

PRIRUČNIK ZA ODREĐIVANJE PRISTUPAČNOG SILICIJUMA U ZEMLJIŠTU

Ljiljana Kostić Kravljanc¹, Jelena Pavlović, Predrag Bosnić, Igor Kostić,
Maja Trailović, Tijana Dubljin, Miroslav Nikolić²

Laboratorija za ishranu biljaka
Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

¹Rukovodilac projekta “Si4Crop”

²Predsednik Međunarodnog društva za silicijum u poljoprivredi (ISSAG)



Beograd, jun 2022.

Sadržaj:

1. Uvod.....	3
2. Analiza pristupačnog silicijuma u zemljištu.....	4
2.1. Metode ekstrakcije rastvorljivog silicijuma iz zemljišta.....	5
2.2. Metode određivanja silicijuma u ekstraktu zemljišta.....	8
3. Literatura.....	10

1. Uvod

Silicijum (Si) je drugi hemijski elemenat, posle kiseonika, po kvantitativnoj zastupljenosti u zemljištu. Prvenstveno, silicijum ulazi u sastav primarnih (npr. kvarc) i sekundarnih (minerali gline) minerala zemljišta, ali se može naći i u drugim oblicima biološkog (ostaci dijatomejskih algi i fitoliti viših biljaka) i neorganskog (tercijerni silikati) porekla. Pored ovih relativno inertnih oblika silicijuma koji se mogu naći u zemljištu, monosilicijumova kiselina predstavlja rastvorljivi oblik silicijuma u zemljišnom rastvoru i spada u grupu slabih kiselina. Obzirom da je u većini poljoprivrednih zemljišta pH reakcija zemljišnog rastvora manja od 8, najzastupljeniji je nejonizovani oblik silicijumove kiseline ($H_4SiO_4^0$), čija je koncentracija u opsegu 0,1 do 0,6 mM, što su koncentracije nekoliko desetina puta veće od koncentracija makroelmenata u zemljišnom rastvoru. Silicijumova kiselina ujedno predstavlja i jedini pristupačni oblik silicijuma koji biljke mogu da usvoje korenom iz zemljišta. Na transformaciju svih pomenutih oblika silicijuma u zemljištu utiču brojni fizičko-hemijski činioci, koji terminalno dovode do oslobađanja silicijumove kiseline i dalje uključivanje u cikluse kruženja ovog elementa u sistemu zemljište-biljka.

Iako je kvantitativno i najzastupljeniji mineralni elemenat u biljnim tkivima, silicijum ne zadovoljava prvi kriterijum esencijalnosti mineralnih elemenata po prihvaćenoj definiciji, da biljka bez njega ne može da završi svoj ciklus rastenja i razvića. To je i glavni razlog zbog čega silicijum još uvek nije uvršten u grupu esencijalnih elemenata za više biljke, iako je to jedini do sada poznati elemenat koji uspešno ublažava različite oblike biotičkog i abiotičkog stresa kod mnogih biljnih vrsta, uključujući biljne bolesti i štetočine, sušu, zaslanjenost zemljišta, plavljenje, toksičnost metala, nedostatak hraniva, UV zračenje, visoke i niske temperature. Iako je njegov blagotvoran efekat na biljke koje su izložene stresu, a posebno na prinos ekonomski značajnih poljoprivrednih kultura, poznat više od jednog veka, tek je nedavno silicijum zvanično uvršten u grupu korisnih mineralnih elemenata za biljke. Poslednjih godina je sve više argumenata o esencijalnosti silicijuma za pojedine poljoprivredne kulture, kao što su pirinač i šećerna trska, koje bez đubrenja ovim elementom ne postižu adekvatne prinose i pate od napada bolesti i štetočina.

Imajući u vidu rastuće interesovanje za silicijum ne samo u naučnim krugovima, već i u poljoprivrednoj praksi, a posebno u vreme porasta stresa kojim su usevi izloženi usled globalnih klimatskih promena, kontrola pristupačnosti silicijuma u zemljištu postaje neophodna kako bi se predupredio njegov nedostatak, koji bi za posledicu imao smanjenje otpornosti useva na stres. Stoga smatramo da će ovaj priručnik koristiti laboratorijama koje se bave kontrolom plodnosti zemljišta kako bi uvrstile analizu pristupačnog silicijuma u zemljištu u svoje standardne metode, u cilju određivanja potreba useva, posebno strnih žita, za ovim korisnim elementom.

