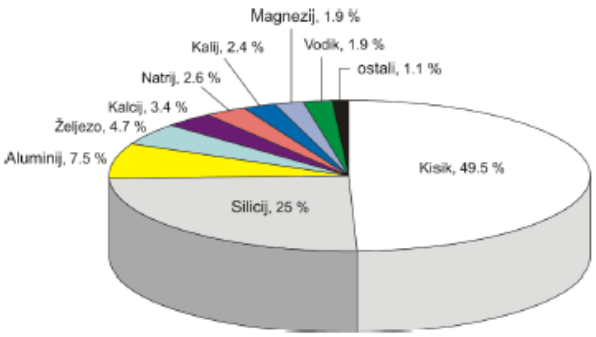


Slika 5. Komponente tla [9]

1.3.1.2. Mineralni dio tla

Mineralni dio tla nastaje iz litosfere (magmatske, metamorfne i sedimentne stijene), njenim raspadanjem pod utjecajem fizikalnih, kemijskih i bioloških čimbenika.

Skoro polovicu udjela litosfere (Slika 6.) zauzima kisik (47,2%), slijedi ga silicij (27,6%), zatim aluminij i željezo koji zajedno sudjeluju u udjelu sa oko 14%. Grupa elemenata: Ca, Na, K i Mg od kojih svaki pojedinačno u litosferi sudjeluje sa 2-3%. Preostalih elemenata zajedno ima u količini manjoj od 1%. U tu grupu ulaze i elementi neophodni za prehranu biljaka: C, H, N, S, P, Mn. Mikroelementi u sastavu litosfere su: Cu, Zn,Co, B, Mo i dr. [10].



Slika 6. Kemijski sastav litosfere [10]

1.3.1.3. Humus

Humus je dobro razgrađena organska tvar tla. To je materijal tamno smeđe boje, porozan, spužvast i ugodnog mirisa na tlo [8].

Definira se kao heterogena organska tvar nastala razgradnjom primarnih organskih tvari i sintezom novih, složenijih spojeva pod utjecajem mikroorganizama u tlu. Razlikuju se tri funkcijski različite sastavnice humusa: huminske kiseline, fulvinske kiseline i humin, koji je nehidrolizirajući ostatak ugljika u humusu. Elementarni sastav humusa je 51-62% C, 2,8-6,6% H, 31-36% O, 3,6-5,5 N. Humus je, zbog velikog kapaciteta sorpcije kationa, među glavnim izvorima biljnih hranjiva, osobito dušika, utječe na njihovu pokretljivost u tlu i na rast biljaka. Oko 50% opasnih zagađivala koja dospiju u tlo (npr. pesticidi) ostaje vezano za humus, što onemogućuje njihovo migriranje u biljno korijenje i podzemne vode [10].

1.4. Kiselost i lužnatost tla

Kiselost i lužnatost tla važni su čimbenici za život biljaka. Razlikujemo:

-aktivnu kiselost koja ovisi o slobodnim vodikovim ionima u vodi tla i potječe uglavnom od anorganskih (H_2CO_3, H_3PO_4, HNO_3) i fulvinskih kiselina, ali i od hidrolize soli slabih lužina i jakih kiselina;

-potencijalnu kiselost, odnosno vezane vodikove ione koji mogu prijeći u otopinu tla, bilo da je riječ o supstitucijskoj ili hidrolitičkoj kiselosti.

Lužnatost tla prvenstveno ovisi o hidrolizi kalcijeva i magnezijeva karbonata. U tlima koja sadržavaju natrijev karbonat i hidrogenkarbonat hidrolizom se oslobađa jaka lužina NaOH, pa je pH > 8,5, što štetno djeluje na biljke i čini tlo neplodnim.

Unošenje kiselina u tlo pojačano je u proteklim desetljećima. Tlo se protiv toga bori puferiranjem postižući prirodnu ravnotežu. U tlu kao puferi djeluju smjese ugljične kiseline i karbonata te drugih organskih kiselina i njihovih soli. Pritom se oslobađa amfoterni HCO_3^- koji ima puferski učinak. U humusnim tlima ulogu pufera igra dio tla koji veže vodikove ione [10].

1.4.1. Određivanje kiselosti tla

pH-reakciju tla određujemo pH-metrom pomoću kombinirane elektrode, a određuju se aktualni i supstitucijski aciditet. Aktualni aciditet je aciditet tla suspendiranog u destiliranoj vodi. Supstitucijski aciditet je aciditet tla suspendiranog u otopini KCl-a. Uvjetovan je sposobnošću tla da vodikove ione iz slabe baze svoga adsorpcijskog kompleksa zamjenjuje kationima neutralnih soli. Vrijednost supstitucijskog aciditeta trebala bi biti niža od vrijednosti aktualnog aciditeta.

Tablica 1. Podjela tla prema pH-vrijednosti izmjerenoj u destiliranoj vodi prema Gračaninu [11]

Grupa tla	pH – vrijednost
vrlo jako kisela	<4
jako kisela	4 – 5
umjereno kisela	5 – 6
slabo kisela do neutralna	6 – 7
neutralna do slabo kisela	7 – 8
umjereno lužnato	8 – 9
jako lužnato	9 – 10
vrlo jako lužnato	>10

1.5. Raspodjela teških metala u tlu

Teški metali su općenito definirani kao metali velike gustoće (veće od 5000 kg/m^3), atomske mase i atomskog broja. Dijele se na esencijalne (Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) koji su neophodni za razne biokemijske i fiziološke funkcije, te neesencijalne (Al, Ba, Bi, Cd, Hg, Pt, Ag...) koji nemaju dokazanu biološku ulogu. Teški metali se smatraju elementima u tragovima zbog svoje male rasprostranjenosti (manje od 10 ppm) [12].

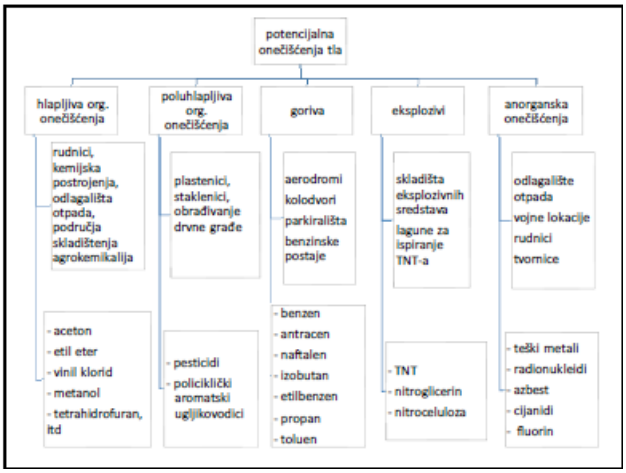
Većina ovih elementa čine sastavni dio Zemljine biosfere. Oni se ne razgrađuju već kruže u prirodi u različitim oksidacijskim i kemijskim oblicima, a čovjek svojim djelovanjem povećava prirodno prisutne razine tih elemenata u okolišu [1,13].

Teški metali su još uvijek jedan od najvažnijih problema u okolišu a sveprisutni su u tlu, vodi i zraku. Pod pojmom onečišćenja tla (Slika 7.) teškim metalima podrazumijevamo udio teškog metala u tlu u onoj količini koja dovodi do mjerljivih poremećaja neke od funkcije tla. Izvori onečišćenja su: industrijska proizvodnja i usluge, industrijski otpad, gradski otpad, naftna industrija, rudarstvo, elektrane, skladišta, vojna aktivnost, promet, transportni izljevi, poljoprivredna djelatnost, incidentne situacije i ostalo [1,13,14].

„Zaštita zemljišta od onečišćenja provodi se zabranom, sprječavanjem i ograničavanjem unošenja onečišćujućih tvari u zemljište kao i poduzimanjem drugih mjera za njegovo očuvanje“ [14].

„Onečišćujuće tvari su teški metali (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb i Zn) i potencijalno toksični esencijalni elementi (Zn i Cu), organske onečišćujuće tvari (pesticidi, industrijske kemikalije, nusproizvodi izgaranja i industrijskih procesa), radionuklidi i patogeni organizmi. Onečišćujućim tvarima smatraju se i tvari koje se uobičajeno unose u zemljište, ali neadekvatnom primjenom (količine, vrijeme primjene, uvjeti u zemljištu i drugo) mogu prouzročiti štete po okoliš i/ili zdravlje ljudi“ [14].

Metali poput olova, bakra, kadmija su otrovni i negativno djeluju na organizam. Iz toga razloga potrebno je pratiti koncentracije metala, kao i koncentracije toksičnih metala u okolišu (Tablica 2.) [1,13].



Slika 7. Onečišćenje tla [13]

Tablica 2. Sadržaj teških metala i potencijalno onečišćujućih elemenata izraženo u mg kg^{-1} [14]

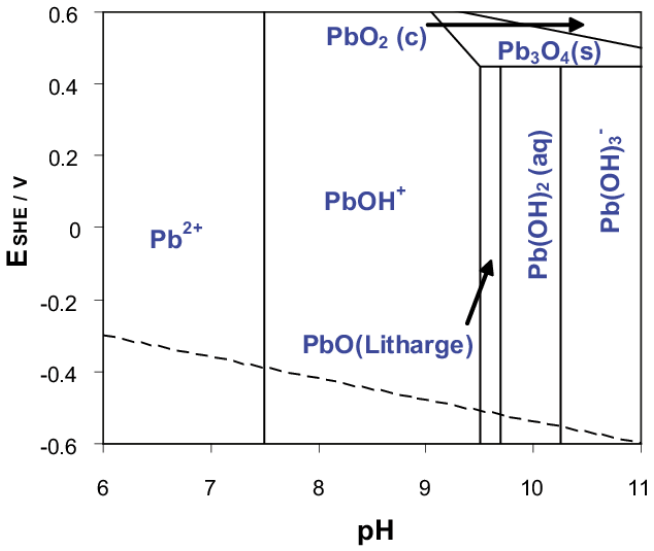
mg kg^{-1}	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Pjeskovito tlo	0,0-0,5	0-40	0-60	0,0-0,5	0-30	0-50	0-60
Praškasto-ilovasto tlo	0,5-1,0	40-80	60-90	0,5-1,0	30-50	50-100	60-150
Glinasto tlo	1,0-2,0	80-120	90-120	1,0-1,5	50-75	100-150	150-200

1.5.1. Olovo

U elementarnom stanju olovo je plavo-sivkasti, sjajni, mekani i mehaničko slab metal. Veći dio olova oslobođenog ispušnim plinovima odlaže se do 100 m od prometnica, što uzrokuje koncentraciju olova u biljkama i do 150 mg kg^{-1}.

U prirodi se nalazi u spojevima ili kompleksnim molekulama gdje ima stupanj oksidacije +2 dok se u tlu može naći u različitim svojim oblicima u ovisnosti o pH (slika 8.). Organski oblici olova zbog svoje mobilnosti za biljku predstavljaju veći problem od ionskog olova. Pb je snažni okolišni polutant i toksičan je u vrlo niskim koncentracijama a akumulira se u različitim dijelovima biljke [13].

Prema Bakeru i Brooksu [15] biljka se smatra hiperakumulatorom kada su u njoj vrijednosti Pb > 1000 mg/kg [16].



Slika 8. Raspodjela olovljevih specija u ovisnosti o pH [17]

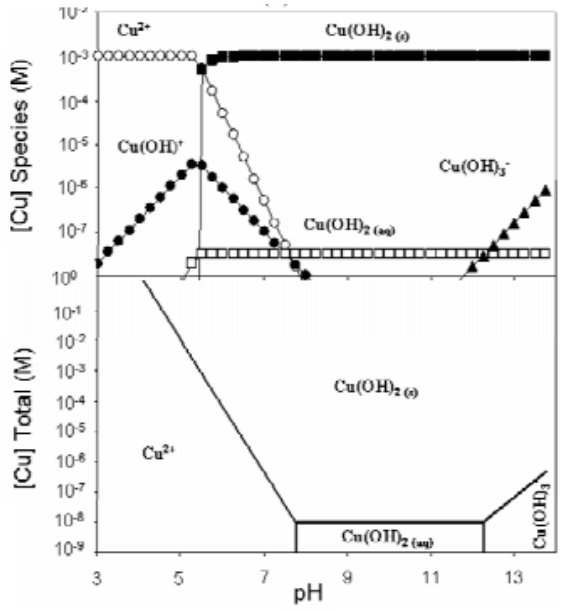
1.5.2. Bakar

U prirodi je rijedak u elementarnom stanju, najviše ga ima u sulfidnim rudama (halkopirit, bornit, kovelit i halkozin), u oksidnim (kuprit) i u karbonatnim rudama (malahit i azurit). Sadržaj bakra u tlu iznosi od 5-50 ppm a u biljkama od 2-20 ppm. Toksičnost bakra očituje se smanjenim rastom korijena i izdanaka, klorozom starijeg lišća i crvenkasto – smeđom nekrozom [13].

Povišena koncentracija bakra u tlu djeluje loše na rast biljaka, smanjuje klijanje sjemena i antagonistički djeluje na druge mikrolemente. Općenito se može reći da pokretljivost bakra u tlu raste sa zakiseljavanjem tla, a smanjuje povećanjem pH vrijednosti (npr. kalcizacijom). Pokretljivost bakra u biljkama je osrednja. Ako ga nema dovoljno, kretanje iz korjena u gornje dijelove biljke (poviše zemlje), kao i iz starijih listova u mlade, neznatno je [18].

Pri pH vrijednostima i sadržaju molekularnog kisika koji prevladavaju u većini tala, dominantna ionska forma bakra je dvovalentni kation Cu^{2+}. Pokretljivost bakra u tlima je niska [10].

Kao i za olovo prema Bakeru i Brooksu [15] biljka se smatra hiperakumulatorom kada su u njoj vrijednosti Cu > 1000 mg/kg [16].



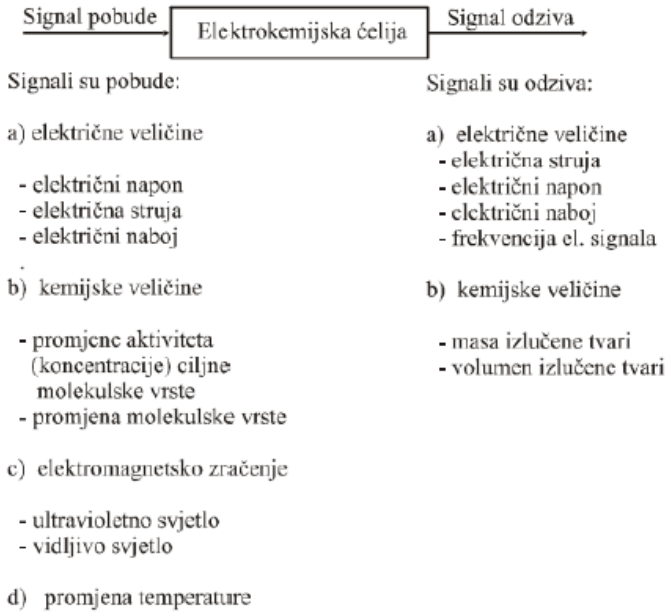
Slika 9. Raspodjela bakrovih specija u ovisnosti o pH [19]

1.6. Elektrokemijske metode

Elektrokemija ima posebnu ulogu u kemijskoj analizi. Definira se kao grana kemije koja se bavi električnim i kemijskim učincima. Veliki dio ovih metoda bazira se na proučavanju kemijskih promjena uzrokovanih prolazom električne struje i proizvodnjom električne energije kemijskim reakcijama. Zapravo, područje elektrokemije obuhvaća ogroman niz različitih pojava (npr. elektroforeza i korozija), uređaja (elektrokromni zasloni, elektro analitički senzori, baterije i ćelije goriva) i tehnologija (elektroplatiranje metala i velika proizvodnja aluminija i klora) [20].

Prema J. O'M. Bockrisu [21] elektrokemija opisuje stvaranje tvari pomoću elektriciteta i stvaranje elektriciteta trošenjem tvari. S obzirom na to da elektrokemijske reakcije mijenjaju energetsko stanje sustava, sve je elektrokemijske sustave podijelio u tri grupe: ćelije koje se pokreću izvana – proizvođače tvari (procesi zahtijevaju unošenje energije izvana), gorive ćelije – proizvođače električne struje (električna energija se dobiva na račun energije kemijskog procesa) i elektrokemijske uređaje – elektrode koje se spontano troše rasipajući energiju (spontana razgradnja tvari uz gubitak energije u čijem mehanizmu postoji i izmjena elektrona, a odnosi se na procese elektrokemijske korozije). Općenito, radi se o pretvorbi električne u kemijsku ili kemijske u električnu energiju.

U elektrokemijskoj ćeliji se provode elektroanalitička mjerenja, a sastoji se od posude koja sadrži otopinu (najčešće je to otopina elektrolita koja ima funkciju ionskog vodiča) u koju su uronjene elektrode - elektronski vodiči. Uronjena u otopinu elektroda ima ulogu senzora jer tada dolazi do elektrokemijske reakcije prilikom koje se promjena koncentracije kemijske vrste manifestira kao promjena razlike potencijala uspostavljene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Pored toga, elektroda može biti sredstvo za dovođenje električne veličine koja uzrokuje promjene na dodirnoj površini elektroda-otopina. Kao produkt navedene promjene nastaje neka druga veličina koju mjerimo (Slika 10.) [22].



Slika 10. Načelo provedbe elektroanalitičkih metoda i djelovanja elektrokemijskih senzora [23]

Elektroanalitička kemija dominira u elektrokemiji zbog toga što se njene metode mogu automatizirati i izgraditi elektronski instrument pomoću kojih se lako dobivaju kompjuterski zapisi rezultata [24].

