



Creative Commons Attribution –  
NonCommercial 4.0 International License

Izvorni znanstveni rad

<https://doi.org/10.31784/zvr.14.1.27>

Datum primitka rada: 28. 11. 2025.

Datum prihvatanja rada: 24. 3. 2026.

# BIOKEMIJSKI ODGOVOR SALATE NA TRETMANE PLAZMOM AKTIVIRANOM VODOM I ORGANSKIM GNOJIVIMA / BIOSTIMULATORIMA

**Nataša Romanjek Fajdetić**

Dr. sc., docentica, Sveučilište u Slavanskom Brodu, Biotehnički odjel, 108. brigade ZNG 36,  
35 000 Slavonski Brod, Hrvatska; e-mail: nrfajdetic@unisb.hr

**Brigita Popović**

Dr. sc., redovita profesorica, Sveučilište J. J. Strossmayer, Fakultet agrobiotehničkih znanosti,  
Odjel agroekologije, Vladimira Preloga 1, 31 000 Osijek, Hrvatska; e-mail: bpopovic@fazos.hr

## SAŽETAK

U kontekstu rastućih zahtjeva za održivom poljoprivredom i visokom kvalitetom hrane, rad istražuje učinak plazmom aktivirane vode (PAV) i organskih gnojiva s biostimulatorima na sintezu sekundarnih metabolita u salati (*Lactuca sativa* L.) sorte Maradona. Cilj ovog rada bio je ispitati kakav je bio učinak tretmana plazmom aktiviranom vodom s jedne strane te primjena organskih gnojiva u kombinaciji s biostimulatorima s druge strane na akumulaciju sekundarnih metabolita kod salate (*Lactuca sativa* L.). Istraživanje je provedeno dvofaktorijalnim pokusima na pokušalištu Sveučilišta u Slavanskom Brodu, u plasteniku i na otvorenom polju. PAV je primijenjen u dva doziranja (P1 i P2), dok su organska gnojiva (S, P, B) kombinirana s biostimulatorima (C, O, S) u više kombinacija. Rezultati su analizirani korelacijskom analizom i ANOVA-om. Utvrđeno je da su fenolni spojevi glavni nositelji antioksidativne aktivnosti. U tretmanima s organskim gnojivima i biostimulatorima antioksidativna aktivnost je pozitivno korelirala s prolinom ( $r=0,72$ ), ali ne i s fenolima. Suprotno tome, kod PAV tretmana zabilježena je vrlo visoka korelacija ( $r\geq 0,98$ ) između fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti, osobito u plasteniku. Salata uzgojena na polju imala je veće koncentracije fenola i flavonoida nego u plasteniku. U poljskim uvjetima PAV (P1) značajno je povećao fenolne kiseline, flavonoide i antioksidativni kapacitet, dok je u plasteniku veća doza (P2) pokazala inhibicijski učinak. Kombinacije CS i SC postigle su najviši biokemijski odgovor biljke, s najvećim sadržajem fenola (2.5580 mg GAE/g sv.t.) i flavonoida (14.0920 mg CE/g sv.t. u CS). Tretman PO doveo je do najveće akumulacije prolina (2.447  $\mu$ mol Proline/g sv.t.). Rezultati istraživanja pokazuju da plazmom aktivirana voda i odabrani biostimulatori s gnojivima mogu ciljano poboljšati nutritivnu vrijednost salate, ali njihov učinak je visoko ovisan o stresnim uvjetima okoliša.

**Ključne riječi:** *Lactuca sativa*, sekundarni metaboliti, plazmom aktivirana voda, gnojiva, biostimulatori

## 1. UVOD

Svjetska populacija kontinuirano raste, dok se raspoložive obradive površine smanjuju, a postojeće se degradiraju uslijed dugotrajne primjene konvencionalnih sredstava za zaštitu bilja i mineralnih gnojiva (Zulficar *et al.*, 2024). Istodobno, povećava se interes potrošača za hranom veće nutritivne vrijednosti, budući da mineralna gnojiva i pesticidi mogu negativno utjecati na njezina nutritivna i zdravstvena svojstva (Lipiec *et al.*, 2013).

Salata (*Lactuca sativa* L.), kao zeleno lisnato povrće iz porodice *Asteraceae*, često se koristi kao testna kultura u istraživanjima jer se konzumira u svježem stanju i hiperakumulator je biogenih elemenata i metala u tragovima. Za optimalan rast zahtjeva relativno visoke koncentracije dušika (100-180 kg/ha) pri čemu se u konvencionalnoj proizvodnji najčešće primjenjuje dušik iz mineralnih gnojiva. Međutim, nitratni oblik dušika ( $\text{NO}_3^-$ ) koji je lako dostupan iz mineralnih gnojiva, povezan je s negativnim utjecajima na okoliš, uključujući onečišćenje voda te akumulaciju nitrata u lisnatom povrću, što predstavlja rizik za ljudsko zdravlje (Lipiec *et al.*, 2013). Nadalje, primjena umjetnih gnojiva doprinosi smanjenju sadržaja organske tvari u tlu i negativno djeluje na populacije mikroorganizama, osobito bakterija koje sudjeluju u biološkoj fiksaciji dušika (Rohman *et al.*, 2025).

U kontekstu klimatskih promjena i globalnih socioekonomskih poremećaja, poljoprivredni sektor suočava se s potrebom povećanja produktivnosti uz istodobno očuvanje prirodnih resursa (Chowdhury *et al.*, 2019). S obzirom na to da konvencionalna poljoprivredna praksa značajno doprinosi degradaciji tla, sve se više naglasak stavlja na razvoj i primjenu održivih ekološki prihvatljivih sustava uzgoja (Fließbach *et al.*, 2007). U tom kontekstu izdvajaju se dvije inovativne strategije s potencijalom poboljšanja proizvodnje poljoprivrednih kultura visoke kvalitete na održiv način: primjena plazmom aktivirane vode (PAV) te integracija organskih gnojiva s biostimulatorima.

### 1.1 Utjecaj plazmom aktivirane vode (PAV) na formiranje sekundarnih metabolita u salati

Jedna od tehnologija koja nudi rješenje za održivu i sigurnu proizvodnju je tzv. NTP tehnologija (netermalna plazma), poznata i kao hladna plazma (Mulvaney *et al.*, 2010). Indirektan način primjene NTP-a je plazmom aktivirana voda (PAV). PAV nastaje kada plazma dođe u kontakt s vodom, pri čemu se otapaju reaktivne kisikove i dušikove vrste koje mijenjaju kemijski sastav vode (Lamichhane *et al.*, 2021), a dosadašnja istraživanja pokazuju da primjena PAV-a može biti zamjena za umjetna gnojiva (Kučerova *et al.*, 2021). U prirodi se PAV pojavljuje kada munja sijevne, a kapljice kiše se obogate dušikom, što istovremeno predstavlja i prirodan način gnojidbe dušikom (Abbaszadeh *et al.*, 2021). PAV sadrži dugovječne tekuće RONS (kao što su  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$ ) koje mogu djelovati kao signalne molekule u biljnom metabolizmu ili služiti kao hranjive tvari (Kučerova *et al.*, 2021). Istraživanja na salati pokazala su da tretman navodnjavanjem PAV-om može pozitivno utjecati na morfološke parametre (npr. masu glavice i broj listova) i sadržaj dušika (Fan *et al.*, 2020). Nadalje, utvrđeno je da PAV može povećati koncentraciju određenih sekundarnih metabolita, poput fenola, flavonoida, antioksidansa i

prolina (Škarpa *et al.*, 2020; Romanjek Fajdetić *et al.*, 2024; Romanjek Fajdetić *et al.*, 2025). Ove tvari biljke prvenstveno sintetiziraju kao odgovor na stres, a imaju važnu ulogu u regulaciji rasta, antioksidativnoj zaštiti te obrambenim mehanizmima.