Zahvalnost dugujemo Fondu za nauku Republike Srbije koji je prepoznao značaj silicijuma za poljoprivredu i omogućio naša istraživanja kroz projekat broj 7739571 “*Silicon for Crops in the 21st Century – Si4Crop*”.

2. Analiza pristupačnog silicijuma u zemljištu

Kako ukupan sadržaj silicijuma u zemljištu ne odražava rastvorljivi silicijum u zemljištu, te stoga ne pruža informaciju o njegovoj pristupačnosti za biljke, pristupilo se testiranju različitih ekstrakcionih metoda, kako bi se dobila informacija o pristupačnom silicijumu u zemljišnom rastvoru i upoređivanju sa silicijumom koji je biljka usvojila. Na osnovu takvih testiranja izdvojena su sledeća ekstrakciona sredstva koja se najčešće mogu koristiti za određivanje silicijuma u zemljištu koji je pristupačan biljkama: destilovana voda; amonijumacetat, razblažena H_2SO_4 , razblažena limunska kiselina, razblažena sirćetna kiselina, razblaženi $CaCl_2$, fosfatni pufer (pH 6,2), itd. Utvrđeno je da je ekstrakcija silicijuma efikasnija na nižim pH vredostima ekstrakcionog rastvora, a na efikasnost ekstrakcije silicijuma utiču i drugi činioci, poput tipa zemljišta (posebno sadržaja gline i peska, kao i odnosa Si:Al), odnosa zemljište:ekstrakcioni rastvor, temperature, vremena ekstrakcije. Međutim, do sada ne postoji univerzalno ekstrakciono sredstvo koje bi moglo da se koristi za sva zemljišta, tako da sve metode ekstrakcije imaju određene nedostatke. Tako, na primer, acetatni pufer u zemljištima koja su prethodno đubrena Si đubrivima može da ekstrahuje i deo silicijuma iz slabo rastvorljivog kalcijum silikata, kao i kalcijum silikata u karbonatnim zemljištima, tako da ova metoda nije podesna za karbonatna zemljišta. Sa druge strane razblažena H_2SO_4 i limunska kiselina predstavljaju efikasna ekstrakciona sredstva za pristupačni silicijum za neutralna i alkalna (karbonatna) zemljišta. Tokom procesa sušenja uzoraka zemljišta dolazi do promene u ravnoteži monosilicijumove kiseline, te stoga ekstrakcija rastvorljivog silicijuma vodom, zbog slabe jonske snage ekstrakcionog rastvora iziskuje duži vremenski period inkubacije kako bi se postigla ravnoteža. Sa druge strane, ekstrakcija razblaženim rastvorom $CaCl_2$ pokazuje dobru korelaciju sa koncentracijom silicijumove kiseline, zbog jače jonske snage rastvora i bržeg postizanja hemijske ravnoteže u odnosu na vodu. Silicijum ekstrahovan razblaženim rastvorima $CaCl_2$ i limunske kiseline najčešće verno oslikava lako pristupačni silicijum u zemljišnom rastvoru, dok na ekstrakciju silicijuma razblaženim rastvorima amonijum acetata i sirćetne kiseline značajno utiču pH i CEC zemljišta, kao i odnos Si:Al u zemljišnom rastvoru. Dosadašnja istraživanja, uključujući i naša skorija istraživanja, ukazuju da su 0,025 M limunska kiselina i 0,01 M $CaCl_2$ najpodesniji ekstraktanti za određivanje pristupačnog silicijuma u različitim zemljištima, jer pokazuju visoku korelaciju sa silicijumom u usevima. Skorije je pokazao da metoda ekstrakcije po Melihu (Mehlich-3), koja spada u univerzalne metode ekstrakcije različitih makro- i mikroemelenata iz zemljišta, takođe predstavlja i pouzdanu metodu za procenu pristupačnog silicijuma u zemljištu. Uporednim analizama pristupačnog silicijuma u zemljištu ustanovljen je sledeći redosled prema količinama ekstrahovanog silicijuma: Mehlich 3 > limunska kiselina > sirćetna kiselina > acetatni pufer > amonijum acetat > destilovana voda.