Elektroanalitičke metode su skupina analitičkih postupaka pomoću kojih podatke o koncentraciji, aktivitetu ili nekom drugoj veličini dobivamo preko međusobno razmjernih električnih veličina, tj. s pomoću električnog napona, električne struje ili električnog naboja [25].

Metode se dijele u dvije osnovne skupine:

1) metode kod kojih, kroz elektrokemijsku ćeliju, ne teče električna struja, te
2) metode kod kojih, kroz elektrokemijsku ćeliju, teče električna struja kao posljedica djelovanja vanjskog izvora električne struje.

Kod metoda kod kojih nema protoka električne struje električni napon, što nastaje između elektroda, uspostavlja se spontano, odvijanjem elektrokemijskih reakcija na elektrodama. Upravo ovakve elektrokemijske reakcije na elektrodama mogu postići stanje dinamičke ravnoteže pri čemu se uspostavlja određeni, ravnotežni, elektrodni potencijal. Razlika potencijala između elektroda pokazuje kako bi se reakcije odvijale u elektrokemijskoj ćeliji kada bismo vanjskim električnim krugom omogućili tok

električne struje. Ova metoda se naziva potenciometrija. Zbog tendencije odvijanja reakcije na elektrodama, u graničnom sloju otopine uz elektrode, mijenja se koncentracija tzv. elektroaktivnih čestica koje sudjeluju u elektrodnim reakcijama.

Kod druge skupine metoda kod kojih kroz elektrokemijski članak teče električna struja, ćeliju nazivamo elektrolitička ćelija, a sam proces elektrolizom. Tok električne struje kroz elektrolitičku ćeliju, a time i kroz vanjski električni krug koji povezuje elektrode, uzrokuju reakcije redukcije i oksidacije vrsta iz otopine ili same elektrode. Mjerena fizikalna veličina tj. signal odziva je električna struja, čija jakost ovisi o obliku naponskog signala pobude, vrsti primjenjene elektrode i koncentraciji elektroaktivnih čestica. Možemo je mjeriti kao funkciju narinutog napona pa tada govorimo o voltametrijskim metodama. Mjerimo li količinu električnog naboja potrebnog za provođenje elektrolize, govorimo o kulometriji kod koje signal pobude može biti električna struja ili električni napon. Kod kronoamperometrije, rezultirajuću električnu struju mjerimo kao funkciju vremena elektrolize, dok kod elektrogravimetrije mjerimo masu izlučene tvari na radnoj elektrodi.

U većine elektroanalitičkih metoda mjereni podatak o svojstvima elektrolitne otopine dobivamo pomoću jedne od elektroda elektrolitičke ćelije. To je takozvana radna elektroda kada kroz ćeliju teče električna struja ili indikatorska pri potenciometrijskim mjerenjima. Upravo zbog ovoga temelj elektroanalitičkih mjerenja je elektrokemijska reakcija na radnoj ili indikatorskoj elektrodi [25].

1.6.1. Voltametrija

Voltametrija je skupina elektrokemijskih metoda koje se zasnivaju na mjerenjima odnosa struje i potencijala kod elektrokemijskog procesa na radnoj elektrodi u kojima je signal pobude električni napon. Signal odaziva članka je struja, koja se mjeri kao funkcija narinutog napona.

Najčešće korištene voltametrijske metode su ciklička, diferencijalna pulsna, voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom i voltametrija s linearnim signalom pobude, kao i različite vrste polarografije koje se od ostalih voltametrijskih tehnika razlikuju po tome što radna mikroelektroda ima oblik kapajuće živine elektrode.

Elektrokemijski članak služi kao nosač otopine analita u koju su uronjene elektrode: radna elektroda, pomoćna ili protuelektroda i referentna elektroda. Potencijal se mjeri između radne i referentne elektrode (kontrolira se signal pobude), a struja između radne i protuelektrode (mjeri se signal odziva) [23].

1.6.2. Voltametrija s linearnim signalom pobude

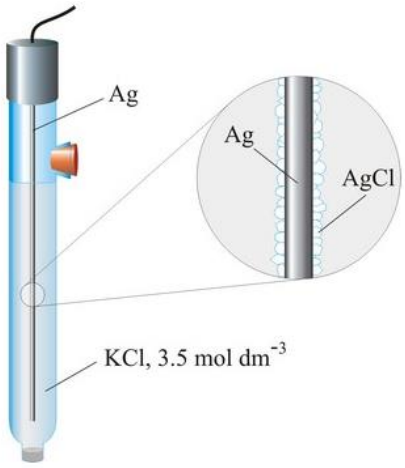
Voltametriju s linearnom promjenom potencijala otkrili su Matheson i Nichols 1938., a teorijski opisali Randles i Ševcik. Ovu voltametriju nazivamo i kronoamperometrija s linearnom promjenom potencijala odnosno polarografija na stacionarnoj elektrodi [23].

Grafički prikaz znaka odziva kod voltametrije nazivamo voltamogramom. Elektrokemijska ćelija koja se koristi kod ove metode sastoji se od posude koja sadrži smjesu otopine analita i nereaktivnog elektrolita u koju su uronjene tri elektrode (Slika 13.).

Prva je elektroda radna, njen se potencijal linearno mijenja s vremenom, a njezina površina je mala kako bi se poboljšala polarizacija elektrode.

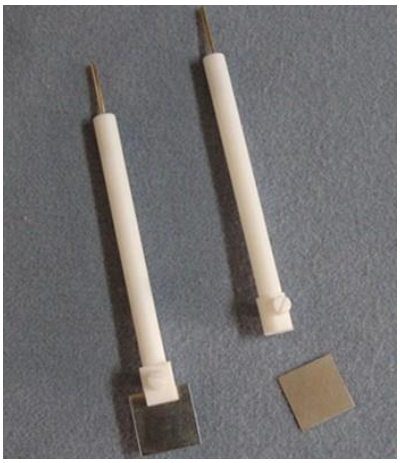
Druga elektroda zove se referentna. Srebro/srebrov klorid elektroda (Slika 11.), je najčešće korištena referentna elektroda zbog svoje jednostavnosti, neotrovnosti, niske cijene i stabilnosti. Najčešće se puni zasićenim kalijevim kloridom ali može biti punjena i kalijevim kloridom nižih koncentracija, npr. 3,5 mol dm^{-3} ili 1 mol dm^{-3}. Srebro/srebrov klorid elektrode temelji se na polureakciji tj. na redoks paru Ag/AgCl: [26]

$$AgCl + e^{-} \rightleftarrows Ag^{0} + Cl^{-} \qquad (1)$$



Slika 11. Srebro/srebrov klorid elektroda [26]

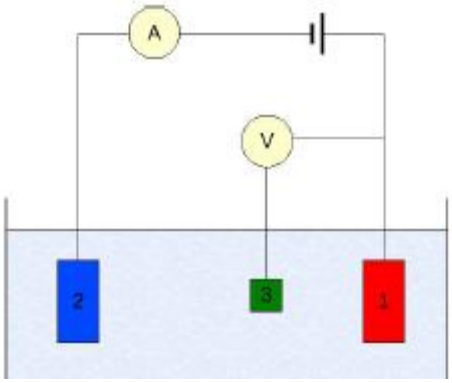
Treća elektroda je protuelektroda (slika 12.) koja je uglavnom oblika namotane platinske žice, a služi za provođenje struje od izvora signala kroz otopinu do radne elektrode. Iako se javljaju u različitim oblicima najčešće su oblika ravnog diska koji je utisnut u štap inertnih materijala poput teflona kako bi se dobila što veća površina jer je tada manja gustoća struje, odnosno manje odstupanje od njenog ravnotežnog stanja U pravilu se na njoj događaju samo reakcije razvijanja kisika i vodika.



Slika 12. Platinska pločica kao protuelektroda [27]

Ove elektrode se mogu koristiti pri širokom rasponu potencijala, a ovisi ne samo o elektrodama već i otopinama u kojima je elektroda uronjena. Kod visokih vrijednosti pozitivnog potencijala dolazi do pojave velikih struja kao posljedica oksidacije vode, pri kojoj nastaju elementarni kisik. S druge strane, pri vrlo negativnim potencijalima zbog

smanjenja vode dolazi do pojave visokih katodnih struja uzrokovani razvijanjem elementarnog vodika [23,28,29].



Slika 13. Troelektrodna elektrolitička ćelija

(2 – protuelektroda, 3 – referentna elektroda, 1– radna elektroda) [30]

1.6.3. Ciklička voltametrija

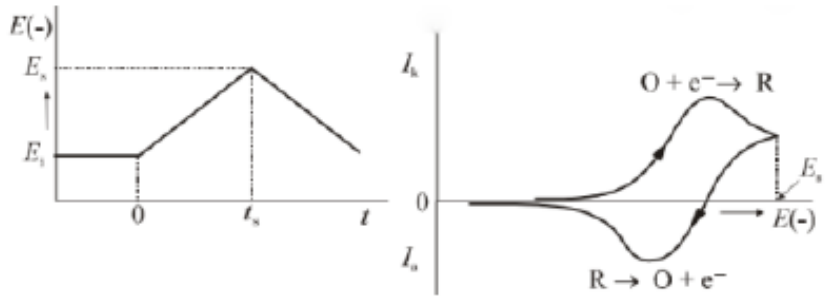
Ciklička voltametrija (*engl. cyclic voltammetry*, CV) se primjenjuje za istraživanje kinetike i mehanizama redoks reakcija, određivanja redoks potencijala i broja izmijenjenih elektrona, istraživanje adsorpcijskih procesa i kemijskih reakcija koje prethode ili slijede prijenos elektrona [31].

Potencijal radne elektrode se mijenja linearno, a smjer promjene potencijala mijenja se kada dosegne određenu vrijednost. U oba smjera promjena potencijala je linearna. U ovim ciklusima moguće je elektrokemijski oksidirati ili reducirati produkte zbog čega je ciklička voltametrija naročito pogodna za istraživanja mehanizama elektrokemijskih reakcija [28,29].

Na slici 14. pokazan je jednostavni oblik signala pobude cikličke voltametrije, zajedno s rezultirajućom strujom odziva za elektrodni proces redukcije. Signal pobude najprije, kroz određeno vrijeme, linearno raste. Kad signal pobude dosegne izabranu vrijednost (E_S), promijeni se smjer posmika potencijala. U povratnom posmiku, potencijal elektrode (E) u bilo kojem trenutku (t), nakon vremena promjene smjera posmika (t_s), ima vrijednost:

$$E = E_i - 2\,v\,t_s + v\,t \qquad (2)$$

gdje je t vrijeme proteklo od početka posmika potencijala, t_S vrijeme promjene smjera posmika i E_i početni potencijal [23].



Slika 14. Signal pobude i signal odziva za cikličku voltametriju [25]

1.6.4. Voltametrija s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude

Voltametriju s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude koji je superponiran na stubasto rastući (padajući) istosmjerni napon (engl. square wave voltammetry) izvorno su predložili Ramaley i Krause , a razvili Osteryoung i suradnici.

Prema načinu mjerenja struje odziva slična je diferencijalnoj impulsnoj voltametriji, u kojoj se struja odziva mjeri kao razlika struje odziva prije i za vrijeme trajanja naponskog impulsa. U voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude struja se mjeri pri kraju trajanja pozitivne i negativne poluperiode izmjeničnog pravokutnog impulsa, a struja odziva se zapisuje kao razlika struja pri jednoj negativnoj odnosno drugoj pozitivnoj poluperiodi izmjeničnoga pravokutnog signala pobude za svaki pojedini ciklus pobude.

Odzivni signal sadrži samo komponentu faradajske struje, to jest struju koja se odnosi na redukciju i oksidaciju elektroaktivne vrste budući da se u voltametriji s pravokutnim izmjeničnim signalom pobude struja odziva mjeri pri kraju trajanja pravokutnog impulsa jedne odnosno druge poluperiode izmjeničnoga signala [23].

Najveća prednost ove tehnike je njena brzina. Frekvencije od 1 do 100 ciklusa u sekundi dopuštaju upotrebu iznimno brzih promjena potencijala čime se skraćuje vrijeme analize pa voltamogram može biti snimljen za nekoliko sekundi [32].

1.6.5. Elektrometrijske metode s otapanjem pretkoncentriranog analita – „Stripping analiza“

U elektroanalitičkim metodama s pretkoncentriranjem rabi se postupak akumulacije određivane molekulske vrste iz otopine u mali volumen živine elektrode ili na površinu čvrste radne elektrode. Nakon depozicije izlučena se tvar otapa s elektrode. Proces otapanja provodi se promjenom potencijala radne elektrode ili kemijskom reakcijom. Mjeri se električna veličina koja ovisi o procesu otapanja. Otapanje depozita s površine elektrode naziva se engleski stripping pa zato i te metode nazivamo "stripping" metodama.

Elektrometrijske metode s pretkoncentriranjem elektroanalitičke su metode velike osjetljivosti. Osjetljivost je metoda i do sto tisuća puta veća od osjetljivosti u klasičnoj polarografiji. Primjenjuju se u analizi vrlo razrijeđenih otopina. Mogu se odrediti koncentracije do 10^{-10}, a čak i do 10^{-12} mol dm^{-3}. Akumulacija odnosno depozicija određivane tvari na površini elektrode može se provesti procesom elektrolize ili adsorpcijom. Rabe se i neki drugi mehanizmi nagomilavanja analita na površinu radne elektrode kao što su: kompleksiranje metalnih iona na površini, ionska izmjena na modificiranoj površini i mehanizam ekstrakcije s prijelazom iona između dvije međusobno netopljive otopine elektrolita. Proces otapanja može se provoditi promjenom potencijala radne elektrode ili provođenjem kontrolirane struje kroz radnu elektrodu ili pak heterogenom kemijskom reakcijom. Uvijek se mjeri električni signal što je uzrokovan procesom otapanja. Taj mjereni signal odziva može biti struja ili potencijal radne elektrode. Razlikujemo stoga više vrsta elektrometrijskih metoda s pretkoncentriranjem [23].

1.6.5.1. Voltametrija anodnog otapanja

Poznata i pod nazivom inverzna voltametrija, metoda je koja se primjenjuje za određivanje malih koncentracija metala u različitim materijalima: pitkoj, morskoj vodi i tehničkim vodama, živežnim namirnicama, različitim biološkim materijalima, rudama itd. Analizirane materijale treba prije provođenja mjerenja prevesti u otopinu.

Postupak voltametrije anodnog otapanja sastoji se iz dva temeljna dijela. Prvi dio čini proces katodnog izlučivanja određivanog metala iz otopine na površinu radne elektrode. Proces izlučivanja provodi se kroz točno određeno vrijeme i uz kontrolirane

hidrodinamičke uvjete (miješanje, vibracija ili rotacija radne elektrode). Izlučeni metal taloži se na površini radne elektrode, odnosno, ako se kao radna elektroda rabi živina elektroda i ako je metal topljiv u živi, otapa se u živi stvarajući amalgam. Nakon procesa depozicije depozit se metala anodno otapa. To se postiže promjenom potencijala radne elektrode. Mjeri se rezultirajuća anodna struja otapanja koja je u relaciji s količinom izlučenog metala na površini radne elektrode odnosno s koncentracijom metala u ispitivanoj otopini. Katodno izlučivanje metala na radnu elektrodu izvodi se pri potencijalu granične struje redukcije. Taj potencijal mora biti za 300-400 mV negativniji od polarografskoga poluvalnoga potencijala redoks-sustava izlučivane tvari. Ako ispitivana otopina sadrži spojeve koji s određivanim metalnim ionom stvaraju stabilne, topljive komplekse, potencijal izlučivanja mora biti još negativniji.

Potencijal radne elektrode pri procesu predelektrolize regulira se, u odnosu prema primijenjenoj referentnoj elektrodi, s pomoću vanjske elektroničke naprave. Istom napravom regulira se tok i brzina promjene potencijala anodnog otapanja. Graničnu struju depozicije povećava se prisilnom konvekcijom, tj. intenzivnim miješanjem otopine tijekom depozicije. Time se skraćuje vrijeme akumulacije. Ako otopina sadržava više različitih iona metala, tada se izborom odnosno promjenom sastava otopine i izborom odgovarajućeg potencijala izlučivanja može postići selektivno izlučivanje metala iz otopine.

U neutralnim vodenim otopinama maksimalni potencijal izlučivanja može biti do -1,5 V, a u kiselim do -1,0 V, prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi. Naime, kod negativnijih potencijala počinje znatnije izlučivanje vodika, pa se na površini elektrode stvaraju mjehurići plina, čime se aktivna površina elektrode smanjuje i nekontrolirano mijenja. Maksimalni potencijal depozicije ovisi i o vrsti materijala od kojeg je izrađena radna elektroda.

Živa je najprikladniji materijal za radne elektrode u metodama s pretkoncentriranjem. Razlog je tome veliki prenapon vodika na živi i jednostavna obnovljivost radne površine elektrode. Primjenom živine elektrode moguće je istodobno odrediti veći broj različitih iona metala u ispitivanoj otopini. Naime, difuzija izlučenih metala u tekućoj živi omogućuje sukcesivnu oksidaciju izlučenih metala iz žive pri procesu anodnog otapanja. Kod upotrebe čvrstih elektroda istodobno određivanje većeg

broja metala nije provedivo zbog nemogućnosti difuzije izlučenih metala kroz čvrstu fazu na površini (čvrste) radne elektrode. Naime, depozit na površini radne elektrode čini u potonjem slučaju kruta smjesa izlučenih metala. Za vrijeme katodnog izlučivanja kroz ćeliju teče relativno malena katodna struja.