## 1.2 Utjecaj organskih gnojiva i biostimulatora na formiranje sekundarnih metabolita u salati

Druga održiva strategija poljoprivredne proizvodnje uključuje primjenu organskih gnojiva i biostimulatora. Organska gnojiva, dobivena iz biljnog ili životinjskog materijala (kao što su životinjski eksudati, kompost, glistinac, digestati), sadrže složene spojeve koji služe kao izvor hranjiva i obogaćuju organsku tvar u tlu (Adhikari *et al.*, 2020). To predstavlja obećavajuću alternativu mineralnim gnojivima, jer organska gnojidba indirektno poboljšava fizikalna, kemijska i biološka svojstva tla. Međutim, da bi organska gnojiva postala biljkama dostupna, ključna je mikrobiološka aktivnost tla (Bafail *et al.*, 2019; Holubova *et al.*, 2020) pri čemu značajnu ulogu mogu imati neke vrste biostimulatora. Biostimulatori su spojevi ili mikroorganizmi koji, kada se primijene na biljke, potiču prirodne fiziološke procese poboljšanja usvajanja hranjiva, kvalitativnih svojstava te toleranciju biljke na abiotički stres (Yemeli *et al.*, 2022). Korištenje biostimulatora i organskih gnojiva jača biljke, omogućujući im da lakše podnose stresove poput nedostatka vode, visokih temperatura i vlage zraka (Shaw *et al.*, 2018). Studije su pokazale da primjena organske gnojidbe i biostimulatora značajno utječe na morfološke karakteristike salate (npr. masu glavice, broj listova i suhu tvar) te je pogodna za integraciju u održive strategije (Szymanska *et al.*, 2017.; Bhattacharya *et al.*, 2010). Također primjena organskih gnojiva i biostimulatora dovodi do akumulacije antioksidativnih molekula i utječe na formiranje sekundarnih metabolita (fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, antioksidativne aktivnosti i prolina) (Rouphael *et al.*, 2017). Sekundarni metaboliti su ključni za prilagodbu i opstanak biljaka osobito u stresnim uvjetima (Xiao *et al.*, 2024). Što se tiče prolina oni sudjeluju u regulaciji brojnih bioloških procesa, uključujući popravak DNK, kontrolu staničnog ciklusa, regulaciju otvaranja i zatvaranja ionskih kanala te aktivaciju T-limfocita (Umumarungu *et al.*, 2024). Osim toga sekundarni metaboliti salate, kao što su polifenoli, povezani su s mnogim zdravstvenim prednostima, uključujući antioksidativne i antikancerogene učinke (Bhattacharya *et al.*, 2010).

## 1.3 Cilj rada

Cilj ovog rada bio je ispitati kakav je bio učinak tretmana plazmom aktiviranom vodom s jedne strane te primjena organskih gnojiva u kombinaciji s biostimulatorima s druge strane na akumulaciju sekundarnih metabolita kod salate (*Lactuca sativa* L.) jer oba pristupa predstavljaju učinkovite i održive strategije u poljoprivredi, s dokazanim utjecajem na formiranje sekundarnih metabolita. Konkretno u ovom istraživanju analizirani su fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, antioksidativna aktivnost i prolin. Također, istražen je i utjecaj navodnjavanja s različitim dozama PAV-a na formiranje sekundarnih metabolita kod uzgoja na otvorenom i u plasteniku.

## 2. MATERIJALI I METODE

Usporedni pregled eksperimentalnih istraživanja proveden je u uzgoju salate glavatice (*Lactuca sativa* L.) sorte Maradone (Lot: N87925, Vilmorin, France). Pokusi su provedeni na pokušalištu Sveučilišta u Slavanskom Brodu u Slobodnici, Hrvatska (N 45°9'58", E 17°57'8").

### 2.1 Uzgoj presadnica

Sjeme salate posijano je u polistirenske kontejnere s 60 sjetvenih mjesta (volumen svakog pojedinog mjesta 50 mL). Kontejneri su bili ispunjeni supstratom Potgrond P (Klasmann-Deilmann, Geeste, Njemačka) koji je imao pH 6.0 i sljedeći sadržaj hranjiva: 220 mg N/L, 110 mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/L, 220 mg K<sub>2</sub>O/L i 80 mg Mg/L. Presadnice su uzgajane u zaštićenom prostoru pod kontroliranim uvjetima (približno 21 °C) sve dok nisu razvile 3 do 4 lista.

Oba istraživanja postavljena su kao dvofaktorijalni eksperimenti u četiri ponavljanja.

### 2.2 Eksperiment s plazmom aktiviranom vodom (PAV)

Pokus je postavljen na dvije lokacije uzgoja (plastenik/unutrašnji uvjeti i polje/vanjski uvjeti). Presadnice su presađene 4. travnja 2024. u posude volumena 2 L, ispunjene vrtnim tlom sa sljedećim karakteristikama: pH-KCl (6,97), pH-H<sub>2</sub>O (7,88), Al-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 23,57 mg/100g tla, Al-K<sub>2</sub>O 16,19 mg/100 g tla, humus (4,1 %), CaCO<sub>3</sub> (1,67 %). U vanjskim uvjetima, temperatura noću iznosila je 2–6 °C, a danju 16–22 °C, s prosječnom vlagom zraka od oko 60 %. U zaštićenom prostoru, noćna temperatura je iznosila od 6–8 °C, a dnevna 16–24 °C. Koncentracija CO<sub>2</sub> bila je od 400 ppm do 550 ppm, a relativna vlaga zraka od 50 % do 65 %.

PAV je proizvedena na Institutu za fiziku u Zagrebu, Republika Hrvatska. Korišten je plazma reaktor temeljen na jednoelektrodnom atmosferskom mlazu plazme. Mlaz plazme generiran je u dušičnom plinu (99,996 % čistoće) pri protoku od 500 sccm. Korištena je komercijalno pročišćena voda farmakopejske kvalitete (pH, Eur. 9) s pH 6,5 i vodljivošću 0,98 μS/cm. Vrijeme tretmana dušičnim mlazom plazme bilo je 70 minuta. Za podešavanje pH dodan je čvrsti komad magnezija (5 g) neposredno tijekom tretmana i ostavljen u tekućini jedan sat nakon tretmana. Izmjerene vrijednosti u trenutku primjene bile su: pH 6±0,2, H<sub>2</sub>O 4,4±0,2, NO<sub>2</sub>- 5,5±1, i NO<sup>o</sup>- 20±2.

- Tretmani navodnjavanja s PAV:  
PAV 1: 150 mL dodano po zalijevanju.  
PAV 2: 300 mL dodano po zalijevanju.