Treba naglasiti da sadržaj silicijuma ekstrahovan bilo kojim ekstrakcionim rastvorom predstavlja dakle samo relativnu procenjenu vrednost i ona nije nikada jednaka stvarnoj koncentraciji pristupačnog silicijuma za biljke. Međutim, te relativne vrednosti se mogu koristiti za dijagnozu nedostatka silicijuma za useve (posebno one koji akumuliraju velike količine silicijuma u svojim tkivima, kao npr. strna žita) zajedno sa koncentracijom silicijuma

u biljnim tkivima. Stoga je potrebno još mnogo istraživanja da bi se potvrdilo da li bilo koja od opisanih ekstrakcionih sredstava pokazuje dobre korelacije sa usvajanjem silicijuma od strane useva na određenim područjima. Kritične vrednosti pristupačnog silicijuma u zemljištu za različite metode ekstrakcije su prikazane u Tabeli 1.

U okviru plana projekta “*Si4Crop*“ u Laboratoriji za ishranu biljaka (Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja) testirane su različite metode ekstrakcije zemljišta i dalje će biti opisane one koje su pokazale dobru korelaciju sa usvajanjem silicijuma od strane model biljke pšenice u zemljištima Srbije.

Tabela 1: Kritične vrednosti pristupačnog silicijuma u zemljištu (Liang et al., 2015).

Metoda ekstrakcije	Kritične vrednosti pristupačnog Si u zemljištu
H ₂ O	< 0,9 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak) >2,0 mg Si kg ⁻¹ (obezbeđeno)
Acetatni pufer	< 50 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak)
0,5 M amonijum acetat (pH 4,5-4,8)	< 20 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak) >50 mg Si kg ⁻¹ (obezbeđeno)
0,01 M CaCl ₂ :	< 20 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak)
0,005 M H ₂ SO ₄	<45 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak; peskovita zemljišta) <65 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak; ilovasta zemljišta) <100 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak; glinovita zemljišta)
0,5 M sirćetna kielina	<24 mg Si kg ⁻¹ (nedostatak)

2.1. Metode ekstrakcije rastvorljivog silicijuma iz zemljišta

2.1.1. Ekstrakcija acetatnim puferom

Priprema ekstrakcionog rastvora:

Rastvoriti 49,2 ml glacijalne sirćetne kiseline i 14,8 g anhidrovanog natrijum acetata u normalni sud zapremine 1 l. Dodati 700 ml destilovane vode i pažljivo podesiti pH-vrednost rastvora na 4,0 korišćenjem sirćetne kiseline, odnosno natrijum acetata. Zatim dopuniti normalni sud destilovanom vodom do oznake.

Procedura:

- (1) Odmeriti 10 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u plastičnu reagens bocu od 200 ml.
- (2) Dodati 100 mL 1,0 M acetatnog pufera (pH 4,0).
- (3) Inkubirati reagens boce u vodenom kupatilu na 40 °C tokom 5 h uz povremeno mešanje.
- (4) Po završenoj inkubaciji profiltrirati rastvor kroz kvantitativni filter papir.

2.1.2. Ekstrakcija destilovanom vodom

Procedura:

- (1) Odmeriti 10 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 60 ml destilovane vode.
- (3) Promućkati dobro reagens bocu sve dok izlaze mehurići vazduha.
- (4) Inkubirati reagens boce u vodenom kupatilu na 40 °C tokom 7 dana bez mešanja.
- (5) Profiltrirati rastvor kroz kvantitativni filter papir.

2.1.3. Ekstrakcija kalcijum hloridom

Procedura:

- (1) Odmeriti 10 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 50 ml.
- (2) Dodati 20 ml 0,01 M CaCl₂ u reagens bocu.
- (3) Mućkati tokom 16 h na mućkalici.
- (4) Cetrifugirati na 2000 rpm 10 min ili profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

2.1.4. Ekstrakcija limunskom kiselinom

Procedura:

- (1) Odmeriti 5 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 50 ml 0,025 M limunske kiseline u reagens bocu.
- (3) Mućkati povremeno tokom 5 h inkubacije na 30 °C ili mućkati kontinualno na horizontalnoj mućkalici tokom 2 h na sobnoj temperaturi.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

2.1.5. Ekstrakcija sumpornom kiselinom

Procedura:

- (1) Odmeriti 5 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 50 ml 0,01 M sumporne kiseline u reagens bocu.
- (3) Mućkati kontinualno na horizontalnoj mućkalici tokom 30 minuta na sobnoj temperaturi.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

2.1.6. Ekstrakcija sirćetnom kiselinom

Procedura:

- (1) 10 cm³ vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) preneti u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 25 ml of 0,5 M sićetne kiseline i inkubirati oko 20 h.

- (3) Mućkati na horizontalnoj mućkalici (120 rpm) 50 min.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

2.1.7. Ekstrakcija fosfatnim puferom

Priprema ekstrakcionog rastvora:

Titrirati 0,04 M Na₂HPO₄ sa 0,04 M NaH₂PO₄ do pH 6,2.