Od živinih elektroda u anodnoj "stripping" voltametriji najčešće se rabe živina kap i živin film. Pri katodnoj depoziciji koncentriramo metal iz otopine u živinu kapljicu ili u tanki sloj (film) žive. Koncentracija nastalog amalgama ovisi o mnogim čimbenicima. To su: trajanje katodnog izlučivanja, volumen žive, koncentracija iona metala u analiziranoj otopini i hidrodinamički uvjeti depozicije [23].

1.6.5.2. Voltametrija katodnog otapanja

Uz voltametriju anodnog otapanja postoji i voltametrija katodnog otapanja. To je elektroanalitička metoda u kojoj se depozit na površini živine elektrode stvara taloženjem teško topljivoga spoja nastalog reakcijom određivane tvari iz otopine i Hg(I) iona oslobođenih anodnim otapanjem žive same elektrode. Nakon procesa depozicije promjenom potencijala elektrode izvodi se redukcija iona Hg(I) iz depozita. Mjeri se katodna struja koja rezultira iz procesa otapanja kao funkcija potencijala radne elektrode [23].

1.6.6. Polarografija

Klasična polarografija elektroanalitička je metoda koju je godine l922. otkrio Jaroslav Heyrovský. Općenito, polarografskim metodama nazivamo različite elektroanalitičke tehnike u kojih se kao radna elektroda primjenjuje kapajuća živina elektroda. Klasična polarografija i ostale polarografske metode pripadaju u skupinu elektroanalitičkih postupaka u kojih je signal pobude električni napon [23].

1.6.7. Kapajuća živina elektroda

Kapajuća živina elektroda sastoji se od staklene kapilare duljine 5 - 20 cm, unutrašnjeg promjera od 0,05 do 0,08 mm. Kapilara je povezana fleksibilnom cijevi s rezervoarom za živu. Zbog tlaka živina stupca kroz kapilaru protječe živa. Na otvoru kapilare stvara se kap koja, pošto dostigne određenu veličinu, kapa u elektrolitnu ćeliju. Promjenom visine stupca žive (h), odnosno visine rezervoara za živu, mijenja se tlak potiskivanja žive kroz kapilaru, a time i brzina istjecanja žive. Živa, potisnuta tlakom

živina stupca, oblikuje na otvoru kapilare kap, praktično pravilnoga kuglastoga oblika. Kap žive drži se na otvoru kapilare zbog površinske napetosti žive. Kad masa kapi poraste toliko da je napetost površine više ne može zadržati, kap otpada s otvora kapilare. Promjer kapi žive u trenutku otkidanja ovisi o promjeru otvora kapilare i o površinskoj napetosti žive u ispitivanoj elektrolitnoj otopini.

U primjeni voltametrije i cikličke voltametrije u analitičkoj praksi najčešće se rabe živine elektrode kao što je kapajuća živina elektroda. Pri uporabi te elektrode posmik potencijala pobude mora biti usklađen s vremenom kapanja živine kapajuće elektrode. To se postiže mehaničkim otkidanjem kapi žive. Budući da se površina kapi žive u kapajuće elektrode mijenja, primjenu signala pobude najpovoljnije je započeti u zadnjem dijelu trajanja živine kapi i završiti neposredno prije otkidanja kapi. U tom dijelu života kapi žive najmanja je relativna promjena površine kapi. Može se uzeti da je, kod velike brzine posmika odnosno kratkog vremena mjerenja, radna površina kapajuće živine elektrode praktično konstanta.

Mnogi metali otapaju se u živi i stvaraju amalgam. Tako atomi metala izlučeni redukcijom iona metala iz otopine difundiraju s površine živine kapi u njezinu unutrašnjost. Tako površina živine kapi nije prekrivena slojem izlučenog metala, kao što bi se dogodilo na čvrstoj radnoj elektrodi, npr. platinskoj mikroelektrodi. Otapanjem metala u živi i difuzijom u unutrašnjost kapi smanjuje se aktivitet izlučenog metala na površini živine kapi. Time se mijenja i elektrodni potencijal izlučenog metala.

Vrlo važno svojstvo kapajuće živine elektrode proizilazi iz svojstva žive da neke elektrodne reakcije na živi imaju velik prenapon. Posebnu važnost ima veliki prenapon izlučivanja vodika na živi. Tako proces redukcije vode (odnosno vodikovih iona) počinje kod znatno negativnijeg potencijala od ravnotežnoga. Zapravo izlučivanje vodika na živi počinje kod znatno negativnijega potencijala od potencijala izlučivanja na drugim (metalnim) elektrodama. To svojstvo žive omogućuje primjenu kapajuće živine elektrode za praćenje procesa redukcije u širem području potencijala.

Glavni nedostatak žive kao radne elektrode jest relativno nizak potencijal oksidacije žive. Već pri potencijalu od +0,4 V, u odnosu prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi, živa se otapa, stvarajući Hg(I)-ione. Rezultirajuća struja oksidacije žive prekriva struju oksidacije elektroaktivne tvari iz otopine i tako onemogućuje primjenu živine elektrode u studiju procesa oksidacije. Stoga se živina elektroda može uporabiti

samo pri oksidaciji lako oksidirajućih tvari, koje se oksidiraju do potencijala od oko +0,4 V prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi.

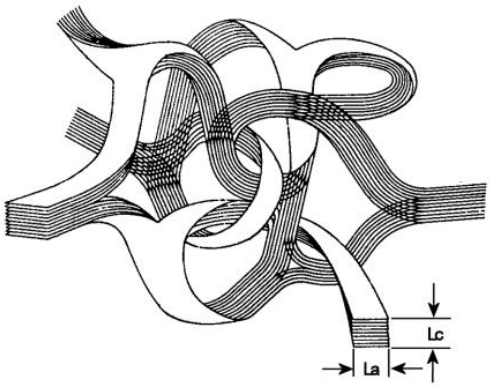
Otrovnost živinih para zahtijeva i primjerne postupke zaštite pri radu sa živinom kapajućom elektrodom. Treba spriječiti rasipanja žive po radnom prostoru i redovito prozračivati radne prostorije [23].

1.6.8. GCE u elektroanalitičkim mjerenjima

Staklasti ugljik je materijal koji kombinira svojstva stakla i keramike sa svojstvima grafita. Najvažnija od tih svojstava su: otpornost na visoke temperature, tvrdoća, niska gustoća, niska električna otpornost, niska toplinska otpornost, visoka kemijska otpornost i nepropusnost za plinove i tekućine.

Struktura staklastog ugljika odavno je predmet rasprava. Rani strukturni modeli su pretpostavljali da su prisutni atomi sp^2 i sp^3 hibridizirani, dok se danas zna da se radi samo o sp^2. U novijim istraživanjima se sugerira da staklasti ugljik ima strukturu povezanu s fulerenom (slika 15.). Staklasti ugljik naširoko se koristi kao elektrodni materijal u elektrokemiji [33,34]

Stakleni ugljik je korišten kao indikatorska elektroda u voltametriji. To je električki vodljiv materijal pogodan za uporabu u području potencijala od oko +1,2 V do -0,8 V [35].



Slika 15. Struktura staklastog ugljika [36]

Elektroda se pripravlja utiskivanjem valjčića ili pločice staklastoga ugljika u teflonski nosač ili se staklasti ugljik zalijepi aralditnim ljepilom u staklenu cjevčicu. Površina elektrode od staklastog ugljika može se modificirati nanošenjem sloja drugog materijala. U ovom slučaju to je sloj žive koji se nanosi pri konstantnom potencijalu iz otopine u kojoj je određena koncentracija žive. Elektrodom sa slojem žive postiže se velika osjetljivost i selektivnost prilikom određivanja [23].

1.7. Kalibracijski postupci

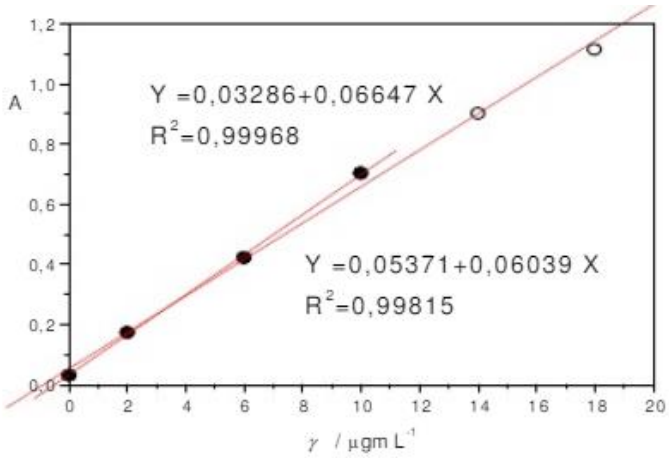
U svrhu kvantitativnog određivanja sastava uzorka metode instrumentalnih određivanja koncentracije analita mogu biti apsolutne, tj. ne zahtijevaju kalibraciju da bi se dobio podatak o koncentraciji iz izlaznog signala instrumenta. Osjetljivost određivanja može se odrediti direktno iz teoretske ovisnosti signala i koncentracije analita. Takve su metode npr. kulometrija i kulometrijska titracija ili elektrogravimetrija. Sve ostale instrumentalne metode su relativne i time zahtjevaju kalibraciju [37].

1.7.1. Krivulja umjeravanja

Krivulja umjeravanja prikazuje ovisnost signala prema količini analita (npr. koncentraciji) dobiven mjerenjem signala serije standarda (standardnih otopina) pri točno određenim uvjetima.

Krivulje umjeravanja nisu uvijek linearne, često su kod niskih ili visokih koncentracija krivulje, a linearni je dio negdje u sredini takvog dijagrama (slika 16.). Takav linearni dio odnosa signala prema koncentraciji često se naziva dinamičkim područjem. Dinamički dio krivulje umjeravanja može se prikazati jednadžbom pravca $y = a + bx$, gdje je y signal dobiven s instrumenta, a je signal slijepe probe (tj. odsječak na osi signala (y), b je nagib pravca za ispitivani sustav (signal vs. koncentracija) koji odgovara osjetljivosti postupka, a x je koncentracija analita. Ako se instrument baždari na jednu čvrstu točku sa slijepom probom, najčešće jednaku nuli, jednadžba postaje jednadžba pravca kroz ishodište, a kalibracijski pravac postaje pravac kroz ishodište.

Krivulja umjeravanja je najbolja metoda kalibracije ukoliko je utjecaj matrice zanemariv i ne ovisi o koncentraciji analita. Osim toga nužno je da su instrumenti na kojima se mjeri stabilni [37].

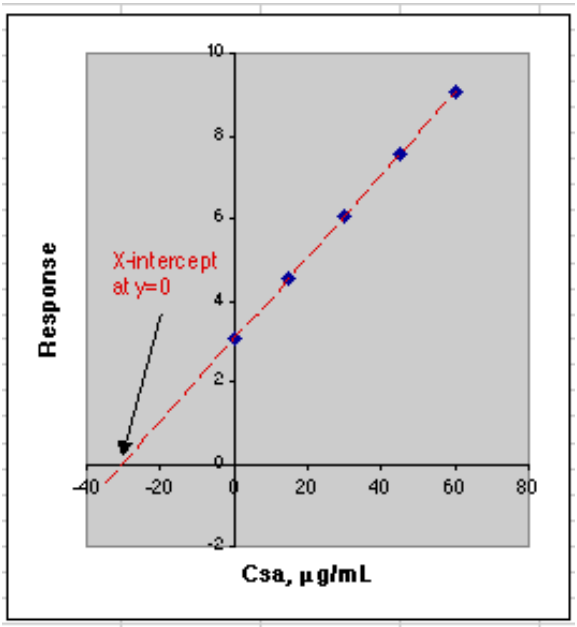


Slika 16. Primjer krivulje umjeravanja za ovisnost apsorbancije o masenoj koncentraciji [38]

1.7.2. Metoda standardnog dodatka

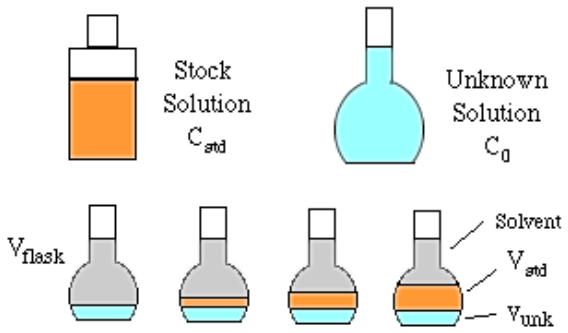
Metoda standardnog dodatka sastoji se od najmanje tri koraka. Prvi je mjerenje signala analita iz uzorka, drugi dodavanje poznate koncentracije analita, a treći ponovljeno mjerenje signala analita. Sa samo jednim dodatkom poznate koncentracije analita (drugi i treći korak) nužna je pretpostavka da smo u linearnom dijelu odnosa signala i koncentracije analita. Slijedeći dodaci standardne otopine analita omogućuju veću preciznost i dokazuju ili opovrgavaju pretpostavku o linearnosti odziva prema koncentraciji. Najpreciznji rezultati se dobiju ako je koncentracija prvog dodatka jednaka najmanje dvostrukoj koncentraciji analita u uzorku. Na slici 17. prikazan je primjer dijagrama za ovu metodu.

Metoda standardnog dodatka je posebno korisna kada je utjecaj matrice na određivanje analita znatan ili kada su koncentracije analita u uzorku vrlo blizu granice određivanja. Metodom standardnog dodatka utjecaj matrice postoji, ali je konstantan za sva mjerenja. I kod ovog postupka kalibracije važna je stabilnost mjernog instrumenta [37].



Slika 17. Primjer dijagrama za metodu standardnog dodatka (response = odziv; intercept= odsječak) [39]

Metoda standardnog dodatka može se objasniti na sljedećem primjeru: u svaku od četiri tikvice istog volumena ($V_{tikvice}$) dodan je jednak volumen (V_{nep}) otopine nepoznate koncentracije (c_o). Zatim je u drugu, treću i četvrtu tikvicu sukcesivno dodavan određeni volumen (V_{std}) otopine poznate koncentracije (c_{std}), te su sve tikvice dopunjenje otapalom do oznake (slika 18.).



Slika 18. Primjer za objašnjenje metode standardnog dodatka (stock solution = standardna otopina; c_{std} = koncentracija standardne otopine; unknown solution = nepoznata otopina; c_o = koncentracija nepoznate otopine; solvent = otapalo; V_{flask} = $V_{tikvice}$; V_{unk} = V_{nep} – volumen nepoznate otopine; V_{std} = volumen standardne otopine; c_{unk} = c_{nep} – stvarna koncentracija u tikvici) [39]

Stvarna koncentracija u bilo kojoj od tikvica dana je izrazom:

$$c_{nep} = (c_o \cdot V_{nep} + c_{std} \cdot V_{std}) / V_{tikvice} = c_o \cdot V_{nep} / V_{tikvice} + c_{std} \cdot V_{std} / V_{tikvice} \quad (3)$$

instrumentalni odgovor na analit će biti R=(K) (koncentracija), pa slijedi:

$$R = K \cdot c_o \cdot V_{nep} / V_{tikvice} + K \cdot c_{std} \cdot V_{std} / V_{tikvice} \quad (4)$$

ako je $c_{sa} = c_{std} \cdot V_{std} / V_{tikvice}$ (5), slijedi:

$$R = K \cdot c_o \cdot V_{nep} / V_{tikvice} + K \cdot c_{sa} \quad (6)$$

$$y = b + m \cdot x \quad (7)$$

Nakon mjerenja signala serije standardnih dodataka, rezultati su prikazani na grafu (slika 17.), te je pravac produžen do x osi gdje je y = 0 kako bi se dobila vrijednost c_{sa} koja je jednaka signal nepoznatog uzorka [39].

$$0 = K \cdot c_o \cdot V_{nep} / V_{tikvice} + K \cdot c_{sa} \quad (8)$$

$$c_o = - c_{sa} V_{tikvice} / V_{nep} \quad (9)$$

2. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu rada određivan je hiperakumulacijski potencijal biljke *Lunaria annua* L. u tlu kontaminiranim bakrom i olovom. Određivane su koncentracije bakra i olova prije sijanja (u sjemenkama), nakon što je biljka ubrana te u ispitivanom tlu.

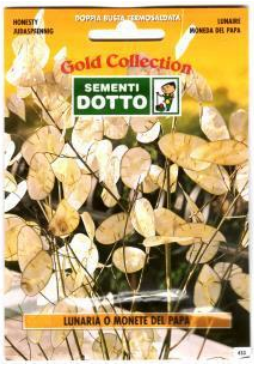
U ovom diplomskom radu su korištena dva tipa tla: komercijalo dostupno organsko tlo (COMPO SANA^{R}, COMPO GmbH, Gildenstr. 38, D-48157 Munster), u daljnjem tekstu - TLO 2 (Slika 19.) i uzorak tla uzet s 30 cm dubine iz Botaničkog vrta u Splitu. U daljnjem tekstu - TLO 1 (Slika 20.). Uz ova dva tla korišteno je sjeme biljke *Lunaria annua* L. (Sjeme d.o.o.) (Slika 21.).



