

UDK: 581.5:546.3:504.6(045)=163.41

ORIGINALAN NAUČNI RAD

Oblast: Zaštita životne sredine

**FITOREMEDIJACIONI POTENCIJAL VRBE U UKLANJANJU
TEŠKIH METALA IZ ŽIVOTNE SREDINE**

**PHYTOREMEDIATION POTENTIAL OF WILLOW IN REMOVING
HEAVY METALS FROM THE ENVIRONMENT**

Dragana Adamović^{1,2}, Tamara Urošević¹, Bojan Radović¹, Marija Milivojević¹,
Ivona Bezeg-Romić¹, Stefan Đorđević¹, Zorica Sovrlić¹

¹Institut za rudarstvo i metalurgiju, Zeleni Bulevar 35, 19210 Bor

²Akita Univerzitet, 1-1 Tegatagakuen-machi, 010-8502 Akita, Japan

E-mail: dragana.a993@gmail.com

Izvod

Teški metali se nalaze u raznim materijalima i često mogu biti zagađivači životne sredine, ovo predstavlja sve veći problem širom sveta koji može uticati na zdravlje ljudi. Fitoremedijacija je alternativna metoda za remedijaciju zagađenih zemljišta, sedimenata i podzemnih voda zagađenih teškim metalima uz pomoć biljaka. Vrba je biljka koja može da raste u sredinama koje su zagađene teškim metalima i može apsorbovati određene teške metale kroz koren i na taj način ih eliminisati iz životne sredine. U ovom istraživanju je rađen eksperiment sa deset genotipova vrbe (7 rumunskih i 3 švedska genotipa) koji su uzgajani u suplementovanim solucijama sa četiri teška metala (Cu, Ni, Cd i Pb) i određene enzimске aktivnosti iz korenja istih radi procenjivanja efikasnosti ove biljke u procesu remedijacije životne sredine. Iz klonova vrbe kolorimetrijski su testirane aktivnosti peroksidaze (POX) i katalaze (CAT) na talasnim dužinama $\lambda=470$ nm i $\lambda=570$ nm, redom. Dobijeni rezultati pokazuju da enzimске aktivnosti variraju u zavisnosti od genotipa vrbe i koncentracije metala suplementovane solucije u kojoj je biljka bila uzgajana, svakako eksperiment je pokazao da je vrba efikasna u procesu fitoremedijacije.

Ključne reči: fitoremedijacija, vrba, teški metali, peroksidaza, katalaza

Abstract

Heavy metals are found in various materials and can often be environmental pollutants, this is a growing problem all around the world that can affect human health. Phytoremediation is an alternative approach for remediation of soils, sediments and groundwater polluted by heavy metals with the help of plants. Willow is a plant that grow in areas contaminated by heavy metals, it absorbs certain heavy metals through the roots and thus eliminates them from the environment. In order to evaluate the efficiency of willow in process of phytoremediation an experiment was performed. In the laboratory, ten genotypes of willow (7 Romanian and 3 Swedish genotypes) were grown in media supplemented with four heavy metals (Cu, Ni, Cd and Pb) and certain enzymatic activities from their roots were analyzed. Peroxidase (POX) and catalase (CAT) activities were assayed through the colorimetric method at wavelength $\lambda=470$ nm and $\lambda=570$ nm, respectively. The obtained results show that enzymatic activities vary depending on the analyzed willow genotype and the metal concentration of the supplemented solution in which the plant was grown. The experiment showed that willow is efficient in the process of phytoremediation.

Keywords: phytoremediation, willow, heavy metals, peroxidase, catalase

1. UVOD

Teški metali su grupa elemenata sa metalnim osobinama (provodljivost, duktilnost, stabilnost katjona, itd.), koji imaju atomski broj veći od 20 i gustinu veću od 5 g/cm^3 . Ovi metali mogu dospeti u životnu sredinu kako iz prirodnih tako i iz antropogenih izvora [1, 2, 3]. Neki teški metali su esencijalni za rast i razvoj biljaka, međutim u prekomernim količinama mogu biti toksični [2]. Prekomerna količina teških metala u životnoj sredini, koja potiče iz antropogenih izvora, najčešće rudarstvo i industrija, je sve češće prisutna širom sveta [4, 5]. Ovi zagađivači iz životne sredine mogu uticati na žive organizme i ući u lanac ishrane bioakumulacijom i biomagnifikacijom [6].