Primjena: Zalijevanje PAV-om izvršeno je tri puta, na datume: 4. travnja 2024., 15. travnja 2024. i 3. svibnja 2024. Biljke su zalijevane prema potrebi dok nisu postigle potpuno hidratizirano stanje.

## 2.2.1 Eksperiment s organskim gnojivima i biostimulatorima

Za provođenje pokusa korištena su tri organska gnojiva; Plantella organic (P), Biopon (B) i Stallatico pellettato (S) te tri biostimuladora; Čudomix (C), Organico (O) i Slavol (S).

Nazivi organskih gnojiva kao i biostimuladora su prikazani šiframa dalje u radu. Presadnice su 2. svibnja 2024. presađene u posude volumena 2 L, napunjene vrtnim tlom sljedećih svojstava; pH-KCl (6,97), pH-H<sub>2</sub>O (7,88), Al-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 23,57 mg/100g tla, Al-K<sub>2</sub>O 16,19 mg/100 g tla, humus (4,1%), CaCO<sub>3</sub> (1,67 %). Uzgoj biljaka je proveden u plasteniku s dnevnim temperaturama 20 do 25 °C i noćnim 12 do 15 °C, te relativnom vlagom zraka od 70 do 80 %. Biljke su zalijevane prema potrebi dok nisu postigle potpuno hidratizirano stanje.

## 2.2.2 Organska gnojiva i biostimuladori

U istraživanju su korištena tri organska gnojiva; Plantella organik, Biopon i Stallatico pellettato. Gnojiva su primijenjena prije presađivanja tako što su pomiješana s vrtnim tlom u količini od 2 g/posudi.

Plantella organik (P) (proizvođač: Unichem, Slovenija); (N) 45 %, (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 3 %, (K<sub>2</sub>O) 2 %, (CaO) 8 %, (Mg) 1 %, (C) 36 % i elementi u tragovima Zn, Fe, Mn.

Biopon (B) (proizvođač: Bros, Sp, Poljska); (N) 12 %, (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 5 %, (K<sub>2</sub>O) 10 %, (Mg) 2 %, (S) 35 % + mikroelementi.

Stallatico pellettato (S) (proizvođač: Termocomposti S.p.A., Italija); pH 6-7, (N) 24 %, (C) 23 %, C/N 12/12, (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 3 do 4%, (K<sub>2</sub>O) 3 do 4 % vlažnost 75 %.

U istraživanju su testirana i tri biostimuladora; Organico, Slavol i Čudomix. Biostimuladori su dodavani tri puta tijekom vegetacije prema uputama proizvođača: prva primjena tijekom presađivanja, a ostale dvije u razmaku od dva tjedna.

Organico (O) (proizvođač: Green Grow Group, Srbija) je biostimulator koji sadrži niz prirodnih sastojaka koji potiču rast i razvoj biljaka. Glavne komponente uključuju: aminokiseline (uključujući betain i glicin), vitamine (D, E, K, B kompleks), prirodne biljne hormone (auksine, gibereline, citokinine) te korisne mikroorganizme kao što su bakterije roda *Bacillus* i gljive *Saccharomyces* sp.

Slavol (S) je biostimulator koji sadrži bakterije, prirodne vitamine, enzime i regulatore rasta. Uglavnom se sastoji od bakterija koje provode proces fiksacije dušika i razgradnje fosfora, kao i auksina, biljnih hormona koji potiču rast biljaka.

Čudomix (C) (proizvođač: OPG Vedran Pezelj, Hrvatska) je biostimulator koji sadrži koprivu (*Urtica dioica*), gavez (*Symphytum officinale*), bijeli sljez (*Althea officinalis*), preslicu (*Equisetum arvense*) i maslačak (*Taraxacum officinalis*). Osim biljnih sastojaka, sadrži i dušik te ostale hranjive tvari, kao i biološki aktivne spojeve koji pomažu u zaštiti od gljivičnih i bakterijskih bolesti.

Kontrolni tretman (K) predstavljala je sadnja presadnica salate u posude ispunjene vrtnim tlom čiji sastav je već prethodno naveden, a svaki tretman bio je postavljen u 4 ponavljanja, s 4 posijane presadnice salate (n=112; 7x4x4).

## 2.3 Prikupljanje uzoraka i analitičke metode

U okviru PAV istraživanja, uzorci biljaka prikupljeni su 17. svibnja 2024., dok su biljke iz eksperimenta s organskim gnojivima i biostimulatorima prikupljene 15. lipnja 2024. Svi su uzorci dostavljeni na analizu u Institut Ruđer Bošković u Zagrebu.

### 2.3.1 Analiza sekundarnih metabolita

Analize sekundarnih metabolita (fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, antioksidativna aktivnost i prolin) provedene su na svježoj tvari salate sljedećim postupcima:

Homogenizacija uzoraka provedena je usitnjavanjem svježeg biljnog materijala u tekućem dušiku pomoću mužara i tučka, pri čemu su središnje lisne žile uklonjene prije samog mljevenja. Isti postupak primijenjen je i na suhe uzorke, ali bez uporabe tekućeg dušika. Za fino usitnjavanje korišteno je 100 mg svježeg materijala, koji su obrađeni u mlinu Retsch MM 400 pri frekvenciji od 30 Hz tijekom 2 minute uz dodatak pet kuglica od cirkonijeva oksida.

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva provedena je primjenom 80 %-tnog metanola. Svaki uzorak tretiran je s 1 mL metanola, kratko vorteksiran, zatim podvrgnut visokofrekventnom mljevenju u trajanju od 10 minuta, ultrazvučnoj ekstrakciji tijekom 8 minuta te rotacijskoj homogenizaciji kroz 30 minuta. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 16.000 × g tijekom 10 minuta, a dobiveni supernatanti korišteni su za daljnje analize.

Ukupni polifenoli određeni su metodom Folin–Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1965) u 80 %-tnom metanolu. Rezultati su izraženi kao miligrami ekvivalenata galne kiseline po jedinici svježe mase uzorka (mg GAE/g f.w.). Sadržaj fenolnih kiselina određen je kolorimetrijskom metodom (European Pharmacopeia, 2004) te izražen kao miligrami ekvivalenata kafeinske kiseline po gramu svježe mase uzorka (mg CAE/g f.w.).

Antioksidacijski kapacitet uzoraka procijenjen je in vitro primjenom DPPH testa (Brand-Williams *et al.*, 1995), a rezultati su prikazani kao mikromoli Trolox ekvivalenata po jedinici svježe mase uzorka ( $\mu\text{mol TE/g f.w.}$ ). Ukupni flavonoidi određeni su metodom prema (Zhishen *et al.*, 1999) te izraženi kao miligrami ekvivalenata katehina po jedinici mase uzorka (mg CE/g f.w.). Sadržaj prolina određen je prema protokolu (Carrillo *et al.*, 2011) i izražen kao mikromoli prolina po gramu svježe mase ( $\mu\text{mol prolin/g f.w.}$ ).

Mjerenja su provedena na spektrofotometru Shimadzu BioSpec-1601 E UV/VIS ili na čitaču mikrotitarskih pločica Tecan M200.