Slika 19. COMPO SANA^{R} [40]



Slika 20. Botaničko tlo



Slika 21. Sjeme biljke *Lunaria annua* L. [41]

2.1. Priprava otopina

Tablica 3. Korištene kemikalije

KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	DOBAVLJAČ
olovljev nitrat	$Pb(NO_3)_2$	T.T.T. d.o.o.
bakrov nitrat	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	Kemika d.d., Zagreb
kalijev nitrat	KNO_3	T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja
dušična kiselina	HNO_3	Merck KGaA, Darmstadt
sumporna kiselina	H_2SO_4	Kemika d.d., Zagreb
fosforna kiselina	H_3PO_4	T.T.T. d.o.o.
klorovodična kiselina	HCl	VWR Chemicals
etanol	C_2H_5OH	Gram-Mol d.o.o., Zagreb
živin (II) nitrat monohidrat	$Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$	Kemika d.d., Zagreb

2.1.1. Priprava 0,1 M $Pb(NO_3)_2$

Otopina 0,1 M $Pb(NO_3)_2$ je pripravljena prema navedenom izračunu i postupku:

Mr $[Pb(NO_3)_2]$ = 331,21 g/mol

V (otopine) = 50 mL = $50 \cdot 10^{-3}$ L

c (Pb) = 0,1 mol/L

$c = n/V \quad \rightarrow \quad n = c \cdot V = 10^{-1}$ mol/L $\cdot 50 \cdot 10^{-3}$ L = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol

$m = n \cdot M = 5,0 \cdot 10^{-3}$ mol $\cdot$ 331, 21 g/mol = 1,6561 g

Izvagano je 1,6561 g $Pb(NO_3)_2$, otopljeno u maloj količini destilirane vode, kvantitativno preneseno u odmjenu tikvicu volumena 50 mL te nadopunjeno do oznake.

2.1.1.1. Priprava standardnih otopina olovljevih (II) kationa

Otopine Pb^{2+} različitih koncentracija (10^{-6}; 10^{-5}; 10^{-4}; 10^{-3}; 10^{-2}; 10^{-1}) pripravljene su iz 0,1 M $Pb(NO_3)_2$ tako što je otpipetirano 2,5 mL te otopine, preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjeno do oznake.

Primjer za razrijeđenje:

$c_1 = 1 \cdot 10^{-1}$ mol/L

$c_2 = 1 \cdot 10^{-2}$ mol/L

$V_1 = x$

$V_2 = 25mL = 25 \cdot 10^{-3}$ L

$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \rightarrow V_1 = (c_2 \cdot V_2) / c_1 = (1 \cdot 10^{-2}$ mol/L $\cdot 25 \cdot 10^{-3}$ L) / 10^{-1} mol/L = 2,5 mL

Istim postupkom pripremljene su i ostale standardne otopine.

2.1.2. Priprava 0,1 M $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$

Otopina 0,1 M $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ pripravljena je na isti način kao i otopina 0,1 M $Pb(NO_3)_2$

Mr [$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$] = 241,60 g/mol

V (otopine) = 50 mL = $50 \cdot 10^{-3}$ L

c (Cu) = 0,1 mol/L

$c = n/V \rightarrow n = c \cdot V = 10^{-1}$ mol/L $\cdot 50 \cdot 10^{-3}$ L = $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol

$m = n \cdot M = 5,0 \cdot 10^{-3}$ mol $\cdot$ 241,60 g/mol = 1,208 g

Izvagano je 1,208 g $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, otopljeno u maloj količini destilirane vode, kvantitativno preneseno u odmjenu tikvicu volumena 50 mL te nadopunjeno do oznake.

2.1.2.1. Priprava standardnih otopina bakrovih (II) kationa

Otopine Cu^{2+} različitih koncentracija (10^{-6}; 10^{-5}; 10^{-4}; 10^{-3}; 10^{-2}; 10^{-1}) pripravljene su iz 0,1 M $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$. tako što je otpipetirano 2,5 mL te otopine,

preneseno u odmjernu tikvicu od 25 mL te nadopunjeno do oznake. Vrijedi isti postupak razrijeđenja kao i kod otopina olova. Istim postupkom pripremljene su i ostale standardne otopine.

2.1.3. Priprava 1 M HNO_3

1 M HNO_3 pripravljena je otapanjem 6,93 mL 65%-tne HNO_3 u 100 mL destilirane vode. Ova pripravljena otopina je korištena za pripremu otopine za taloženje žive.

2.1.4. Priprava 0,01 M H_3PO_4

0,01 M H_3PO_4 pripravljena je miješanjem 6,74 mL 85%-tne H_3PO_4 u 100 mL destilirane vode.

2.1.5. Priprava otopine H_2SO_4

U odmjernu tikvicu od 1000 mL dodano je otprilike 200 mL destilirane vode, zatim je dodano 27,77 mL 96%-tne H_2SO_4 te nadopunjeno do oznake. Koncentracija ove otopine je 0,5 M. Otopina je korištena za elektrokemijsko čišćenje radne elektrode.

2.1.6. Priprava otopine živinog (II) nitrata monohidrata ($Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ + HNO_3 + KNO_3)

U odmjernu tikvicu od 2000 mL dodano je 20 mL 1 M HNO_3, zatim 20,22 g KNO_3 prethodno otopljenog u destiliranoj vodi, te 0,70 g $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ koji je također prethodno otopljen u malo destilirane vode. Potom je tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Ovako pripremljena otopina ima koncentraciju $1 \cdot 10^{-3}$ M $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$, $1 \cdot 10^{-2}$ M HNO_3 i $1 \cdot 10^{-1}$ M KNO_3, a korištena je za pripremu otopine za taloženje žive.

2.1.7. Priprava otopine za nanošenje žive ($2 \cdot 10^{-4}$ M $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$; $1 \cdot 10^{-2}$ M HNO_3; $1 \cdot 10^{-1}$ M KNO_3)

U odmjenu tikvicu volumena 1000 mL dodano je 200 mL otopine živinog (II) nitrata monohidrata, zatim je dodano 8 mL 1 M HNO_3, te 8,08 g KNO_3 koji je otopljen u malo destilirane vode. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Ovako pripremljena otopina korištena je kao elektrolit za taloženje sloja žive na radnu elektrodu.

2.1.8. Priprava otopine HNO_3 + H_3PO_4

Za pripravu ove otopine, 692,5 μL 65 %-tne HNO_3 je dodano u 674,3 μL 85 %-tne H_3PO4 te otopljeno u 1000 mL destilirane vode. Otopina je korištena kao osnova za cikličku voltametriju i stripping analizu.

2.1.9. Priprava otopine zlatotopke

6 mL konc. HCl i 2 mL konc. HNO_3 (8 mL zlatotopke) dodano je u odmjernu tikvicu od 50 mL te dopunjeno destiliranom vodom do oznake.

2.1.10. Priprava uzorka tla

Prije provođenja mjerenja, uzorci TLA 1 i TLA 2 su sušeni u laboratoriju na zraku, na sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, tla su prosijana kroz sita veličina pora 2,5 mm, 1 mm, 0,5 μm, 0,25 μm. Tako prosijan uzorak je spreman za kemijsku analizu.

Izvagano je 1,0020 g uzorka TLA 1 i 1,0602 g uzorka TLA 2 te preneseno u porculansku posudicu za žarenje. Posude s uzorkom stavljene su na žarenje u žarnu peć na temperaturu od 550 °C oko 3 h. Ohlađeni pepeo preliven je sa 8 mL zlatotopke (6 mL konc. HCl i 2 mL konc. HNO_3). Otopina je kvantitativno prenesena filtriranjem kroz filter papir (kvantitativni filter papir najfinijeg poroziteta) u odmjerne tikvice od 50 mL. Tikvice su ohlađene do sobne temperature, a nakon toga nadopunjene deioniziranom vodom do oznake.

TLO 2 prema podacima na deklaraciji sadrži 12,3 mg/kg bakra i 10,22 mg/kg olova.

Nakon priprave svih potrebnih otopina i kemikalija određivane su koncentracije bakra i olova u dva uzorka tla te u sjemenu biljke *Lunaria annua L.*. Kako bi se odredila koncentracija olova i bakra koju je biljka akumulirala, biljka je posijana u četiri posude (dvije s TLO 1 i dvije s TLO 2). Prilikom proces rasta biljke su zalijevane ili s vodom ili s otopinom za zalijevanje biljke (smjesa otopine olova i bakra). Nakon što su biljke izrasle, određivane su koncentracije olova i bakra u biljci te u tlu u kojem su biljke rasle.

2.1.10.1. Određivanje kiselosti tla prije sijanja

Postupak:

1. U dvije čašice od 50 mL izvagano je po 10 g na zraku osušenog tla.

2. U jednu čašicu je dodano 25 mL prokuhane destilirane vode, a u drugu 25 mL 0,1 M otopine KCl-a. Destilirana voda koja se koristi u eksperimentu treba biti zagrijana do vrenja, a zatim ohlađena do sobne temperature, radi odstranjivanja otopljenog CO_2 koji snižava pH-reakcije.

3. Suspenzije u obje čašice trebaju odstajati najmanje 30 min, uz povremeno miješanje, a čašice trebaju biti pokrivene satnim staklom.

4. Reakcija tla se mjeri pH-metrom (slika 22.) pomoću kombinirane elektrode. Prije mjerenja potrebno je baždariti pH-metar pomoću pufera poznatog pH i profiltrirati.

5. Prema izmjerenoj pH-reakciji tlo se svrstava u jednu od grupa.



Slika 22. pH-metar

2.1.11. Priprava otopine sjemena biljke *Lunaria annua* L.

Oko 1 g uzorka sjemena je žareno na 550^{o}C 2,5 – 3 sata, izvađeno i ostavljeno u eksikatoru da se ohladi na sobnu temperaturu (cca 45 min). Nakon hlađenja uzorak je

otopljen u 5 mL zlatotopke, zagrijan, filtriran u tikvice od 50 mL te nadopunjen ultra čistom vodom do konačnog volumena.

2.1.12. Priprava otopine za zalijevanje biljke (Pb/Cu)

Otopina za zalijevanje biljke i sjemena pripravljena je otapanjem 7,9491 g $Pb(NO_3)_2$ i 4,5011 g $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ u 3 L vode. Koncentracija metalnih iona u ovako pripravljenoj otopini je iznosila 8mM.

2.2. Sijanje

U četiri plastične posude zasijana je biljka (Slika 23.). U prve dvije posude korišteno je komercijalno dostupno organsko tlo a u preostale dvije botaničko tlo. U tim posudama napravljene su kombinacije dodataka tlu:

Tablica 4. Kombinacije tla

	SJEME BILJKE	**H_2O**	**Pb/Cu**
POSUDA 1 (TLO 2)	x	x	
POSUDA 2 (TLO 2)	x		x
POSUDA 3 (TLO 1)	x	x	
POSUDA 4 (TLO 1)	x		x



Slika 23. Zasijane biljke

2.2.1. Priprava otopina uzoraka tla nakon što je biljka izrasla

Četiri tla u kojem su biljke rasle također su analizirana nakon priprave njihovih otopina na isti način kao priprava otopina uzoraka tla prethodno opisana u 2.1.10. dijelu.

2.2.2. Priprava uzoraka biljaka

Izrasle biljke (Slika 24.) izvučene su iz tla, osušene na zraku, stavljene u lončiće i sušene u peći na 550 ^{o}C 2-3 sata. Završetkom sušenja izvađene su i ostavljene u eksikatoru kako bi se ohladile na sobnu temperaturu (cca 45 min). Nakon hlađenja otopljene su u 5 mL zlatotopke, zagrijane, filtrirane u tikvice od 50 mL te nadopunjene ultra čistom vodom do konačnog volumena.



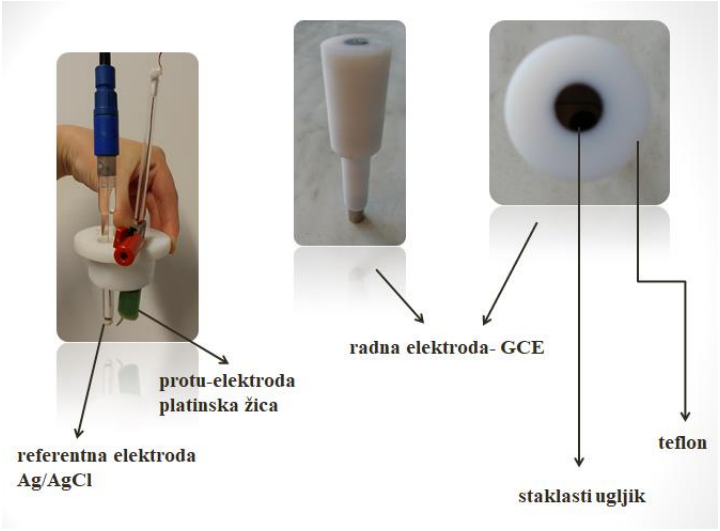
Slika 24. Izrasle biljke

2.3. Aparatura i elektrodni materijal

2.3.1. Aparatura

Korištena je elektrokemijska ćelija sa platinskom pločicom kao protuelektrodom, srebro/srebrov klorid, Radiometer XR 300 (3 M Ag/AgCl) kao referentnom elektrodom te elektrodom od staklastog ugljika (glassy carbon electrode - GCE) kao radnom elektrodom. (Slika 25.)

Sva elektrokemijska mjerenja su izvršena s potenciostatom (Autolab PGSTAT 302N) spojenim na osobno računalo (PC), a kojim se upravlja pomoću GPES 4,9 Softwarea (Eco Chemie).



Slika 25. Elektrode

Elektrokemijska ćelija je od staklenog materijala izvedena u obliku konusa koja je prije svakog mjerenja pripremljena na sljedeći način:

a) ispiranje konc. dušičnom kiselinom

b) ispiranje vodovodnom vodom

c) ispiranje destiliranom vodom

d) ispiranje malom količinom elektrolita koji se koristi za slijedeće mjerenje

Ispiranjem konc. HNO_3 osigurava se uklanjanje eventualnih nečistoća ili ostataka metala iz prethodnih mjerenja.

Ispiranjem malom količinom elektrolita koji se koristi za mjerenje osigurava se zadržavanje njegove pripremljene koncentracije.

2.3.2. Priprava radne elektrode

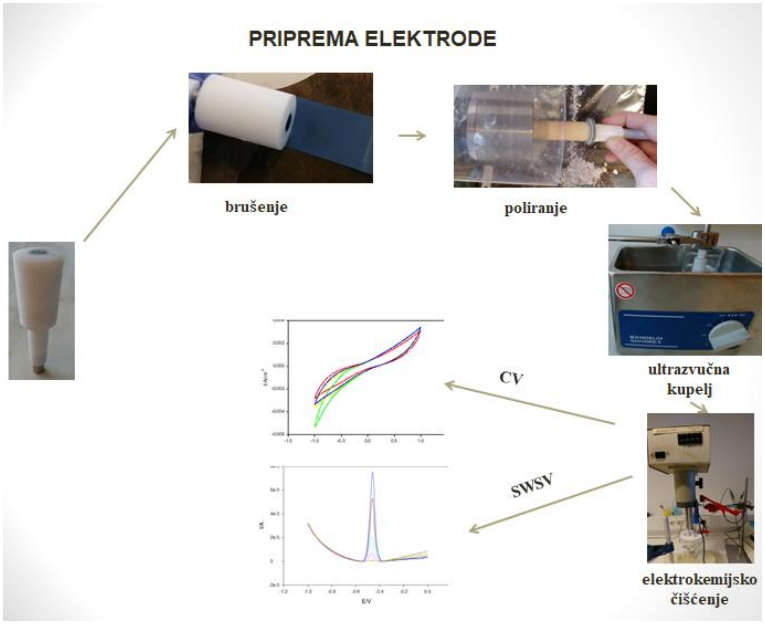
Za provođenje mjerenja (CV ili SWSV-a), površina GCE elektrode je pripremljena u četiri koraka (Slika 26.).

Prvi korak je uključio brušenje elektrode s četiri brus papira različitih granula abraziva (1200, 1500, 3000, metalografski).

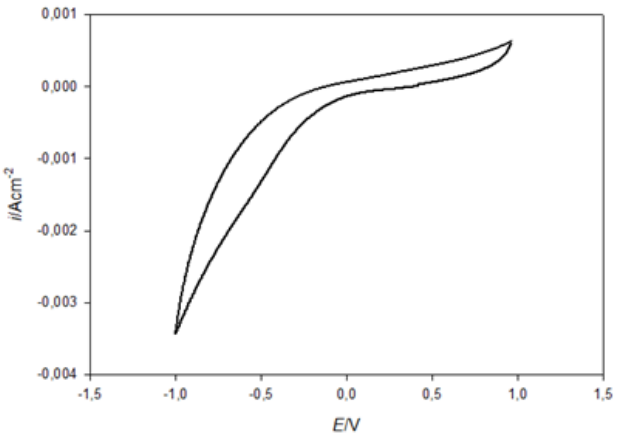
Nakon toga je slijedio proces poliranja elektrode suspenzijom aluminijevog oksida Al_2O_3 (1 µm i 0,05 µm).

Treći korak pripreme uključio je čišćenje elektrode etanolom (EtOH) oko 3 minute u ultrazvučnoj kupelji.

Posljednji korak je elektrokemijska priprema u 0,5 M H_2SO_4 bez rotacije u području potencijala -1 V do 1 V, brzinom skeniranja od 0,2 V/s.



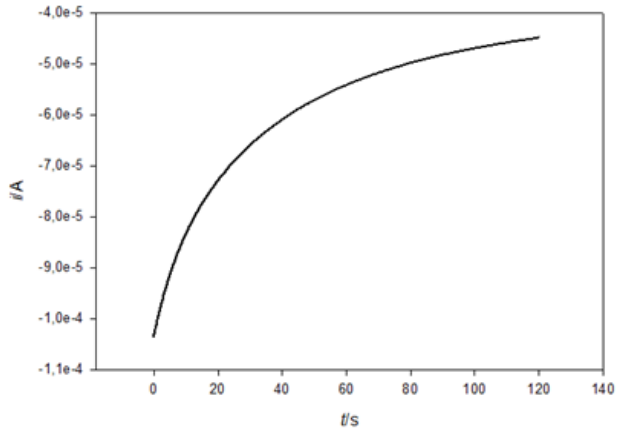
Slika 26. Priprema elektrode



Slika 27. Ciklički voltamogram elektrokemijske pripreme GCE u 0,5 M H_2SO_4. Parametri: početni potencijal: 0 V, posmik: 0,2 V/s.