Procedura:

- (1) Odmeriti 5 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 50 ml 0,04 M fosfatnog pufera (pH 6,2) u reagens bocu.
- (3) Inkubirati na 40 °C tokom 24 h.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

2.1.8. Ekstrakcija amonijum acetatom

Procedura:

- (1) Odmeriti 2,5 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 100 ml.
- (2) Dodati 50 ml 0,5 M amonijum acetata (pH 4,5-4,8) u reagens bocu.
- (3) Mućkati kontinualno 1 h na sobnoj temperaturi.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.

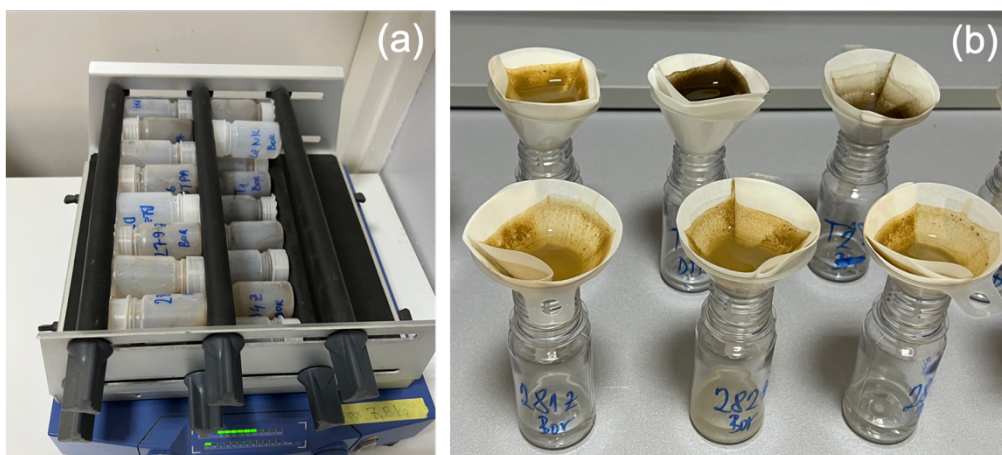
2.1.9. Ekstrakcija po Melihu (Mehlich 3)

Priprema ekstrakcionog rastvora:

1. Rastvor A (1,5 M NH₄F + 0,1 M EDTA) – rastvoriti 55,5 g amonijum fluorida u 600 ml destilovane H₂O u normalnom sudu od 1 l. Dodati 29,23 g etilen-diamin-tetrasirćetne kiseline, dobro promešati i dopuniti destilovanom vodom do oznake i rastvor čuvati u plastičnoj boci.
2. Mehlich 3 rastvor – u normalni sud od 1 l sipati 800 ml destilovane H₂O, rastvoriti 200,1 g amonijum nitrata, dodati 10 ml rastvora A, 11,5 ml koncentrovane sirćetne kiseline, 8,2 ml koncentrovane azotne kiseline. Dopuniti destilovanom vodom do oznake i čuvati u plastičnoj boci.

Procedura:

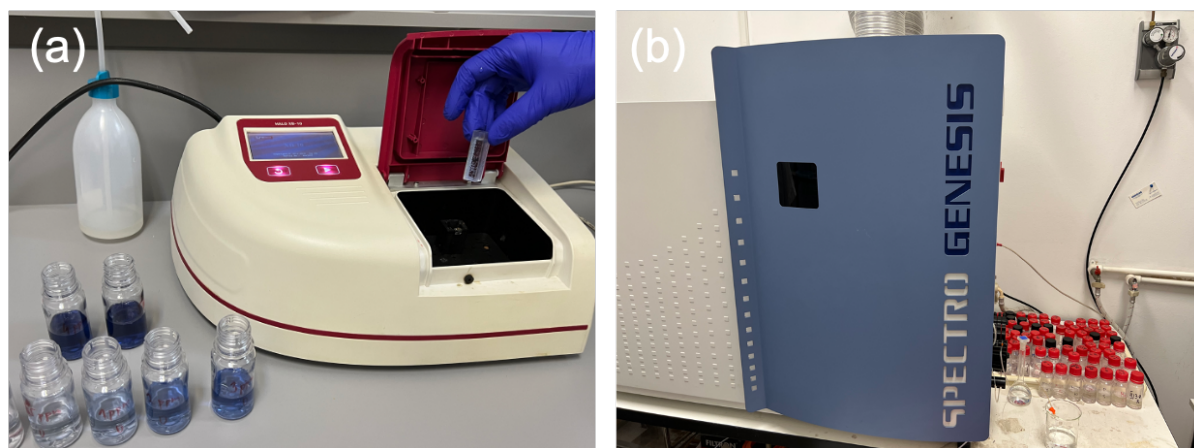
- (1) Odmeriti 2 g vazdušno suvog uzorka zemljišta (prosejanog kroz sito <2 mm) u polietilensku bocu od 50 ml.
- (2) Dodati 20 ml Mehlich 3 rastvora.
- (3) Mućkati kontinualno 5 min na sobnoj temperaturi.
- (4) Profiltrirati kroz kvantitativni filter papir.