## 2.4 Statistička analiza

Statistička analiza podataka obuhvaćala je korelacijsku analizu (Excel) i analizu varijance ANOVA (Tukey HSD,  $p < 0,05$ ) programom SAS 9,1.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Korelacijskom analizom ispitivanih parametara u pokusu s organskim gnojivima i biostimulatorima, neovisno o specifičnim tretmanima, uočena je izrazito jaka pozitivna korelacija između fenola, fenolnih kiselina i flavonoida što sugerira da kombinacija ovih vrsta kondicionera potiče istodobno formiranje sekundarnih metabolita (Tablica 1). S druge strane kod antioksidativne aktivnosti utvrđena je negativna korelacija s fenolima i flavonoidima, ali jaka pozitivna korelacija s prolinom što može ukazivati na činjenicu kako bi u uvjetima istodobne primjene biostimulatora i organskih gnojiva prolin mogao imati značajniju ulogu u ukupnom antioksidativnom odgovoru biljke nego sami fenolni spojevi.

Tablica 1. Korelacije između rezultata ispitivanih sekundarnih metabolita u pokusu s primjenom organskih gnojiva i biostimulatora neovisno o tretmanima

	Fenoli	Fenolne kiseline	Antioksidativna aktivnost	Flavonoidi	Prolin
Fenoli	r= 1	r=0,93***	r=-0,39***	r=0,88***	r=0,28**
Fenolne kiseline		r= 1	r=-0,36***	r=0,91***	r=0,16 ns
Antioksidativna aktivnost			r= 1	r=-0,63***	r=0,72***
Flavonoidi				r= 1	r=-0,35***

Pearsonov koeficijent korelacije (r); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ns – nije statistički značajno (n = 112)

Izvor: obrada autora

Kod salate uzgojene u plateniku i tretirane plazmom aktiviranom vodom (PAV) uočeni su drugačiji trendovi (Tablica 2). Naime, fenoli, flavonoidi i antioksidativna aktivnost bili su u gotovo savršenoj pozitivnoj korelaciji što znači da je u kontroliranim uvjetima platenika PAV tretman vrlo ujednačeno poticao ove obrambene mehanizme.

Tablica 2. Korelacije analiziranih svojstava salate uzgojene u plateniku tretirane s PAV-om neovisno o tretmanima

	Fenoli	Fenolne kiseline	Antioksidativna aktivnost	Flavonoidi	Prolin
Fenoli	r= 1	r=0,23*	r=0,98***	r=0,99***	0,79***
Fenolne kiseline		r= 1	r=0,28**	r=0,25**	r=0,76***
Antioksidativna aktivnost			r= 1	r=0,99***	r=0,66***
Flavonoidi				r= 1	r=0,70***

Pearsonov koeficijent korelacije (r); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ns – nije statistički značajno (n = 112)

Izvor: obrada autora

Pozitivne i relativno visoke korelacije utvrđene su i između prolina i fenolnih spojeva, te antioksidativne aktivnosti (Tablica 2). Korelacija između fenola i prolina te fenolne kiseline i prolina upućuje na povezanost nakupljanja prolina s metabolizmom fenolnih komponenti. Osim toga, prolin je bio pozitivno povezan i s antioksidativnom aktivnošću i flavonoidima, što može odražavati integrirani odgovor biljke na oksidativni stres, pri čemu prolin i fenolni metaboliti sudjeluju u komplementarnim obrambenim mehanizmima odnosno tretiranje PAV-a u plasteniku rezultiralo je sustavnim odgovorom biljke pri čemu su se svi mjereni metaboliti povećavali sinkronizirano.

Tablica 3. Korelacije analiziranih svojstava salate uzgojene u poljskim uvjetima tretirane PAV-om neovisno o tretmanima

	Fenoli	Fenolne kiseline	Antioksidativna aktivnost	Flavonoidi	Prolin
Fenoli	r= 1	r=0,95***	r=0,99***	r=0,99***	r=-0,21*
Fenolne kiseline		r= 1	r=0,99***	r=0,98***	r=-0,28**
Antioksidativna aktivnost			r= 1	r=0,99***	r=-0,41***
Flavonoidi				r= 1	r=-0,29**

Pearsonov koeficijent korelacije (r); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ; ns – nije statistički značajno (n = 112)

Izvor: obrada autora

Korelacijskom analizom rezultata parametara dobivenih uzgojem u poljskim uvjetima (Tablica 3) utvrđena je bitna razlika u smjeru utjecaja posebice kada je u pitanju prolin. Naime, u poljskim uvjetima primjena PAV-a rezultirala je izrazito visokom pozitivnom korelacijom fenola, fenolnih kiselina, flavonoida i antioksidativne aktivnosti, ali kod prolina je utvrđen potpuno suprotan trend u odnosu na plastenički uzgoj jer je prolin bio u negativnoj korelaciji sa svim ostalim metabolitima.

Ovakvi koeficijenti korelacija ukazuju da je antioksidativni odgovor biljke na stres visoko ovisan o fenolnom sastavu, pri čemu flavonoidi i fenolne kiseline predstavljaju ključne komponente antioksidativnog odgovora. Dobiveni rezultati potvrđuju da fenolne kiseline i flavonoidi čine značajnu frakciju fenolnog profila te snažno doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (Li *et al.* 2009).

Isto tako, dobiveni rezultati upućuju na zaključak da su okolišni uvjeti značajno mijenjali način na koji je biljka reagirala na tretmane jer je u poljskim uvjetima došlo do divergencije (dok su fenolni spojevi i antioksidativni kapacitet snažno rasli zajedno, razina prolina se smanjivala ili obrnuto), a u plasteniku je tretman PAV-a doveo do sinergijskog povećanja svih sekundarnih metabolita.

Tretman organskim gnojivima+biostimulatorima bio je specifičan po tome što je uočeno jasno odvajanje antioksidativne aktivnosti od fenolnih spojeva pri čemu je prolin imao najznačajniju ulogu.

Osim korelacijskom analizom, dobiveni rezultati salate uzgojene u eksperimentu s tri organska gnojiva i tri biostimuladora analizirani su i analizom varijance ANOVA (SAS9.1) (Tablica 4) pri čemu je utvrđeno da su tretmani KS i SC pokazali statistički najvišu razinu ukupnih fenola što sugerira

da ove kombinacije najsnažnije potiču biosintezu fenolnih spojeva. Za flavonoide je najuspješniji bio tretman KS s vrijednošću od 14,0920 mg/g sv.t. Kada promatramo antioksidativnu aktivnost tada je najveći učinak imao tretman PC što ga čini statistički značajno različitim u odnosu na PS gdje je zabilježena najniža aktivnost. Tretman PO rezultirao je velikim povećanjem razine prolina (2,4470  $\mu$ mol/g sv.t.) posebice u usporedbi s SS tretmanom. Dobiveni rezultati potvrđeni su i kod istraživanja koje su proveli Saini *et al.* (2024) koji zaključuju da su tretmani organskim gnojivima i biostimulatorima značajno utjecali na formiranje sekundarnih metabolita.