2.3.3. Taloženje žive na površinu radne elektrode

Nakon ovako pripravljenu površinu radne elektrode vršilo se taloženje žive pri konstantnom potencijalu od -1 V u trajanju od 120 s bez miješanja otopine. Taloženje žive se vršilo dodatkom 50 mL otopine elektrolita sastava 0,1 M KNO_3 + 0,01 M HNO_3 + $2 \cdot 10^{-4}$ M $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$.



Slika 28. Ovisnost gustoće struje (*i*) o vremenu taloženja (*t*) za katodnu redukciju Hg^{2+} iz otopine $2 \cdot 10^{-4}$ M $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$; $1 \cdot 10^{-2}$ M HNO_3; $1 \cdot 10^{-1}$ M KNO_3; $E_{redukcije}$= -1V; t=120 s

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Kiselost tla prije sijanja

Izmjerene vrijednosti pH:

pH TLO 1 (botaničko tlo) = 8,58 → umjereno lužnato

pH TLO 2 (organsko tlo) = 6,35 → slabo kiselo do neutralno

Na unos metala u biljku najveći utjecaj imaju pH tla i koncentracija tog metala u tlu. Prema literaturnim podatcima, s opadanjem pH tla povećava se dostupnost metala u tlu pa ih biljke lakše prihvaćaju tj. što je pH tla veći, to je manja mogućnost akumulacije metala [42].

Važnost pH vrijednosti tla je u tome što su hranjive tvari pri različitim stupnjevima kiselosti različito dostupne biljkama za apsorpciju pa se regulacijom pH regulira dostupnost hranjivih tvari biljkama. Idealna pH vrijednost je između 6,5 i 6,8.

pH vrijednost tla direktno i indirektno utječe na mobilnost, tj. zadržavanje metala u tlu. Dok u tlima s višim vrijednostima pH dolazi do adsorpcije, u tlima s nižim vrijednostima većina kationa metala je bolje pokretljiva (topljiva).

Za biodostupnost bakra optimalan pH je između 4,5 i 6, dok mobilnost olova ne ovisi o pH vrijednosti tla i prilično je mala zbog njegove sklonosti vezanja na organsku tvar tla [43,44].

3.2. Elektrokemijsko ponašanje i određivanje olovljevih (II) kationa na elektrodama od staklastog ugljika

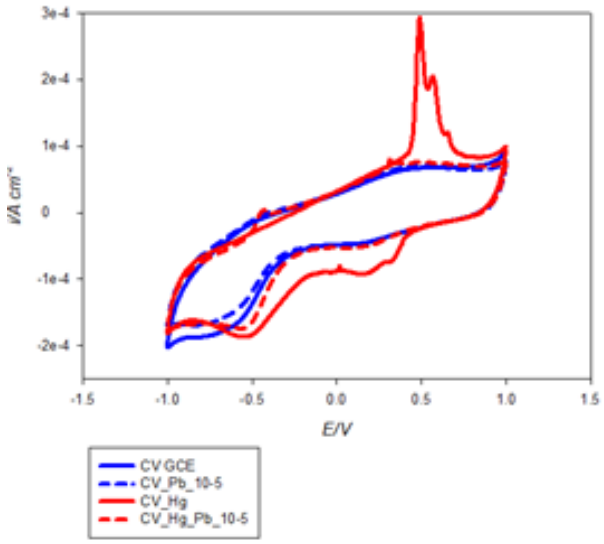
3.2.1. Elektrokemijsko ponašanje olovljevih (II) kationa na modificiranim i nemodificiranim elektrodama od staklastog ugljika

Elektrokemijsko ponašanje olovljevih (II) kationa je proučavano metodom cikličke voltametrije u granicama potencijala od -1 V do 1 V. Dobiveni ciklički voltamogrami za obje (modificirana GCE-Hg i nemodificirana GCE) elektrode su prikazani na slici 29.

Kao što je vidljivo, značajne promjene u elektrokemijskom ponašanju GCE nisu uočene. Za razliku od ove elektrode ciklički voltamogram za modificiranu GCE-Hg upućuju na anodne procese (oko +0,5 V) koji se pripisuju intezivnom otapanju filma žive. Ovu anodnu oksidaciju prati i pojava katodnog procesa na +0,25 V. S obzirom na

nedefiniranost pika ovaj proces je kontroliran difuzijom Hg^{2+} iona nastalih anodnim otapanjem. Interesantno, ciklički voltamogram GCE-Hg dobiven u prisutnosti Pb^{2+} ne sugerira na gore navedene procese, indicirajući da je E^0 amalgama Hg-Pb (za bilo koji anodni proces sloja) izvan granica ovih ispitivanih potencijala.

U anodnoj dijelu pik na -0,5 V upućuje na anodno otapanje Pb^{2+}.

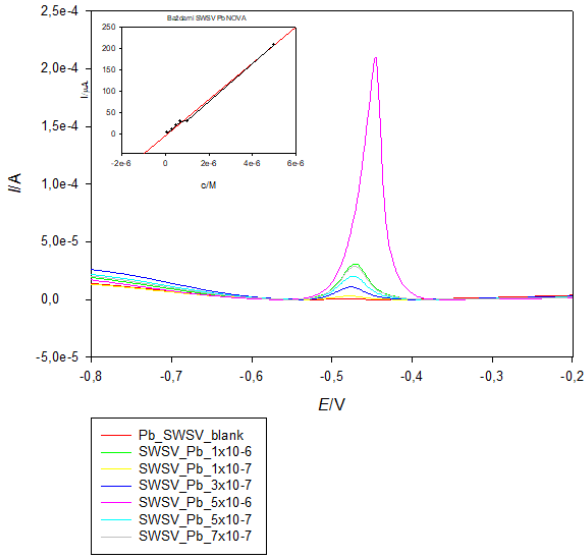


Slika 29. Ciklički voltamogrami za nemodificiranu (GC) i modificiranu (GC-Hg) elektrodu

3.2.2. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg

Nakon utvrđivanja ponašanja Pb^{2+} na GCE-Hg rađena je „stripping“ anodna voltametrija na GCE-Hg u svrhu elektrokemijskog određivanja olova, pri različitim koncentracijama. Dobiveni voltamogram je prikazan na slici 30. zajedno s parametrima anodnog otapanja.

Krivulja umjeravanja ovisnosti anodne struje otapanja o koncentraciji Pb^{2+} je dobivena očitavanjem struje vrha pika za različite koncentracije Pb^{2+}.



Slika 30. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za različite koncentracije Pb^{2+} na GCE-Hg. Vrijeme akumulacije: 60s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1 V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

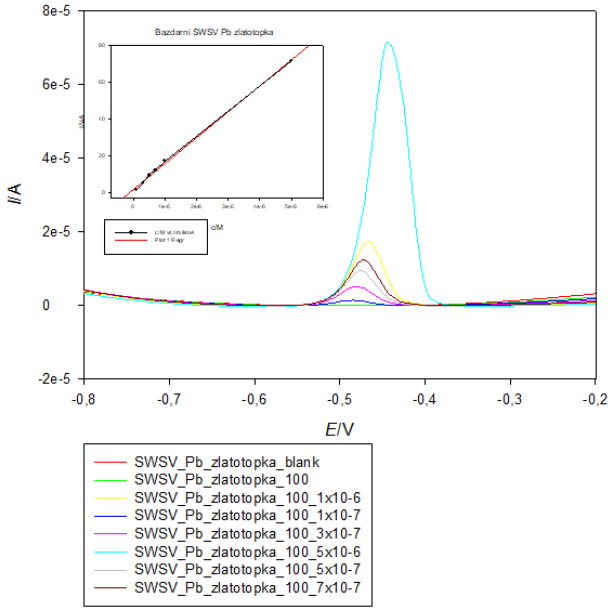
3.2.3. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom uz prisustvo zlatotopke

Za izjednačavanje uvjeta mjerenja, odnosno eliminiranje utjecaj matrice u uzorcima tla, napravljeno je mjerenje s dodatkom otopine zlatotopke.

Unosom realnog uzorka unosile su se i vrste koje imaju afinitet kompleksiranja Pb^{2+} od kojih su najvažniji kloridi. Njihov utjecaj je posebice uočljiv u smanjenju osjetljivosti same metode tj. došlo je do smanjenja anodnih struja u odnosu na prethodno mjerenje, što znači da dodatkom zlatotopke radna elektroda postaje manje osjetljiva na dodatak olova.

Kloridi stvaraju komplekse s olovom jer se Hg ne otapa na tom potencijalu zbog čega je teže izlučivanje Pb na Hg iz kompleksa nego nekompleksiranog iona.

Zbog ovoga se metoda modificirala u prisustvu te iste matrice.



Slika 31. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za Pb^{2+} uz dodatak 100 µL zlatotopke metodom standardnog dodatka na GCE-Hg. Vrijeme akumulacije: 60s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1 V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

3.2.4. Krivulja umjeravanja za određivanje Pb^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg u realnim uzorcima

3.2.4.1. Prije sijanja biljke *Lunaria annua* L.

Na osnovi prethodnih rezultata prešlo se na određivanje koncentracija olova u realnim uzorcima. Kako bi se ostalo u linearnom području standardni dodatak otopina uzoraka za sva mjerenja je uvijek bio isti.

Sukcesivni dodatak realnih uzoraka (TLO 1, TLO 2, SJEME) za sva mjerenja je dva puta po 50 µL.

Tablica 5. Koncentracija olova u organskom, botaničkom tlu i sjemenu

	TLO 1	**TLO 2**	**SJEME**
Pb (mg/kg)	53,82	869	242,9

Primjer izračuna koncentracije za TLO 1:

$y = 8 \cdot 10^{7} X - 0,832$

$0 = 8 \cdot 10^{7}\ X\ - 0{,}832$

$8 \cdot 10^{7}\ X = -\ 0{,}832$

$X = -1{,}04 \cdot 10^{-8}$

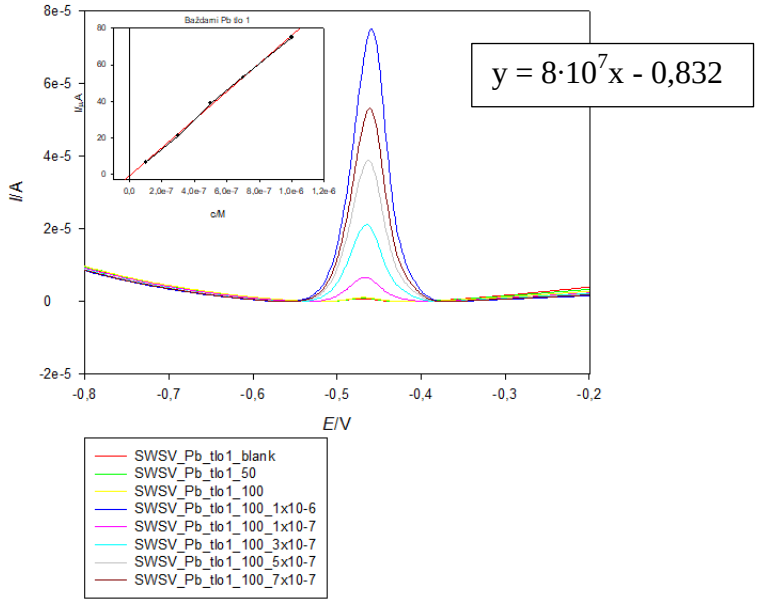
U ćeliji → $X = 1{,}04 \cdot 10^{-8}$

$c_{uzorka} = \frac{1{,}04 \cdot 10{-}8 \cdot 0{,}05\ \mathrm{L}}{1 \cdot 10{-}4\ \mathrm{L}} = 5{,}2 \cdot 10^{-6}$ M → u tikvici

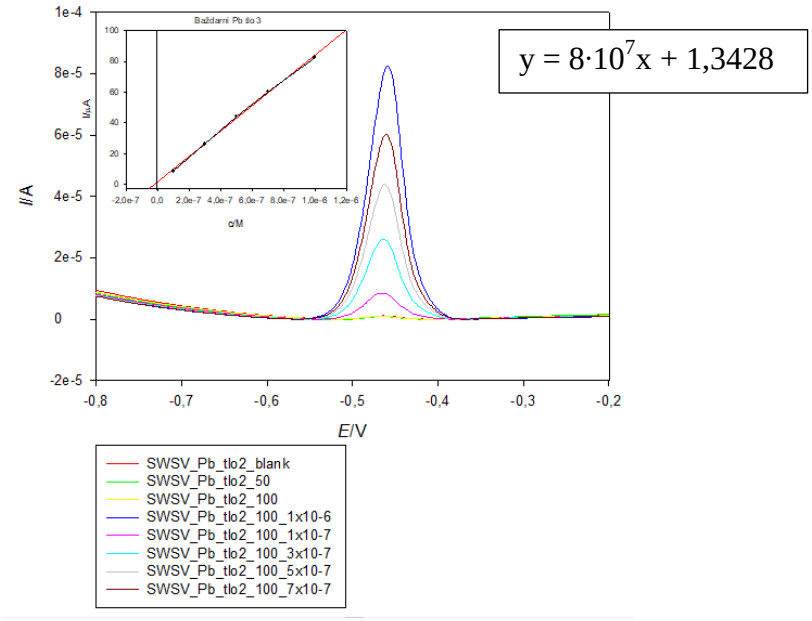
$n = c \cdot V = 5{,}2 \cdot 10^{-6}\ \mathrm{M} \cdot 0{,}05\ \mathrm{L} = 2{,}6 \cdot 10^{-7}$ mol

$m = n \cdot M = 2{,}6 \cdot 10^{-7}\ \mathrm{mol} \cdot 207{,}2\ \mathrm{g/mol} = 5{,}382 \cdot 10^{-5}$ g

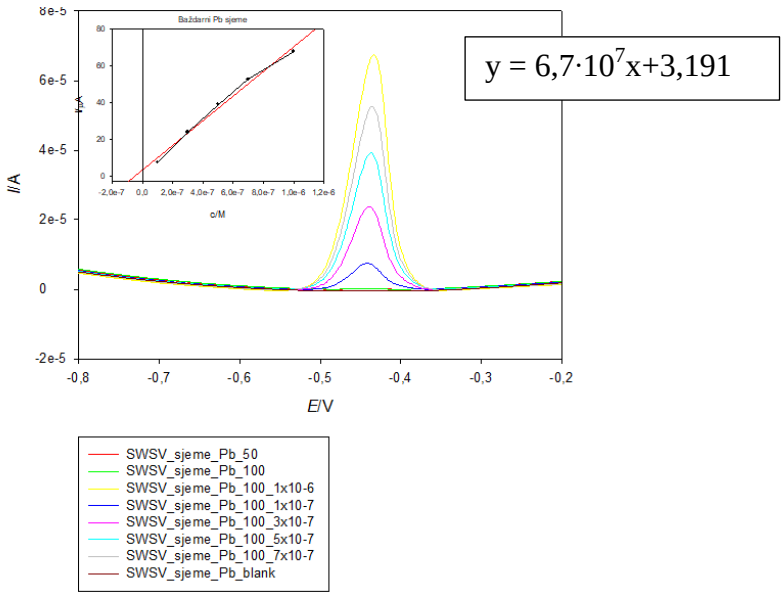
$\frac{5{,}382 \cdot 10{-}5\ \mathrm{g} \cdot 1000\ \mathrm{mg}}{1\ g} = 0{,}05382$ mg u 1 g uzorka = 53,82 mg/kg



Slika 32. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}



Slika 33. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}



Slika 34. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku sjemena (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

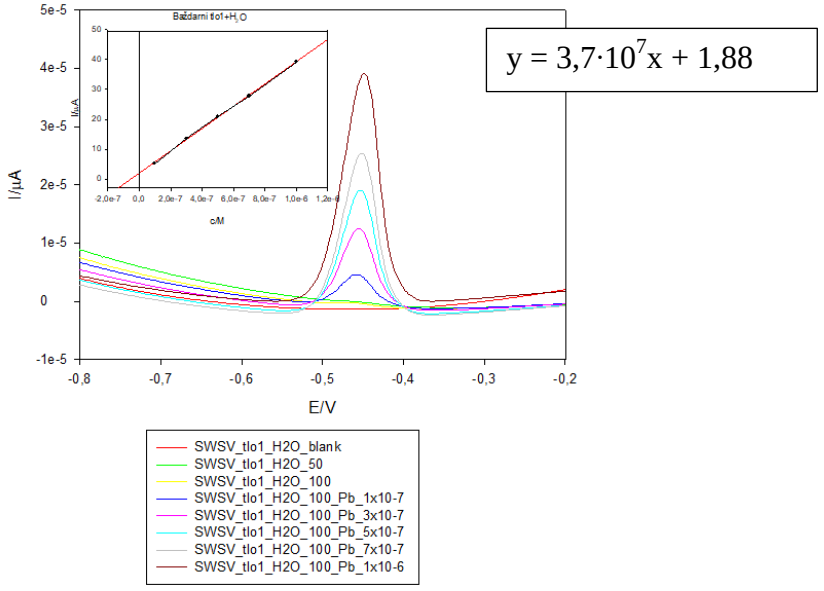
S obzirom da nemamo podatke o količini olova u botaničkom tlu (TLO 1), možemo pretpostaviti da ova koncentracija potječe iz olovnih cijevi ili ispušnih plinova automobila. Koncentracija u organskom uzorku je puno veća od očekivane (10,22 mg/kg). Razlog tome može biti to što nismo uzeli cijelu masu tla već je nasumično uzet uzorak.