Slika 1. Ekstrakcija (a) pristupačnog silicijuma i filtriranje (b) uzoraka zemljišta.

2.2. Metode određivanja silicijuma u ekstraktu zemljišta

Silicijum se u profiltriranom zemljišnom ekstraktu može odrediti na dva načina: 1) indirektno kolorimetrijski, kao plavi siliko-molibdatni kompleks nakon redukcije i dodataka oksalne ili vinske kiseline da spreče interferenciju sa fosforom, i 2) direktno očitavanjem Si na određenim talasnim dužinama metodom optičke emisije spektrofotometrije sa indukovanom spregnutom plazmom (ICP-OES).



Slika 2. Određivanje pristupačnog silicijuma u filtratu zemljišta kolorimetrijski (a) i metodom ICP-OES (b).

2.2.1. Procedura i priprema reagenasa za kolorimetrijsko određivanje silicijuma

Reagensi:

1. Standardni rastvor ($50 \text{ mg l}^{-1} \text{ Si}$) dobijen razblaženjem $1000 \text{ mg l}^{-1} \text{ Si}$ standarda uz dodatak $2,5 \text{ mM HCl}$ da bi se podesila pH rastvora između 2 i 4.
2. $0,5 \text{ M}$ i $0,1 \text{ M B}$, priprema se od H_3BO_3 (čuvaju se u polietilenskim bocama).
3. Stok $0,5 \text{ M Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (čuva se u polietilenskoj boci).
4. Stok H_2SO_4 ($0,8 \text{ M H}_2\text{SO}_4 + 0,5 \text{ M B}$).

5. Radni Mo rastvor (0,25 M Mo + 0,4 M H₂SO₄ + 0,25 M B) sveže se priprema mešanjem istih zapremina stokova H₂SO₄ i Mo (stabilan 30 dana na 5 °C).
6. 0,5 M limunska kiselina, uz dodatak 250 mg l⁻¹ benzoeve kiseline.

Procedura:

- (1) Preneti 1 ml rastvora profiltriranog ekstrakta u polietilenski normalni sud od 50 ml.
- (2) Dodati 30 ml 20% sirćetne kiseline.
- (3) Dodati 10 ml stoka 0,5 M Na₂MoO₄ · 2H₂O (pH 7,0).
- (4) Dobro promešati i ostaviti da se inkubira 5 min.
- (5) Dodati 5 ml 20% vinske kiseline i 1 ml redukcionog rastvora koji sadrži 8 g l⁻¹ Na₂SO₃, 1,6 g l⁻¹ 1-amino-2-naftol-4-sulfonske kiseline i 100 g l⁻¹ NaHSO₃.
- (6) Dopuniti destilovanom vodom do 50 ml sa 20 % sirćetne kiseline i sačekati 30 min.
- (7) Izmeriti apsorbancu na 650 nm na svetlosnom spektrometru.

3. Literatura

- Barbosa MP, Snyder GH, Elliott CL, Datnoff LE. 2001. Evaluation of soil test procedures for determining rice-available silicon. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32:1779–1792.
- Liang Y, Nikolic M, Bélanger R, Gong H, Song A. 2015. *Silicon in Agriculture: From Theory to Practice*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 9789401799775.
- Pavlovic J, Kostic L, Bosnic P, Kirkby EA, Nikolic M. 2021. Interactions of Silicon with essential and beneficial elements in plants. *Front. Plant Sci.* 12: 697592.
- Schaller J, Puppe D. 2021. Heat improves silicon availability in mineral soils. *Geoderma* 386: 114909.
- Wang JJ, Dodla SK, Henderson RE. 2004. Soil silicon extractability with seven selected extractants in relation to colorimetric and ICP determination. *Soil Sci.* 169: 861-870.