Tablica 4. ANOVA ukupni rezultati po tretmanima salate uzgojene primjenom tri organska gnojiva i tri biostimulatora

Tretman	Fenoli mg GAE/g sv.t	Fenolne kiseline mg CAE/g sv.t	Antioksidativna aktivnost $\mu$ mol TE/g sv.t.	Flavonoidi mg CE/g sv.t	Prolin $\mu$ mol Prolin/g sv.t.
KS	2,5580 a $\pm$ 0,580	2,4190 ab $\pm$ 0,580	0,7310 bc $\pm$ 0,580	14,0920 a $\pm$ 0,580	1,0050 bc $\pm$ 0,580
SC	2,5580 a $\pm$ 0,088	2,5410 a $\pm$ 0,088	0,6960 bc $\pm$ 0,088	13,7940 b $\pm$ 0,088	0,1190 e $\pm$ 0,088
SS	2,3950 ab $\pm$ 0,022	2,3040 abc $\pm$ 0,022	0,7780 b $\pm$ 0,022	12,9220 c $\pm$ 0,022	0,1000 e $\pm$ 0,022
KB	2,2460 abc $\pm$ 0,063	2,2290 abcd $\pm$ 0,063	0,7060 bc $\pm$ 0,063	12,6870 c $\pm$ 0,063	0,1710 de $\pm$ 0,063
BS	2,0250 bc $\pm$ 0,032	1,9190 cde $\pm$ 0,032	0,6920 bc $\pm$ 0,032	10,8820 de $\pm$ 0,032	0,1310 e $\pm$ 0,032
KP	1,9920 bc $\pm$ 0,074	1,9720 bcde $\pm$ 0,074	0,5530 bc $\pm$ 0,074	10,9360 d $\pm$ 0,074	0,8580 bc $\pm$ 0,74
K	1,9905 bc $\pm$ 0,012	1,9231 cde $\pm$ 0,008	0,9639 ab $\pm$ 0,005	10,8839 de $\pm$ 0,006	0,7620 c $\pm$ 0,002
BO	1,9050 bc $\pm$ 0,013	1,7610 def $\pm$ 0,013	0,7220 bc $\pm$ 0,013	10,4010 e $\pm$ 0,013	0,6550 cd $\pm$ 0,013
PS	1,9040 bc $\pm$ 0,016	1,8410 cdef $\pm$ 0,016	0,3430 c $\pm$ 0,016	10,4000 e $\pm$ 0,016	1,0880 bc $\pm$ 0,016
BC	1,8760 cd $\pm$ 0,041	1,8960 cde $\pm$ 0,041	0,8960 ab $\pm$ 0,041	11,0630 d $\pm$ 0,041	1,3250 b $\pm$ 0,041
PC	1,7710 cd $\pm$ 0,001	1,6430 de $\pm$ 0,001	1,2360 a $\pm$ 0,001	9,6030 f $\pm$ 0,001	1,3090 b $\pm$ 0,001
PO	1,7760 cd $\pm$ 0,002	1,5800 de $\pm$ 0,002	1,0030 ab $\pm$ 0,002	9,3220 f $\pm$ 0,002	2,4470 a $\pm$ 0,002
SO	1,4060 d $\pm$ 0,011	1,3730 e $\pm$ 0,011	0,9010 ab $\pm$ 0,011	7,9800 g $\pm$ 0,001	0,2200 de $\pm$ 0,011
HSD 0,4921					

K (Kontrola), KS (Kontrola Stallatico pelletato), SC (Stallatico pelletato – Čudomix), SS (Stallatico pelletato -Slavol), KB (Kontrola Biopon), BS (Biopon – Slavol), KP (Kontrola Plantella organik), K (Kontrola), BO (Biopon – Organico), PS (Plantella organik – Slavol), BC (Biopon – Čudomix), PC (Plantella organik – Čudomix), PO (Plantella organik – Organico), SO (Stallatico pelletato – Organico), a,b iste slovne oznake upućuju da unutar kolone nema statističkih značajnih razlika (Tukey HSD,  $p < 0,05$ )

Izvor: obrada autora

Rezultati istraživanja Liu, X. *et al.* (2007) i Luna *et al.* (2013) potvrđuju da primjena biostimulatora u kombinaciji s organskim gnojivima (poput KS i SC) primarno utječe na povećanje koncentracije antioksidativnih spojeva.

Činjenica da razlika od 150 mL između tretmana PAV 1 i PAV 2 nije nadoknađena destiliranom vodom bila je presudna za interpretaciju rezultata analize varijance o tome kako različite doze plazmom aktivirane vode (PAV) utječu na metabolizam salate jer tretman P2 nije predstavljao samo dvostruko veću dozu aktivnih tvari iz plazme, već i dvostruko veći volumen tekućine po zalijevanju (Tablica 5. i 6.).

Kod salate uzgojene u plasteniku, rezultati pokazuju da povećanje doze/volumena PAV-a smanjuje većinu sekundarnih metabolita, osim prolina kod kojeg je najveća koncentracija izmjerena kod P2 tretmana (Tablica 5). Ovakvi rezultati vjerojatno su posljedica neujednačenosti i doze/volumena jer je vjerojatno veća količina PAV-a (P2) djelovala kao stresni faktor kod salate što je rezultiralo nakupljanjem prolina kao osmoprotektanta dok je sinteza fenola i flavonoida bila inhibirana.

Tablica 5. ANOVA rezultati metaboličke aktivnosti salate uzgojene u plasteniku pod PAV tretmanom

Tretman	Fenoli mg GAE/g sv.t	Fenolne kiseline mg CAE/g sv.t	Antioksidativna aktivnost μmol TE/g sv.t.	Flavonoidi mg CE/g sv.t	Prolin μmol Prolin/g sv.t.
K	0,9830 a ±0,007	0,5927 b ±0,005	3,8263 a ±0,001	0,7170 a ±0,001	0,2430 c ±0,001
P 1	0,9384 b ±0,01	0,5419 c ±0,002	3,6470 b ±0,002	0,6780 b ±0,002	0,5770 b ±0,002
P 2	0,8201 c ±0,05	0,6043 a ±0,001	2,9070 c ±0,001	0,6210 c ±0,001	0,6520 a ±0,001
HSD	0,0128	0,0086	0,0043	0,0040	0,0040

K (Kontrola), P1 (PAV 1; 150 mL dodano po zalijevanju), P2 (PAV 2 300 mL dodano po zalijevanju), a,b iste slovne oznake upućuju da unutar kolone nema statističkih značajnih razlika (Tukey HSD,  $p < 0,05$ )

Izvor: obrada autora

Metabolička aktivnost salate uzgojene u poljskim uvjetima bila je bitno drugačija i ukazuje kako je tretman P1 znatno povećao razinu fenola, fenolnih kiselina, antioksidativne aktivnosti i flavonoida (2,03) u usporedbi s kontrolom što se može tumačiti činjenicom da su biljke u poljskim uvjetima izložene većem prirodnom stresu pa je tretman P1 (150 mL) djelovao kao snažan biostimulator dok je povećanje doze/volumena od 300 mL smanjilo pozitivan učinak plazmom aktivirane vode (Tablica 6).