Iz tog razloga je remedijacija životne sredine veoma važna, međutim konvencionalne metode remedijacije su skupe i mogu takođe biti destruktivne po životnu sredinu [7]. Nasuprot konvencionalnim metodama, fitoremedijacija predstavlja relativno jeftinu tehniku za remedijaciju životne sredine i zadnjih godina se sve više upotrebljava širom sveta [8, 9]. Različite biljke su testirane, i u laboratoriji i u polju, kao potencijalni organizmi za remedijaciju životne sredine i mnogo vrsta se pokazalo dobro u tome [10-13]. Jedna od biljaka efikasna u fitoremedijaciji jeste i vrba [14-18].

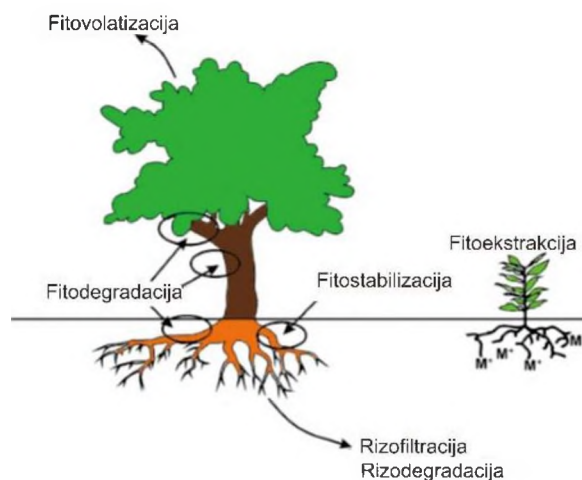
Cilj ovog rada je ispitivanje ponašanja deset genotipova vrbe koji su uzgajani u suplementovanim solucijama sa 4 teška metala (Cu, Ni, Cd i Pb), ispitivanje njihovog metaboličkog odgovora, koji se vezuje za enzimske aktivnosti peroksidaze (POX) i katalaze (CAT), i njihova efikasnost u procesu fitoremedijacije. Peroksidaza je enzim koji se uglavnom nalazi u ćelijskom zidu. Poznato je da je ovaj enzim uključen u kontrolu razvoja biljaka, lignifikaciju i odbranu od patogena [19]. Katalaza je enzim koji se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima. Ovaj enzim katališe redukciju vodonik-peroksida oslobođenog tokom fotosinteze i pretvara ga u vodu i kiseonik [10]. Peroksidaza i katalaza spadaju u najizučivnije enzime koji se nalaze u biljkama.

2. FITOREMEDIJACIJA

Termin fitoremedijacija potiče od grčke reči *phyto*, koja znači „biljka“, i latinskog sufiksa *remedium*, značenja „u stanju da izleči“ ili „lek“ [20]. Fitoremedijacija podrazumeva korišćenje živih biljaka u tretmanu remedijacije zagađenih zemljišta, sedimenata i podzemnih voda. Ovaj proces remedijacije predstavlja relativno mladu i novu isplativu tehnologiju, koja se pokazala efikasno u otklanjanju, kako neorganskih, tako i organskih zagađivača iz životne sredine [2, 21].

Na mestima zagađenim neorganskim zagađivačima, biljke mogu stabilizovati ili eliminisati ove zagađivače sledećim mehanizmima: 1) fitostabilizacije, 2) fitoekstrakcije, i 3) rizofiltracije. Na mestima zagađenim organskim jedinjenjima,

biljke mogu razgraditi ili eliminisati ove zagađivače sledećim mehanizmima: 1) fitodegradacije, 2) rizodegradacije, i 3) fitovolatizacije [2, 17, 22-24]. Prefiks „fito“ u nazivu mehanizma sugerise da je cela biljka uključena u proces fitoremedijacije (zagađivač biva transportovan od korena do drugih delova biljke), dok prefiks „rizo“ sugerise da se remedijacija odvija samo u rizosferi, tj. samo u korenu biljke (zagađivači se ne transportuje do drugih delova biljke) (sl. 1.) [25].