3.2.4.2. Poslije sijanja biljke *Lunaria annua* L.

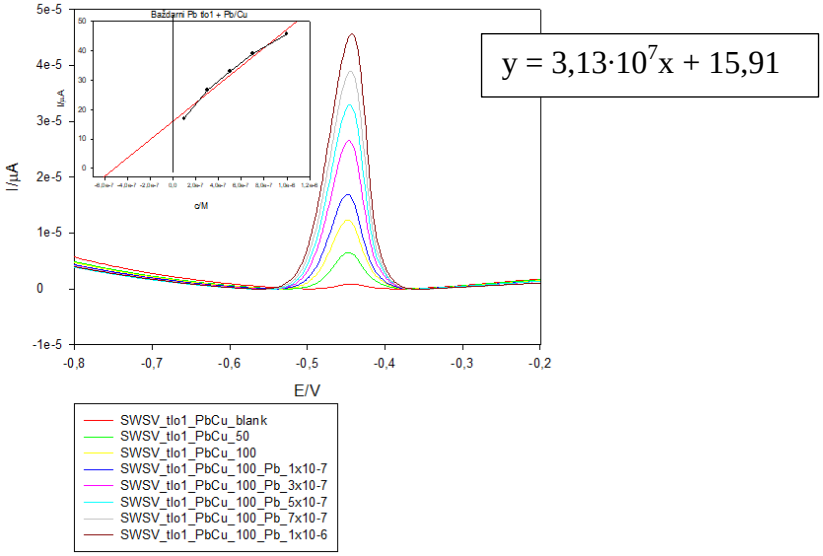
3.2.4.2.1. Tlo

Tablica 6. Koncentracije olova u botaničkom tlu zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	TLO 1 + H_2O	**TLO 1 + Pb/Cu**
Pb (mg/kg)	257,7	2630



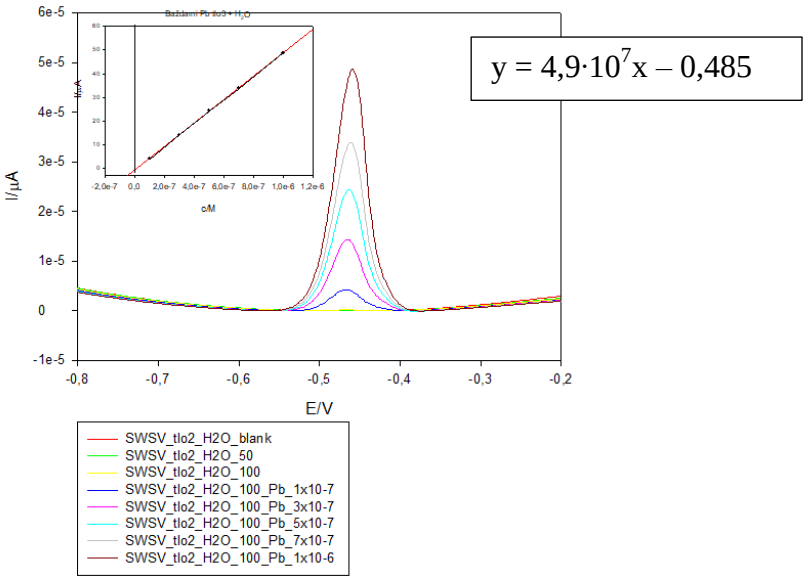
Slika 35. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}



Slika 36. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

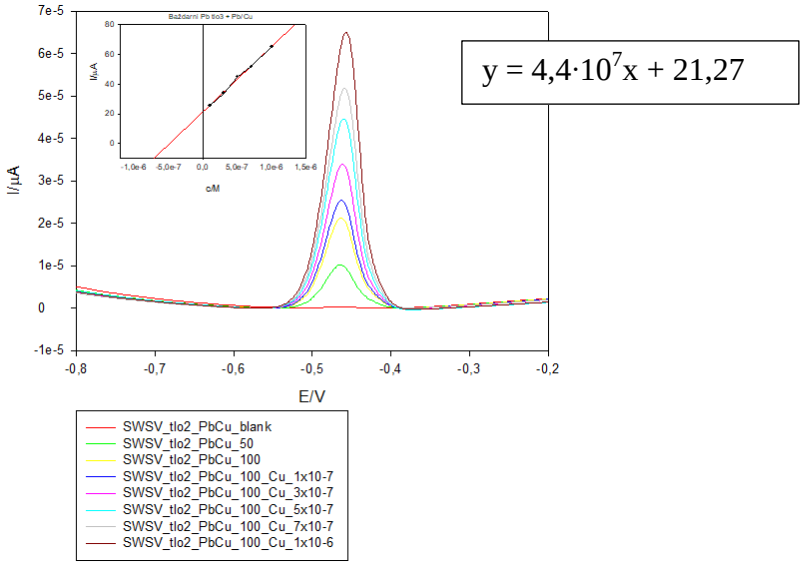
Tablica 7. Koncentracije olova u organskom tlu zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	TLO 2 + H_2O	**TLO 2 + Pb/Cu**
Pb (mg/kg)	50,3	2480



Slika 37. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s

H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

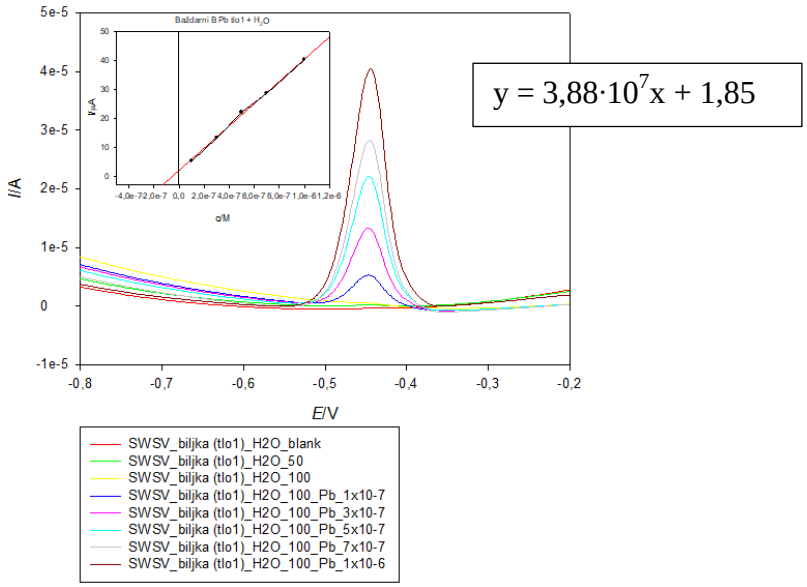


Slika 38. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

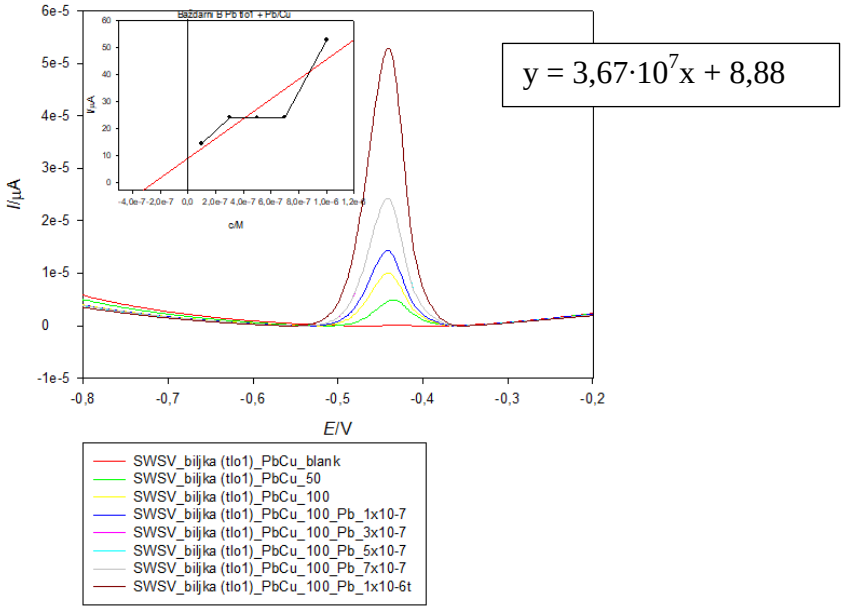
3.2.4.2.2. Biljka

Tablica 8. Koncentracije olova u biljci iz botaničkog tla zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	BILJKA (TLO 1) + H_2O	**BILJKA (TLO 1) + Pb/Cu**
Pb (mg/kg)	934,03	4063,2



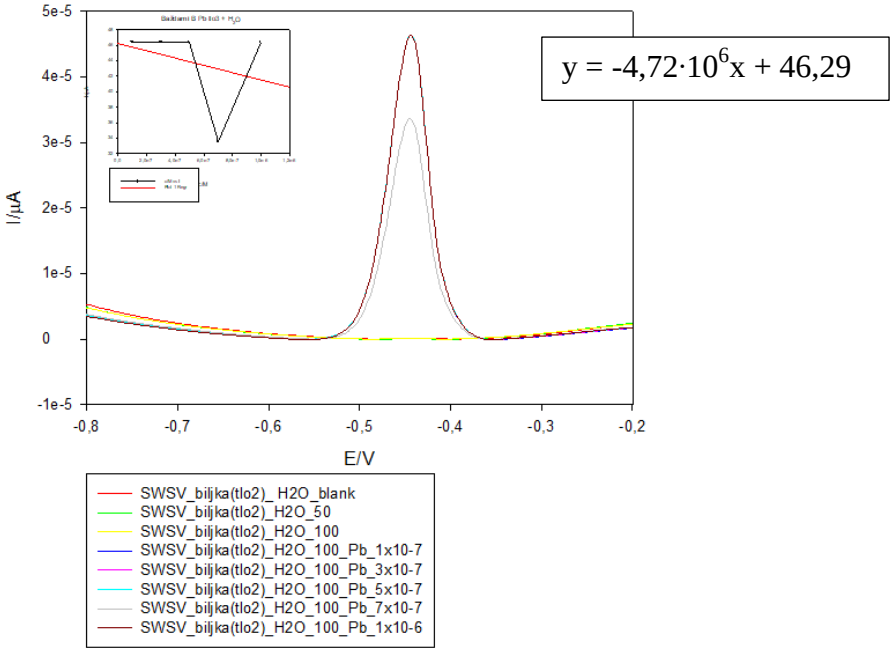
Slika 39. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku biljke TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}



Slika 40. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku biljke TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

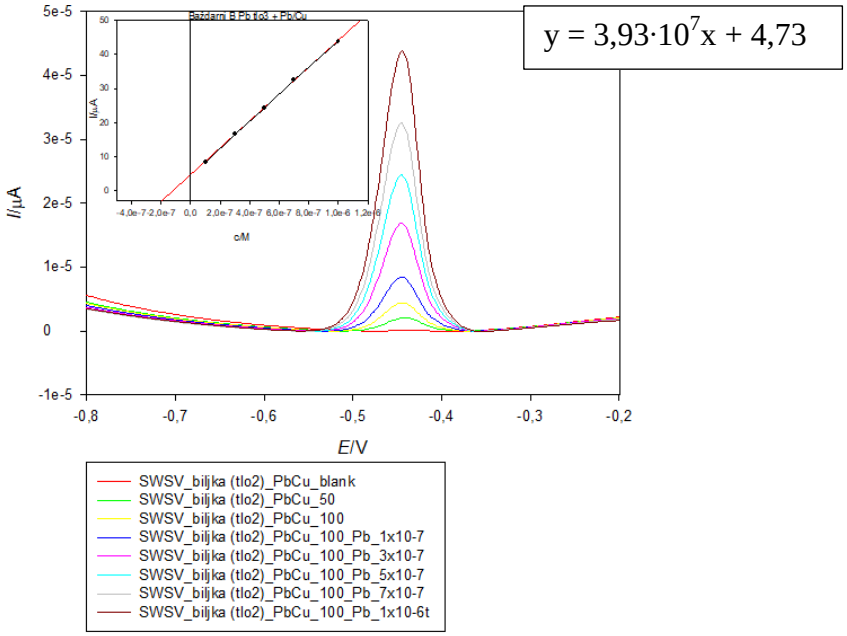
Tablica 9. Koncentracije olova u biljci iz organskog tla zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	BILJKA (TLO 2) + H_2O	**BILJKA (TLO 2) + Pb/Cu**
Pb (mg/kg)	408	1136,8



Slika 41. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku biljke TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

S obzirom da graf odstupa mjerenje bi trebalo ponoviti s ciljem dobivanja boljih rezultata.



Slika 42. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Pb^{2+} u uzorku biljke TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}

3.3. Elektrokemijsko ponašanje i određivanje bakrovih (II) kationa na elektrodama od staklastog ugljika

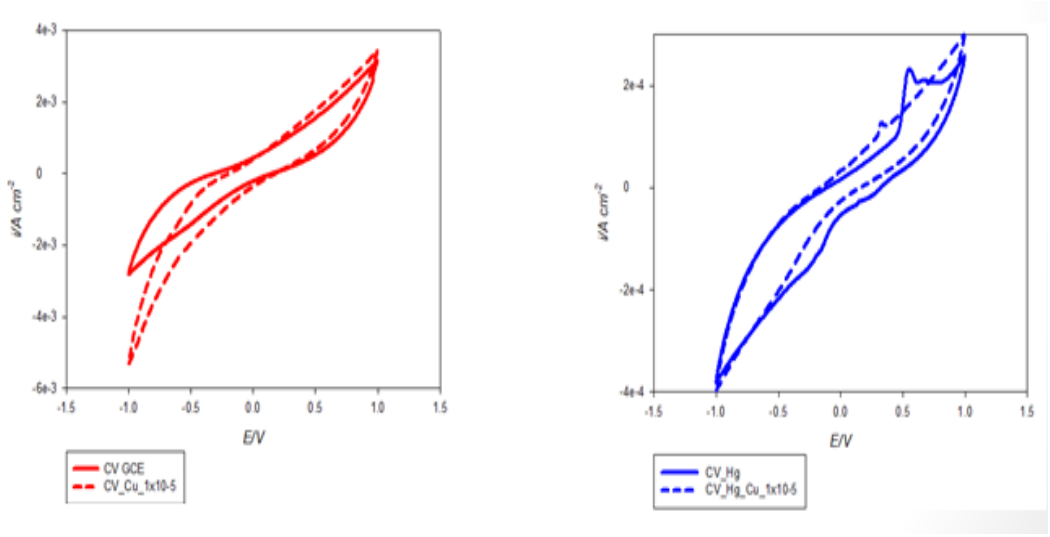
3.3.1. Elektrokemijsko ponašanje bakrovih (II) kationa na modificiranim i nemodificiranim elektrodama od staklastog ugljika

Kao i kod olova elektrokemijsko ponašanje bakrovih (II) kationa je proučavano metodom cikličke voltametrije u granicama potencijala od -1 V do 1 V. Dobiven ciklički voltamogram za nemodificiranu elektrodu prikazan je na slici 43. pod a, a za modificirana elektrodu pod b.

Kao što je vidljivo, značajne promjene u elektrokemijskom ponašanju GCE nisu uočene. Za razliku od ove elektrode ciklički voltamogram za modificiranu GCE-Hg upućuju na anodne procese (oko +0,5 V) koji se pripisuju intenzivnom otapanju filma žive. Ovu anodnu oksidaciju prati i pojava katodnog procesa na +0,25 V. S obzirom na nedefiniranost pika ovaj proces je kontroliran difuzijom Hg^{2+} iona nastalih anodnim otapanjem.

U anodnom dijelu pik na 0V (-0.0025V ~ +0.0025V) upućuje na anodno otapanje Cu.

a) b)

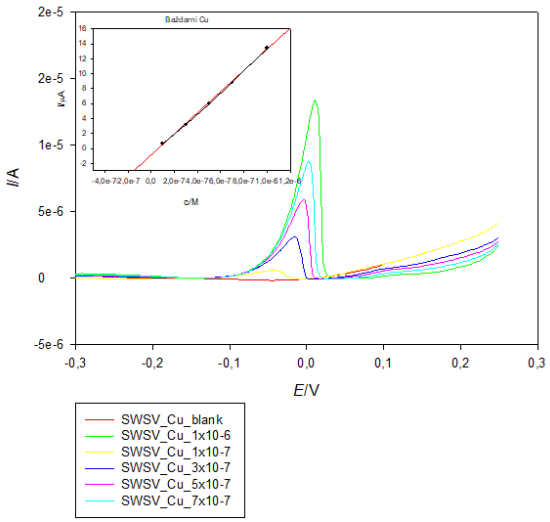


Slika 43. Ciklički voltamogrami za nemodificiranu (GC) (a) i modificiranu (GC-Hg) elektrodu (b)

3.3.2. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg

Nakon utvrđivanja ponašanja Cu^{2+} na GCE-Hg rađena je „stripping“ anodna voltametrija na GCE-Hg u svrhu elektrokemijskog određivanja bakra, pri različitim koncentracijama. Dobiveni voltamogram je prikazan na slici 44.

Kao i kod olova krivulja umjeravanja ovisnosti anodne struje otapanja o koncentraciji Cu^{2+} je dobivena očitavanjem struje vrha pika za različite koncentracije Cu^{2+}.