Tablica 6. ANOVA rezultati metaboličke aktivnosti salate uzgojene u poljskim uvjetima pod PAV tretmanom

Tretman	Fenoli mg GAE/g sv.t	Fenolne kiseline mg CAE/g sv.t	Antioksidativna aktivnost μmol TE/g sv.t.	Flavonoidi mg CE/g sv.t	Prolin μmol Prolin/g sv.t.
K	1,7250 c ±0,001	1,3590 c ±0,001	7,5140 c ±0,001	1,3720 c ±0,001	0,1890 a ±0,001
P 1	2,2570 a ±0,001	2,0510 a ±0,001	11,0410 a ±0,001	2,0320 a ±0,001	0,1320 b ±0,001
P 2	1,7410 b ±0,001	1,7300 b ±0,001	7,8360 b ±0,001	1,5430 b ±0,001	0,1300 b ±0,001
HSD 0,0026					

K (Kontrola), P1 (PAV 1; 150 mL dodano po zalijevanju), P2 (PAV 2 300 mL dodano po zalijevanju), a,b iste slovne oznake upućuju da unutar kolone nema statističkih značajnih razlika (Tukey HSD,  $p < 0,05$ )

Izvor: obrada autora

Usporedba rezultata analize varijance uzgoja u plasteniku i u poljskim uvjetima, pokazala je da učinak tretmana na sekundarne metabolite ovisi o uvjetima uzgoja te dovodi do različitih odgovora. Dok su fenoli i prolini u oba pokusa ostali stabilni i statistički nepromijenjeni, ostali parametri pokazali su ovisnost o načinu uzgoja i tretmanu. Također, činjenica da volumen vode nije bio ujednačen u oba tretmana jasno govori da utjecaj doze/volumena PAV-a nije linearan te da učinkovitost PAV-a ovisi o interakciji između količine primijenjene aktivirane vode i mikroklimatskih uvjeta uzgoja.

Ovakvi rezultati potvrđeni su i dosadašnjim istraživanjima drugih istraživača pa tako Kučerova, *et al.* (2021) tvrdi kako je PAV tretman pokazao pozitivan učinak na povećanje koncentracija nekih sekundarnih metabolita (fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, antioksidativne aktivnosti i prolina) u odnosu na kontrolu. Guragain *et al.* (2023.) u svom istraživanju zaključuju da je uzgoj na otvorenom (polje) rezultirao višim prosječnim sadržajem fenola, fenolnih kiselina, antioksidativne aktivnosti i flavonoida u salati u odnosu na uzgoj u plasteniku, što je potvrđeno i u našem istraživanju (Tablica 6). Dobiveni rezultati su u skladu s činjenicom da su biljke uzgajane u polju, izložene većim stresovima (npr. promjenama temperature), pa su im potrebni viši obrambeni spojevi. Jedina iznimka je bio prolin, čija je koncentracija bila viša u plasteničkim uvjetima, što može biti odgovor na povišene temperature (stres) unutar plastenika kako tvrdi Lindsay *et al.* (2014), a slične rezultate dobili su Whitaker *et al.* (1974.) koji su također utvrdili višu koncentraciju prolina u kontroliranim uvjetima uzgoja.

Analiza dobivenih rezultata ovim istraživanjem pokazuje da obje metode PAV i organska gnojiva+biostimulatori predstavljaju učinkovite alate za poboljšanje i prinosa i kvalitete salate u održivoj poljoprivredi.

Iako je PAV u odnosu na kontrolu pozitivno utjecao na akumulaciju sekundarnih metabolita, njegov utjecaj na samu akumulaciju sekundarnih metabolita bio je znatno nadmašen utjecajem

uvjeta uzgoja (veći metaboliti na otvorenom) što je potvrđeno i drugim istraživanjima (Li *et al.*, 2022; Lucini *et al.*, 2018).

S druge strane, kombinacije organskih gnojiva i biostimulatora (kao što su SC, CS i PO) pokazale su se izuzetno moćnima u specifičnom moduliranju biokemijskog profila salate, omogućujući ciljano povećanje fenola, flavonoida i prolina što je potvrđeno i u istraživanjima Li *et al.* (2009) te Cho *et al.* (2023). Naime, navedeni autori tvrde da se PAV tretman fokusira prvenstveno na opskrbu dušikom i stimulaciju rasta, a kvaliteta sekundarnih metabolita ovisi uglavnom o stresu iz okoliša (polje). Nasuprot tome, biostimulatori ne djeluju kao izravni izvor hranjiva, već aktiviraju endogene obrambene mehanizme biljke (priming) koji, ovisno o primijenjenoj kombinaciji, dovode do značajne i ciljane akumulacije specifičnih sekundarnih metabolita neovisno o vanjskom stresu.

Ovi rezultati potvrđuju da oba pristupa (tretman s plazmom aktiviranom vodom te primjena organskih gnojiva u kombinaciji s biostimulatorima) predstavljaju “učinkovite i održive strategije”, ali s različitim biokemijskim ishodima. Organska gnojiva i biostimulatori više stimuliraju “prolinski put” zaštite, dok PAV snažnije aktivira “fenolni put”. Naime, plazmom aktivirana voda (PAV) značajno utječe na sekundarni metabolizam salate, ali njezina učinkovitost jako varira ovisno o uvjetima uzgoja i primijenjenoj dozi. Tako možemo reći da je za postizanje maksimalne nutritivne vrijednosti (najviši fenoli i flavonoidi) bio najbolji tretman Kontrola-Stallatico pelletato (KS), a za postizanje maksimalne otpornosti i antioksidativnog kapaciteta biljke u poljskim uvjetima uzgoja najučinkovitija je bila primjena niže doze PAV-a (P1).

U stresnijim poljskim uvjetima, izloženost fluktuacijama temperature i intenzivnijem svjetlu dovela je do maksimalne metaboličke usklađenosti ( $r = 0.95$ ) unutar fenolnog antioksidativnog sustava (fenoli-flavonoidi-antioksidativna aktivnost). U takvom okruženju, PAV tretman (P1) djeluje kao snažan okidač za tu usklađenost, značajno pojačavajući antioksidativni odgovor biljke. To sugerira da reaktivne vrste dušika i kisika iz PAV-a, djelujući kao signalne molekule, pojačavaju već prisutan odgovor na stres uzrokovan vanjskim uvjetima. S druge strane, u kontroliranim plasteničkim uvjetima, gdje je fenolni sustav slabije izražen, primjena veće doze PAV-a (P2) rezultirala je inhibicijom. Ta činjenica ukazuje da je za praktičnu primjenu ključno precizno doziranje, jer višak aktivirane vode u kontroliranim uvjetima može izazvati kontraefekt i smanjiti kvalitetu prinosa pa se daljnja istraživanja moraju fokusirati na precizno doziranje i protokole PAV-a ovisno o tipu uzgoja kako bi se maksimizirao biostimulativni, a izbjegao inhibicijski učinak.

Oba pristupa predstavljaju “učinkovite i održive strategije” koje omogućuju manipulaciju nutritivnim profilom salate bez primjene sintetičkih kemikalija.