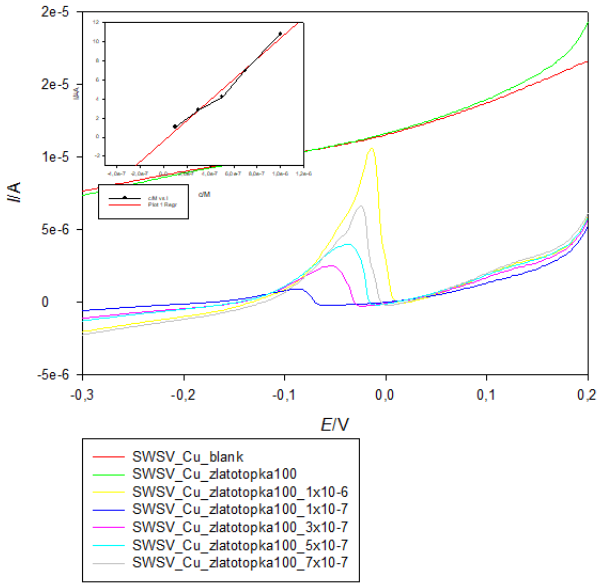
Slika 44. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za različite koncentracije Cu^{2+} na GCE-Hg. Vrijeme akumulacije: 60s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1 V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

3.3.3. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg uz prisustvo zlatotopke

Isto kao i kod olova s ciljem izjednačavanja uvjeta mjerenja, odnosno elimininacije utjecaja otapala u uzorcima tla, napravljeno je mjerenje s dodatkom referentne otopine zlatotopke.

Iako je smanjene struje u odnosu na olovo manje također je došlo do smanjenja anodnih struja u odnosu na prethodno mjerenje, što znači da dodatkom zlatotopke radna elektroda postaje manje osjetljiva na dodatak bakra.

Dodatkom kloridnih aniona anodni potencijal otapanja Hg postaje negativniji.



Slika 45. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za Cu^{2+} uz dodatak zlatotopke metodom standardnog dodatka na GCE-Hg. Vrijeme akumulacije: 60s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1 V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

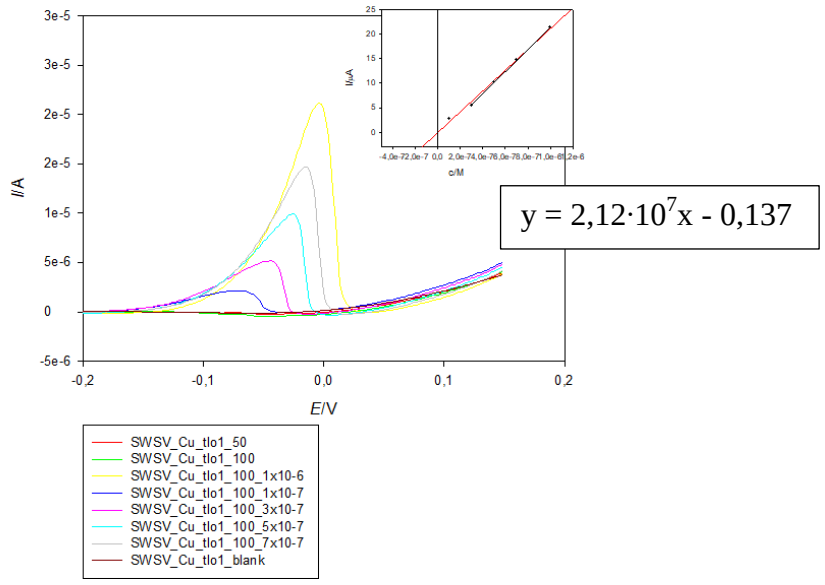
3.3.4. Krivulja umjeravanja za određivanje Cu^{2+} „stripping“ anodnom voltametrijom na GCE-Hg u realnim uzorcima

3.3.4.1. Prije sijanja biljke *Lunaria annua* L.

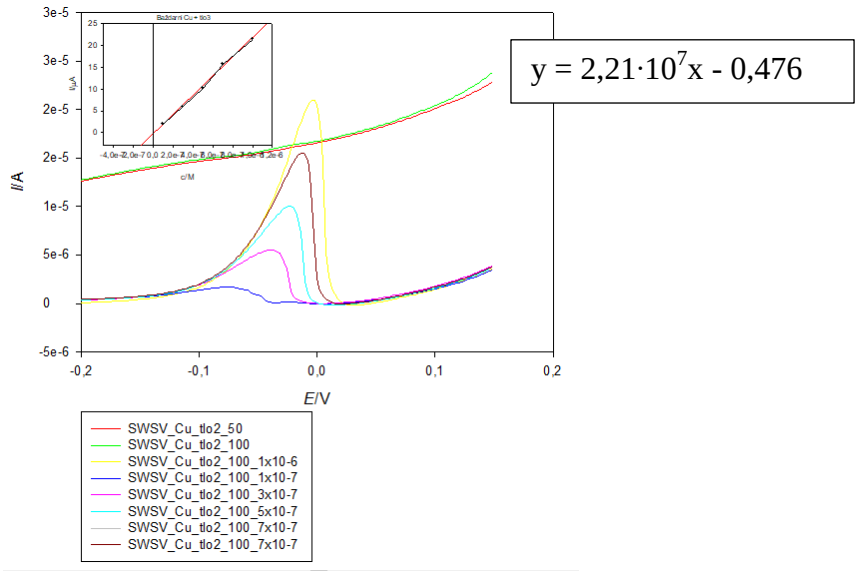
Na osnovi prethodnih rezultata prešlo se na određivanje koncentracije Cu u realnim uzorcima. Kako bi se zadržalo u linearnom području standardni dodatak za sva mjerenja je uvijek bio isti.

Tablica 10. Koncentracije bakra u organskom, botaničkom tlu i sjemenu

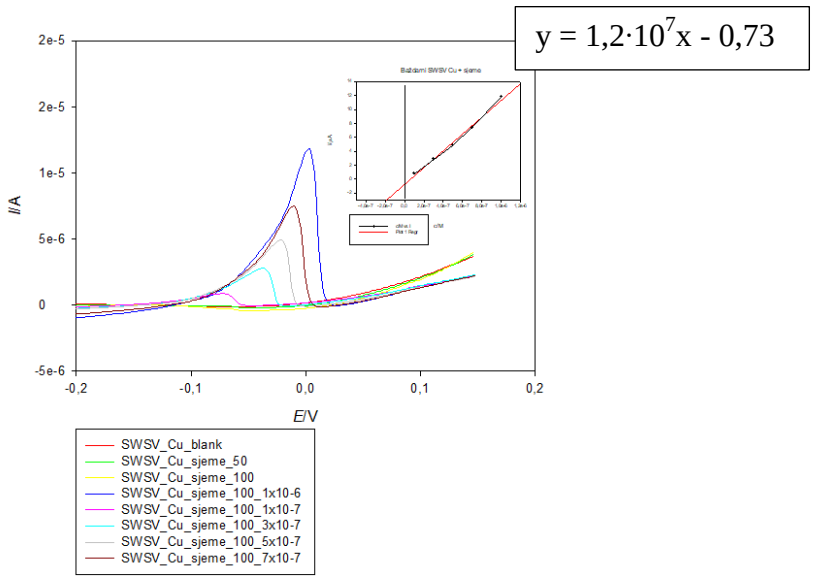
	TLO 1	**TLO 2**	**SJEME**
Cu (mg/kg)	102,7	341,5	94,9



Slika 46. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}



Slika 47. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}



Slika 48. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku sjemena (metodom standardnog dodatka) na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

Kako nemamo podatke o količini bakra u botaničkom tlu, možemo pretpostaviti da ova koncentracija potječe od dodatka modre galice, s obzirom da su se tu uzgajale neke poljoprivredne kulture. Također, koncentracija u organskom uzorku je puno veća od očekivane (12,3 mg/kg), a razlog je vjerojatno isti kao i kod olova.

Iako su uvjeti za sve uzorke bili isti, na voltamogramu uzorka sjemena uočen je pomak pika. U prvom dijelu dominira anodna struja jer je katodna struja manja zbog težeg izlučivanja bakrovih (II) kationa iz kloridnih kompleksa.

O: $Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e^-$

R: $Cu(Cl)_n^{2-n} + 2e^- \rightarrow Cu + nCl^-$

Za razliku od ovog u drugom dijelu dominira katodna struja zbog manjka kloridnih iona uz elektrodu, koji su potrošeni kroz anodne reakcije.

O: $Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e^-$

R: $Cu^{2+} + 2e^- \rightarrow Cu$

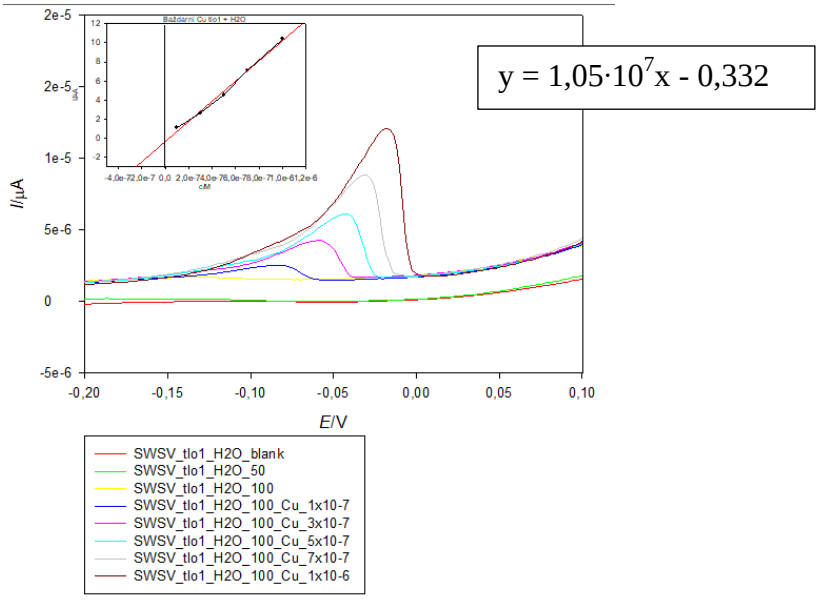
To uzrokuje nakupljanje Cu^{2+} uz površinu elektrode pa je izraženija i njihova katodna redukcija.

3.3.4.2. Poslije sijanja biljke *Lunaria annua* L.

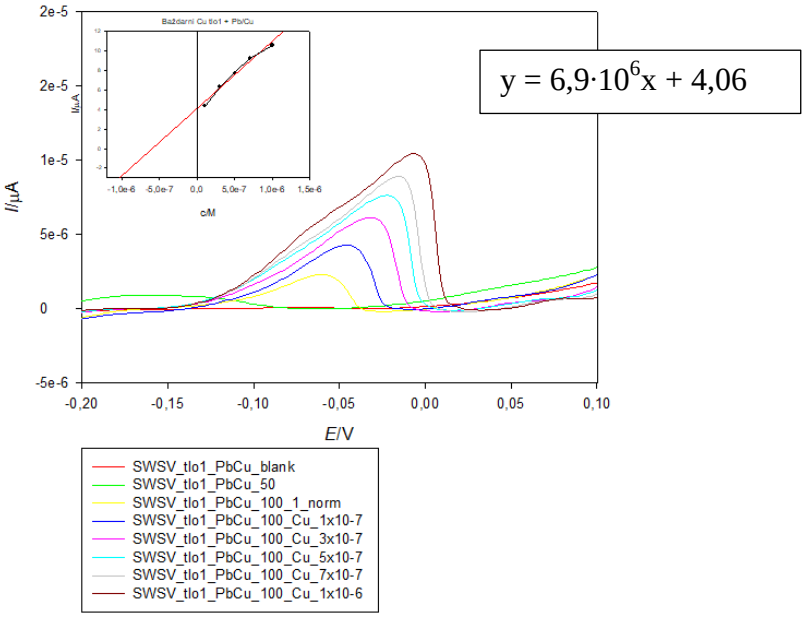
3.3.4.2.1. Tlo

Tablica 11. Koncentracije bakra u botaničkom tlu zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	TLO 1 + H_2O	**TLO 1 + Pb/Cu**
Cu (mg/kg)	49,8	913,9



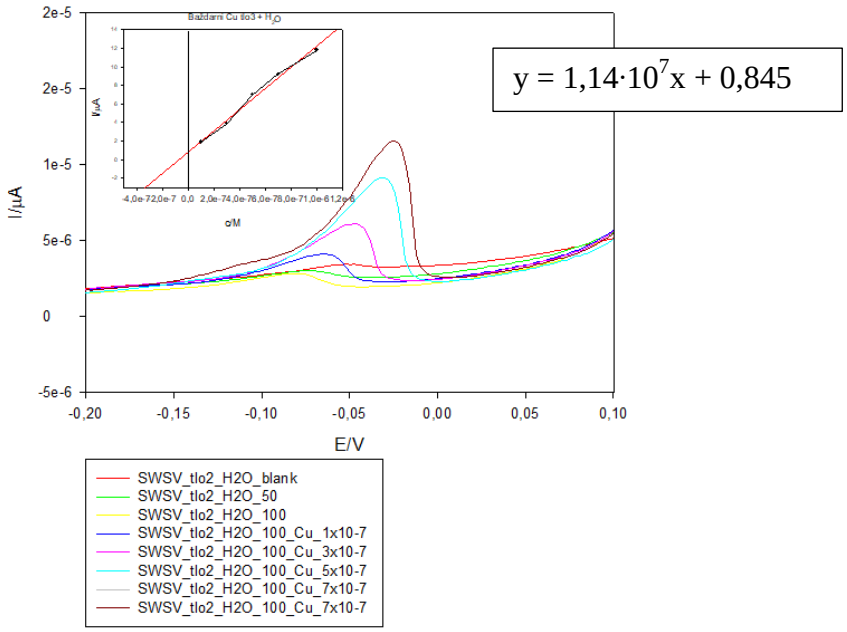
Slika 49. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}



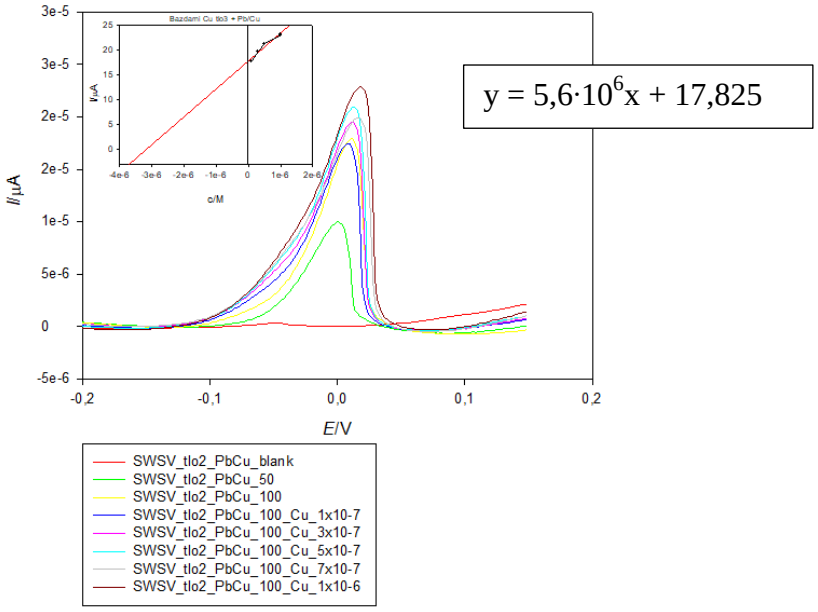
Slika 50. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

Tablica 12. Koncentracije bakra u organskom tlu zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	TLO 2 + H_2O	**TLO 2 + Pb/Cu**
Cu (mg/kg)	117,4	4920



Slika 51. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

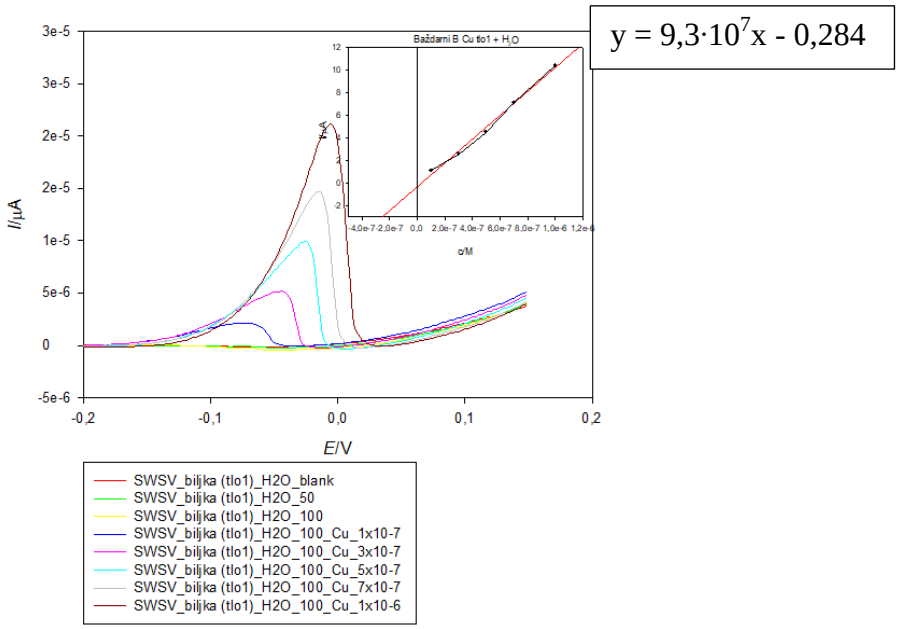


Slika 52. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

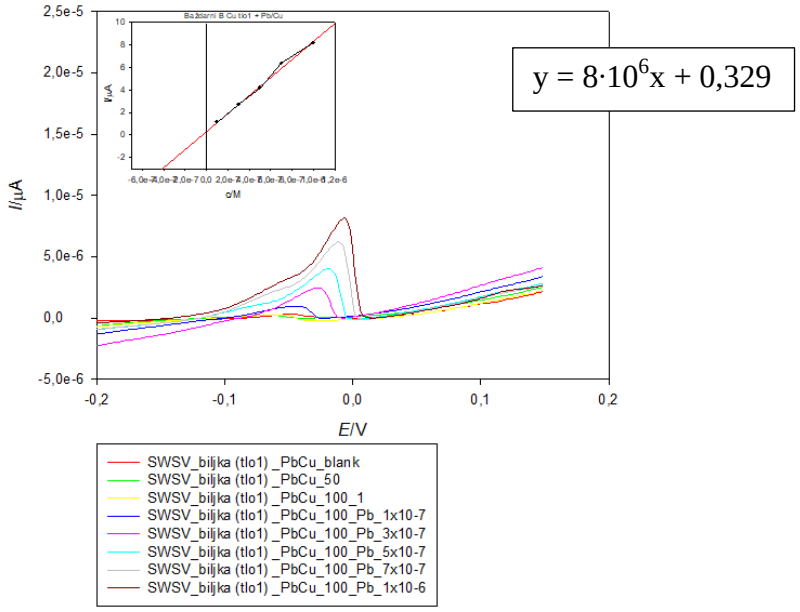
3.3.4.2.2. Biljka

Tablica 13. Koncentracije bakra u biljci iz botaničkog tla zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	BILJKA (TLO 1) + H_2O	**BILJKA (TLO 1) + Pb/Cu**
Cu (mg/kg)	18,24	211,23



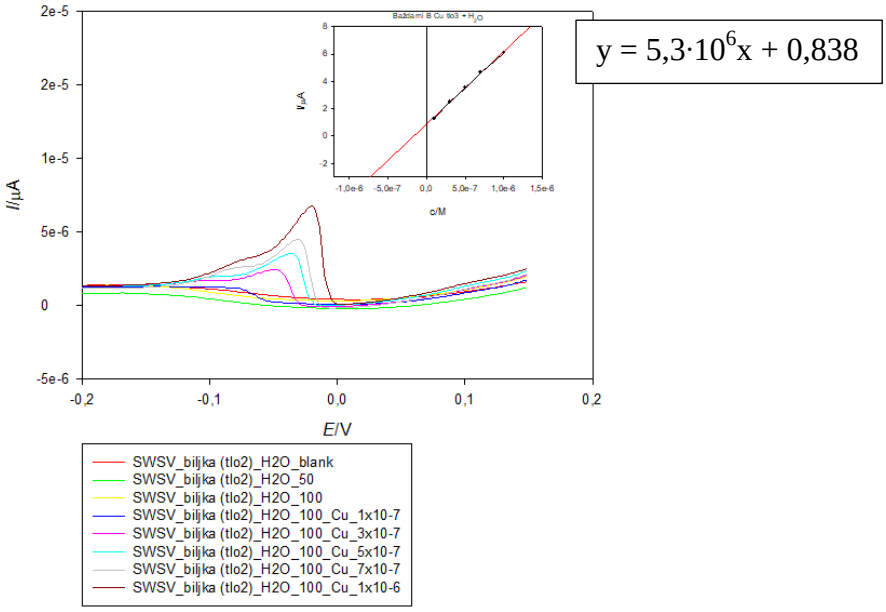
Slika 53. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku biljke TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}



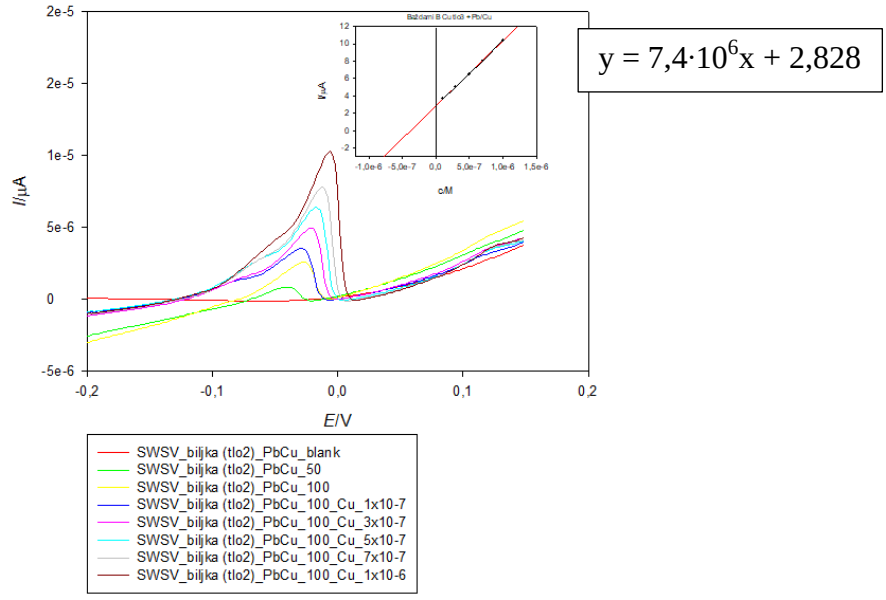
Slika 54. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku biljke TLO 1 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

Tablica 14. Koncentracije bakra u biljci iz organskog tla zalijevanim vodom i otopinom Pb/Cu

	BILJKA (TLO 2) + H_2O	**BILJKA (TLO 2) + Pb/Cu**
Cu (mg/kg)	481,49	1096



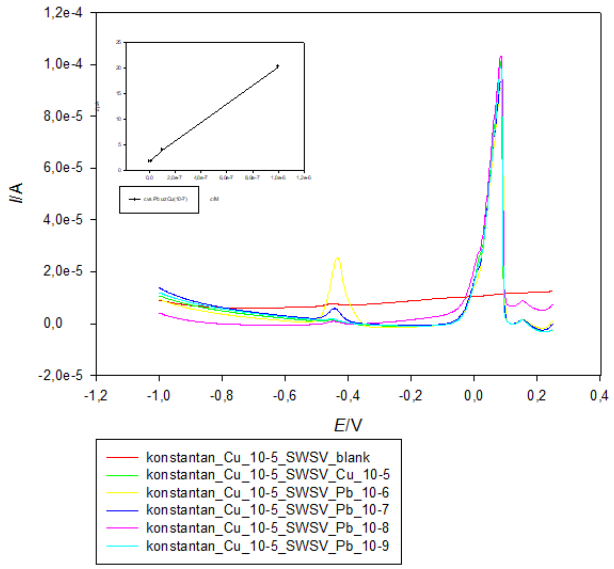
Slika 55. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku biljke TLO (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s H_2O na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}



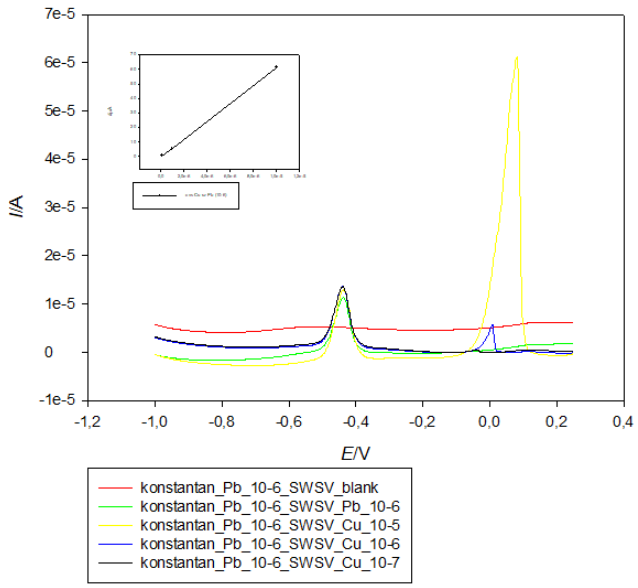
Slika 56. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije za određivanje Cu^{2+} u uzorku biljke TLO 2 (metodom standardnog dodatka) zalijevanim s Pb/Cu na GCE-Hg. Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

3.4. Kombinacije olova i bakra

S obzirom da se istovremeno u realnim uzorcima mogu naći određene koncentracije olova i bakra, rađene su kombinacije s konstantnim Pb^{2+} uz različite dodatke Cu^{2+} (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M) i konstantnim Cu^{2+} uz različite dodatke Pb^{2+} (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M). Pokazano da je jedan na drugog nemaju utjecaja.



Slika 57. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije pri konstantnom Cu^{2+} 10^{-5} M dodatkom različitih koncentracija Pb^{2+} (metodom standardnog dodatka). Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Pb^{2+}



Slika 58. Normalizirani voltamogrami anodne „stripping“ voltametrije pri konstantnom Pb^{2+} 10^{-6} M dodatkom različitih koncentracija Cu^{2+} (metodom standardnog dodatka). Parametri: vrijeme akumulacije: 60 s, vrijeme stabilizacije: 30 s, amplituda: 0,025 V, broj ciklusa: 3, frekvencija: 10 s^{-1}, početni potencijal: -1V, krajnji potencijal: +0,25 V, step potencijal: 0,00195 V. Umetnut: krivulja umjeravanja ovisnosti gustoće struje o koncentraciji Cu^{2+}

4. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog eksperimenta i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Izmjerene vrijednosti pH pokazuju da je tlo uzeto iz botaničkog vrta, TLO 1 (pH=8,58) umjereno lužnato tlo, dok je kupljeno organsko TLO 3 (pH=6,35) slabo kiselo do neutralno.
- Što je vrijednost pH tla veća, to je manja mogućnost akumulacije metala.
- Koncentracija Pb i Cu je manja u uzorku botaničkog tla (Pb 53,82 mg/kg ; Cu 102,7 mg/kg) nego u uzorku komercijalno dostupnog organskog tla (Pb 869 mg/kg ; Cu 341,5 mg/kg),
- U uzorku sjemena određena koncentracija za Pb iznosi 242,9 mg/kg, a za Cu 94,9 mg/kg,
- Eksperimentom je dokazano da je *Lunaria annua* L. hiperakumulator olova a potencijalni akumulator bakra.
  Primjer (Pb biljka (botaničko tlo / TLO 1) + Pb/Cu 4063,2 mg/kg ; Cu biljka (botaničko tlo / TLO 1) + Pb/Cu 211,23 mg/kg),
- Iako su koncentracije olova i bakra bile visoke biljka nije usahnula. Međutim već pri kraju dodavanja određenih količina olova i bakra biljka je počela venuti tj. došlo je do trovanja zbog prelaska maksimalno dopuštene koncentraciju dodavanih metala.

5. LITERATURA

[1] N. Vukšić, M. Šperanda, *Raspodjela teških metala (Cd, Pb, Hg, As) i esencijalnih elemenata (Fe, Se) u šumskom tlu i biljnim zajednicama državnog otvorenog lovišta „Krndija II“ XIV/23*, Šumarski list, 3–4, **2016**, str. 147–153.

[2] R. L. Walker, K. C. Walker, E. J. Booth, *Adaptation potential of the novel oilseed crop, Honesty (Lunaria annua* L.*), to the Scottish climate*, Department of Agronomy, Scottish Agricultural College, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, UK, Industrial Crops and Products 18 (2003) 7_/15, **2003.**

[3] http://www.naturalmedicinalherbs.net/herbs/l/lunaria-annua=honesty.php (preuzeto: 27.08.2018.)

[4] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound (preuzeto: 27.08.2018.)

[5]https://bib.irb.hr/datoteka/582661.Hiperakumulatori_tekih_metala.pdf (preuzeto:01.09.2018.)

[6] https://www.mzoip.hr/hr/okolis/tlo.html (preuzeto: 01.09.2018.)

[7] D. Ašperger, S. Babić, T. Bolanča, R.M. Dabra, S. Ferina, A. Ginebreda, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, G. Klobučar, J. Macan, D.M. Pavlović, M. Petrović, R.S. Klobučar, A. Štambuk, V. Tomašić, Š. Ukić, *Analitika okoliša*, Sveučilište u Zagrebu, FKIT Zagreb,**2013**, str. 44-50., 133-135.

[8]http://ljesnjak.pfos.hr/~jdanijel/nastava/radovi/18_Organska%20tvar%20tla.pdf (preuzeto: 06.09.2018.)

[9] M. Buljac, *Interni materijali za predavanja iz kolegija Kemija tla*, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, **2016**.

[10] Dr. M. Jakovljević, M. Pantović, *Hemija zemljišta i voda*, Beograd, **1991**.

[11] M.Gračanin, Lj. Ilijanić, *Uvod u ekologiju bilja*, Školska knjiga Zagreb, **1977.**

[12] P.B. Tchounwou, C.G. Yedjou, A.K. Patlolla, D.J. Sutton, *Heavy Metals Toxicity and the Environment*, College of Science, Engineering and Technology, Jackson, **2012.**

[13] I. Jug, *Štetne tvari u tlu*, **2016.** (preuzeto: 27.08.2018.) http://ishranabilja.com.hr/literatura/osnove_agroekologije/Stetne%20tvari%20u%20tlu.pdf

[14] Pravilnik o zaštiti poljoprivrednog zemjišta od onečišćenja. Narodne novine, 39/13

[15]https://www.researchgate.net/publication/284669331_Metal_hyperaccumulator_plants_a_review_of_the_ecology_and_physiology_of_a_biological_resource_for_phytoremediation_of_metal-polluted_soils (preuzeto: 27.08.2018.)

[16] Z. Yanqun, L. Yuan, C. Schvartz, L. Langlade, L. Fan, *Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead–zinc mine area, China,* Environment International 30 **2003**, str. 567– 576.

[17]https://www.researchgate.net/figure/1-Predominance-diagram-Eh-vs-pH-of-the-Pb-system-in-which-the-stability-fields-of-the_fig1_259568984 (preuzeto: 27.08.2018.)

[18]http://www.ekoforumzenica.ba/pdf/teski%20metali%20u%20biljkama%20ZENICA.pdf (preuzeto: 27.08.2018.)

[19] https://pdfs.semanticscholar.org/6ae0/a349aea2ddfb5d1fcd34ff92bff180d5b15f.pdf (preuzeto: 27.08.2018.)

[20] A. J. Bard., L. R. Faulkner, *Electrochemical methods : fundamentals and applications second edition,* New York: John Wiley & Sons, Inc **2001.**

[21] J. O'M. Bockris, *Modern Electrochemistry 1 Second Edition*, Springer-Verlag New York, LLC **1999.**

[22] H. H. Girault, *Analytical and Physical Electrochemistry.* Lausanne: EPFL Press **2004.**

[23] I. Piljac, *Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode*, Zagreb: Media print, **2010.**

[24] J. O. M. Bockris, A. K. N. Reddy, M. Gamboa-Aldeco, *Modern Electrochemist 2A*, Fundamentals of Electrodics, 2nd Edition, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, **2000.**

[25] I. Piljac, *Elektroanalitičke metode,* Zagreb: RMC, **1995.**

[26] https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=srebro%2Fsrebrov+klorid+elektroda (preuzeto: 25.08.2018.)

[27]https://www.aliexpress.com/item/JJ110-multi-electrode-clip-platinum-electrode-clamp-working-electrode-holder-spot-shipping-billing/32757909925.html (preuzeto: 25.08.2018.)

[28] J. W. Robinson, E. M. Skelly Frame, G. M. Frame II, *Undergraduate Instrumental Analysis*, Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, **2014.**

[29] F. Scholz, *Electroanalytical Methods*, Berlin: Springer-Verlag, **2010.**

[30] https://slideplayer.com/slide/12372235/ (preuzeto: 21.09.2018.)

[31] I. Malenica, *Nove elektrokemijske metode za određivanje ropinirola,* Rektorova nagrada, Zagreb, Farmaceutsko- biokemijski fakultet, **2012.**

[32] B. Nigović , S. Behetić, *Elektroanalitika u farmaciji*, Farmaceutski glasnik. **2007**, str. 163-175.

[33] http://goldbook.iupac.org/html/G/G02639.html (preuzeto: 21.09.2018.)

[34] Walsh, F.C.; Arenas, L.F.; Ponce de León, C.; Reade, G.W.; Whyte, I.; Mellor, B.G., *The continued development of reticulated vitreous carbon as a versatile electrode material: Structure, properties and applications*, Electrochimica Acta, **2016**, 566–591

[35] H. E. Zittel, F. J. Miller, *A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry*, Analytical Chemistry Division, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., **1965**, str. 200

[36] https://www.als-japan.com/1408.html#defaultTab12 (preuzeto 17.09.2018.)

[37] A. J. M. Horvat, K. Margeta, *Procesna i instrumentalna analiza*, radni materijal za internu uporabu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, **2009.**

[38]https://www.scribd.com/document/84168958/metoda-standardnog-dodatka (preuzeto 17.09.2018.)

[39] http://zimmer.csufresno.edu/~davidz/Chem106/StdAddn/StdAddn.html (preuzeto 25.09.2018.)

[40]https://www.compo.com/international/products/Universal-Potting-Soil.html (preuzeto 21.09.2018.)

[41] https://vixa.com.hr/proizvod/srebrenka-papini-novcici/ (preuzeto 21.09.2018.)

[42] Z. Stančić, D. Vujević, D. Dogančić, S. Zavrtnik, I. Dobrotić, Z. Bajsić, I. Dukši, D. Vincek, *Sposobnost akumulacije teških metala kod različitih samoniklih biljnih vrsta*, Inženjerstvo okoliša / Vol.2/ No.1, **2015**

[43] H. Marschner, *Mineral Nutrition of Higher Plants,* Academic Press, London, **2003**

[44] J. Halamić, S. Miko, *Geokemijski atlas Republike Hrvatske,* KIG **2010**