#### 4. ZAKLJUČAK

Provedeno istraživanje potvrđuje da primjene plazmom aktivirane vode (PAV) te kombinacija organskih gnojiva i biostimulatora predstavljaju učinkovite i održive strategije za ciljano modificiranje biokemijskog profila salate (*Lactuca sativa* L.). Ovi pristupi omogućuju

značajno poboljšanje nutritivne vrijednosti i antioksidativnog kapaciteta salate što je ključno u kontekstu rastućih zahtjeva u poljoprivrednoj proizvodnji za produkciju „sigurne“ hrane uz očuvanje prirodnih resursa.

Rezultati ovog rada u skladu su s trenutnim spoznajama u NTP tehnologiji (hladna plazma) koja se sve više istražuje kao ekološki prihvatljiva zamjena za umjetna gnojiva, te sa spoznajama koje ukazuju na to da PAV služi kao medij za reaktivne kisikove i dušikove spojeve, koje djeluju kao signalne molekule u biljnom metabolizmu, potičući obrambene mehanizme i rast. Naše istraživanje potvrđuje da PAV primarno aktivira “fenolni put” zaštite, osobito u stresnijim poljskim uvjetima gdje reaktivni spojevi dodatno pojačavaju prirodni odgovor biljke na protok temperature i svjetlosti. S druge strane, primjena biostimulatora u kombinaciji s organskim gnojivima (poput tretmana KS i SC) ne djeluje samo kao izvor hraniva, već aktivira endogene obrambene mehanizme (priming), što dovodi do značajne akumulacije fenola i flavonoida neovisno o vanjskom stresu.

Iako su svi tretmani pokazali visoki potencijal, dobiveni rezultati ukazuju na nekoliko ključnih smjerova za budući znanstveni rad koji se odnosi na:

- razvoj specifičnih protokola doziranja prilagođenih različitim sustavima uzgoja (plastenik vs. otvoreno polje),
- ispitivanje sinergije između volumena primijenjene PAV-a i specifičnih mikroklimatskih parametara kako bi se maksimizirao biostimulativni učinak,
- istraživanje dugoročnog utjecaja integrirane primjene PAV-a i biostimulatora na mikrobiološku aktivnost rizosfere i plodnost tla.

Integracija ovih inovativnih tehnologija nudi snažan alat za razvoj održive poljoprivrede, omogućujući proizvodnju povrća visoke biološke vrijednosti uz minimalan ekološki otisak.

## LITERATURA

- Abbaszadeh, R., Khosravi, N., Fattahi, M. and Marzdashti, H.G. (2021) ‘The effects of three plasma-activated water generation systems on lettuce seed germination’, *Research in Agricultural Engineering*, 67, pp. 131–137.
- Adhikari, B., Pangomm, K., Veerana, M. and Mitra, S. (2020) ‘Plant disease control by non-thermal atmospheric-pressure plasma’, *Frontiers in Plant Science*, 11, p. 77. doi:10.3389/fpls.2020.00077.
- Bafoil, M., Le Ru, A., Merhabi, N., Eichwald, O., Dunand, C. and Yousfi, M. (2019) ‘New insights of low-temperature plasma effects on germination of three genotypes of *Arabidopsis thaliana* seeds under osmotic and saline stress’, *Scientific Reports*, 9, p. 8649. doi:10.1038/s41598-019-44927-4.
- Bhattacharya, A., Priyanka, S. and Citovsky, V. (2010) ‘The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* infection’, *Molecular Plant Pathology*, 11, pp. 705–719. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. (1995) ‘Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity’, *LWT - Food Science and Technology*, 28, pp. 25–30.
- Carillo, P. and Gibon, Y. (2011) *Protocol: Extraction and Determination of Proline*. Amherst, NY: Prometheus Wiki, pp. 1–5.

- Chowdhury, S.P., Babin, D., Sandamann, M., Jacquid, S., Sommermann, L., Sorensen, S.J., Fließbach, A., Mader, P., Geistlinger, J., Smalla, K., Rothballer, M. and Grosch, R. (2019) 'Effect of long-term organic and mineral fertilization strategies on rhizosphere microbiota assemblage and performance of lettuce', *Environmental Microbiology*, 21(7), pp. 2426–2439. doi:10.1111/1462-2920.14631.
- Cho, E., Gurdon, C., Zhao, R., Peng, H., Poulev, A., Raskin, I. and Simko, I. (2023) 'Phytochemical and agronomic characterization of high-flavonoid lettuce lines grown under field conditions', *Plants*, 12, p. 3467.
- Fan, L., Liu, X., Ma, Y. and Xiang, Q. (2020) 'Effects of plasma-activated water treatment on seed germination and growth of mung bean sprouts', *Journal of Taibah University for Science*, 14, pp. 823–830. doi:10.1080/16583655.2020.1778326.
- Fließbach, A., Oberholzer, H.R., Gunst, L. and Mäder, P. (2007) 'Soil organic matter and biological soil quality indicators after 21 years of organic and conventional farming', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 118, pp. 273–284.
- Guragain, R.P., Baniya, H.B., Shrestha, B., Guragain, D.P. and Subedi, D.P. (2023) 'Improvements in germination and growth of sprouts irrigated using plasma activated water (PAW)', *Water*, 15, p. 744. doi:10.3390/w15040744.
- Holubova, L., Kyzek, S., Durovcova, I., Fabova, J., Horvathova, E., Sevcovicova, A. and Galova, E. (2020) 'Non-thermal plasma—A new green priming agent for plants?', *International Journal of Molecular Sciences*, 21, p. 9466. doi:10.3390/ijms21249466.
- Kiehl, E.J. (1985) *Fertilizantes Orgânicos*. São Paulo: Ceres, p. 492.
- Kučerova, K., Henselova, M., Slovakova, L., Bačovčinova, M. and Hensel, K. (2021) 'Effect of plasma activated water, hydrogen peroxide and nitrates on lettuce growth and its physiological parameters', *Applied Sciences*, 11, p. 1985.
- Lamichhane, P., Veerana, M., Lim, J.S., Mumtaz, S., Shrestha, B., Kaushik, N.K., Park, G. and Choi, E.H. (2021) 'Low-temperature plasma-assisted nitrogen fixation for corn plant growth and development', *International Journal of Molecular Sciences*, 22, p. 5360.
- Li, J., Van Gerrewey, T. and Geelen, D. (2022) 'A meta-analysis of biostimulant yield effectiveness in field trials', *Frontiers in Plant Science*, 13, p. 836702.
- Lindsay, A., Byrns, B., King, W., Andhvarapou, A., Fields, J., Knappe, D., Fonteno, W. and Shannon, S. (2014) 'Fertilization of radishes, tomatoes, and marigolds using a large-volume atmospheric glow discharge', *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 34, pp. 1271–1290.
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A. and Kondracka, K. (2013) 'Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield: A review', *International Agrophysics*, 27(4), pp. 463–477. doi:10.2478/intag-2013-0017.
- Li, Q. and Kubota, C. (2009) 'Effect of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce', *Environmental and Experimental Botany*, 67, pp. 59–64.
- Liu, X., Ardo, S., Bunning, M., Parry, J., Zhou, K., Stushnoff, C., Stoniker, F., Yu, L. and Kendall, P. (2014) 'Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado', *LWT - Food Science and Technology*, 40, pp. 552–557.
- Lucini, L., Roupheal, Y., Cardarelli, M., Bonini, P., Baffi, C. and Colla, G. (2018) 'A vegetal biopolymer-based biostimulant promoted growth in melon while triggering brassinosteroids and stress-related compounds', *Frontiers in Plant Science*, 9, p. 472.
- Luna, M.C., Martínez-Sánchez, A., Selma, M.V., Tudela, J.A., Baixauli, C. and Gil, M.I. (2013) 'Influence of nutrient solutions in an open-field soilless system on the quality characteristics and shelf life of fresh-cut red and green lettuces (*Lactuca sativa* L.) in different seasons', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, pp. 415–421.

- Mulvaney, R.L., Khan, S.A. and Ellsworth, T.R. (2010) 'Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: A global dilemma for sustainable cereal production', *Journal of Environmental Quality*, 39, pp. 1526–1527. doi:10.2134/jeq2010.0003le.
- Randeniya, L.K. and Groot, J.B. (2015) 'Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: A review', *Plasma Processes and Polymers*, 12, pp. 608–623. doi:10.1002/ppap.201500042.
- Saini, N., Anmol, A., Kumar, S., Wani, A.W., Bakshi, M. and Dhiman, Z. (2024) 'Exploring phenolic compounds as natural stress alleviators in plants: A comprehensive review', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 133, p. 102383.
- Sarmiento, J.J.A., Costa, C.C., Dantas, M.V., Lopes, K.P., Macedo, C., Bomfim, M.P. and Barbosa, J.W.S. (2019) 'Productivity of lettuce under organic fertilization', *Journal of Agricultural Science*, 11, pp. 333–343.
- Shaw, P., Kumar, N., Kwak, H.S., Park, J.H., Uhm, H.S., Bogaerts, A., Choi, E.H. and Attri, P. (2018) 'Bacterial inactivation by plasma treated water enhanced by reactive nitrogen species', *Scientific Reports*, 8, p. 11268.
- Škarpa, P., Klofáč, D., Krčma, F., Šimečková, J. and Kozáková, Z. (2020) 'Effect of plasma activated water foliar application on selected growth parameters of maize (*Zea mays* L.)', *Water*, 12, p. 3545. doi:10.3390/w12123545.
- Romanjek Fajdetić, N., Blažinkov, M., Božić Ostojić, Lj., Miroslavljević, K., Antunović, S., Knezović, I., Benković, R., Sviličić, P. and Benković Lačić, T. (2024) 'Influence of PAW on the lettuce growth and formation of secondary metabolites in different growing conditions', *Horticulturae*, 10(12), p. 1367.
- Romanjek Fajdetić, N., Božić Ostojić, L., Benković, R., Zima, D., Blažinkov, M., Miroslavljević, K., Popović, B. and Benković-Lačić, T. (2025) 'Effects of three organic fertilizers and biostimulants on the morphological traits and secondary metabolite content of lettuce', *Horticulturae*, 11, p. 1288. doi:10.3390/horticulturae11111288.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965) 'Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents', *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp. 144–158.
- Umumararungu, T., Gahamanyi, N., Mukiza, J., Habarurema, G., Katandula, J., Rugamba, A. and Kagisha, V. (2024) 'Proline, a unique amino acid whose polymer, polyproline II helix, and its analogues are involved in many biological processes: A review', *Amino Acids*, 56(1), p. 50. doi:10.1007/s00726-024-03410-9.
- Whitaker, T.W. (1974) *Lettuce Production in the United States*. Agricultural Handbook No. 21. Washington, DC: United States Department of Agriculture. Available at: [https://books.google.hr/books/about/Lettuce\\_Production\\_in\\_the\\_United\\_States.html?id=f2OLxAEACAAJ&rdir\\_esc=y](https://books.google.hr/books/about/Lettuce_Production_in_the_United_States.html?id=f2OLxAEACAAJ&rdir_esc=y) (Accessed: 2 August 2025).
- Zhao, X., Carey, E.E., Young, J.E., Wang, W.Q. and Iwamoto, T. (2007) 'Influences of organic fertilization, high tunnel environment, and postharvest storage on phenolic compounds in lettuce', *HortScience*, 42, pp. 71–76.
- Zhishen, J., Mengcheng, T. and Jianming, W. (1999) 'The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals', *Food Chemistry*, 64, pp. 555–559.



Creative Commons Attribution –  
NonCommercial 4.0 International License

Original scientific paper

<https://doi.org/10.31784/zvr.14.1.27>

Received: 28. 11. 2025.

Accepted: 24. 3. 2026.

# BIOCHEMICAL RESPONSE OF LETTUCE TO TREATMENTS WITH PLASMA ACTIVATED WATER AND ORGANIC FERTILIZERS/BIOSTIMULANTS

**Nataša Romanjek Fajdetić**

PhD, Assisant Professor, University of Slavonski Brod, Biotechnical department, 108. brigade ZNG 36,  
35000 Slavonski Brod, Croatia; email: nrfajdetic@unisb.hr

**Brigita Popović**

PhD, Full Professor, Josip Juraj Strossmayer University, Faculty of agrobiotechnical sciences of Osijek,  
Department of Agroecology, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia; email: bpopovic@fazos.hr

## ABSTRACT

*In the context of increasing demands for sustainable agriculture and high-quality food production, this study investigates the effects of plasma-activated water (PAW) and organic fertilizers supplemented with biostimulants on the synthesis of secondary metabolites in lettuce (*Lactuca sativa* L.) cv. Maradona. The objective of this study was to evaluate the impact of PAW treatments, as well as the application of organic fertilizers in combination with biostimulants, on the accumulation of secondary metabolites in lettuce. The experiment was conducted using a two-factorial design at the experimental site of the University of Slavonski Brod, under both greenhouse and open-field conditions. PAW was applied at two dosages (P1 and P2), while organic fertilizers (S, P, B) were combined with biostimulants (C, O, S) in multiple treatment combinations. The data were analyzed using correlation analysis and analysis of variance (ANOVA). The results indicated that phenolic compounds are the primary contributors to antioxidant activity. In treatments involving organic fertilizers and biostimulants, antioxidant activity was positively correlated with proline content ( $r = 0.72$ ), whereas no significant correlation with total phenolics was observed. In contrast, PAW treatments exhibited a very strong correlation ( $r \geq 0.98$ ) between phenolic content, flavonoids, and antioxidant activity, particularly under greenhouse conditions. Lettuce grown under open-field conditions exhibited higher concentrations of phenolics and flavonoids compared to greenhouse-grown plants. Under field conditions, PAW (P1) significantly increased phenolic acids, flavonoid content, and antioxidant capacity, whereas in greenhouse conditions, the higher dose (P2) exerted an inhibitory effect. Among the tested treatments, the CS and SC combinations induced the highest biochemical responses, achieving the greatest accumulation of phenolics (2.5580 mg GAE/g fresh weight) and flavonoids (14.0920 mg CE/g fresh weight in CS). The PO treatment resulted in the highest proline accumulation (2.447  $\mu$ mol proline/g fresh weight). Overall, the findings suggest that plasma-activated water and selected biostimulants in combination with organic fertilizers can be strategically employed to enhance the nutritional quality of lettuce. However, their effectiveness is strongly influenced by environmental stress conditions.*

**Keywords:** *Lactuca sativa*, secondary metabolites, plasma-activated water, fertilizers, biostimulants