Sl. 1. Mehanizmi fitoremedijacije [25]

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje je urađeno kako bi se utvrdio metabolički odgovor vrbe na teške metale i na taj način videla efikasnost ove biljke u procesu fitoremedijacije. Biološki materijal se sastojao od 10 genotipova vrbe, 7 rumunskih (892, 1077, 1082, Cozia, Fragisal, Pesred i Robisal) i 3 švedska genotipa (Inger, Olof i Tordis). Korišćene su sadnice (klonovi) od jedne godine (oko 10 cm dužine i oko 1 cm u prečniku) sa prosečno 2-5 izdanka, koje su uzgajane u *in vitro* laboratoriji sa kontrolisanim atmosferskim uslovima (slika 2). Svaki klon je bio uzgajan u devet različitih suplementovanih solucija, po dve koncentracije Cu (250 mg/L i 500 mg/L), Ni (200 mg/L i 500 mg/L), Cd (5 mg/L i 10 mg/L), Pb (250 mg/L i 1000 mg/L) i jedna blank solucija.



Sl. 2. Fotografije klonova vrbe i laboratorije u kojoj su uzgajani isti

Za utvrđivanje metaličkog odgovora klonova vrbe određene su enzimske aktivnosti peroksidaze (POX) i katalaze (CAT). Enzimske aktivnosti svih genotipova vrbe su određene iz korenja klonova. Sveže tkivo korena je bilo homogenizovano sa 0.1M fosfatnog pufera (pH=7.5) koji sadrži 0.1 mM EDTA. Homogenati su zatim bili centrifugirani 20 minuta na 6000 obrtaja po minutu (r.p.m.), nakon čega su supernatanti bili korišćeni za enzimski test. Enzimske aktivnosti peroksidaze određene su kolorimetrijski na talasnoj dužini $\lambda=470$ nm i izražene kao varijacija apsorpcije po minutu usled oksidacije gvajakola ($C_7H_8O_2$) u prisustvu vodonik-peroksida (H_2O_2) ekstraktom iz jednog grama sveže supstance ($\Delta A/\text{min/g}$) [26, 27].

Enzimske aktivnosti katalaze su takođe određene kolorimetrijski. Metoda se zasniva na činjenici da se kalijum dihromat ($K_2Cr_2O_7$) u kiseljoj sredini redukuje vodonik-peroksidom (H_2O_2) do hrom acetata ($C_4H_6CrO_4$) koje se može odrediti kolorimetrijski na talasnoj dužini $\lambda=570$ nm. Na ovaj način se određuje količina vodonik-peroksida koja je ostala nerazgrađena posle dejstva enzimskog ekstrakta po minutu i po gramu ($\text{mM } H_2O_2/\text{min/g}$) [28].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Kada su biljke izložene stresu koncentracije reaktivnih jedinjenja kiseonika (ROS), koje obično nastaju normalnim ćelijskim aktivnostima i imaju korisnu ulogu kao signalni molekul i regulator rasta, rastu. Rast reaktivnih jedinjenja kiseonika kod živih organizama stvara oksidativni stres. Biljke su razvile odbrambene mehanizme protiv stvaranja ovih reaktivnih jedinjenja kiseonika, ali i za eliminaciju ovih radikala, tako da u normalnim uslovima njihovo formiranje i uklanjanje bude u ravnoteži. Kada se formiranje reaktivnih jedinjenja kiseonika povećava pod stresom, biljke efikasno reaguje kroz enzimski sistem koji neutrališe ove slobodne radikale i štiti ćelije od oksidativnog stresa. Iz tog razloga je aktiviranje enzimskih sistema odgovornih za eliminaciju ovih reaktivnih, toksičnih vrsta od najvećeg značaja za upravljanje odbrambenog mehanizma biljaka.

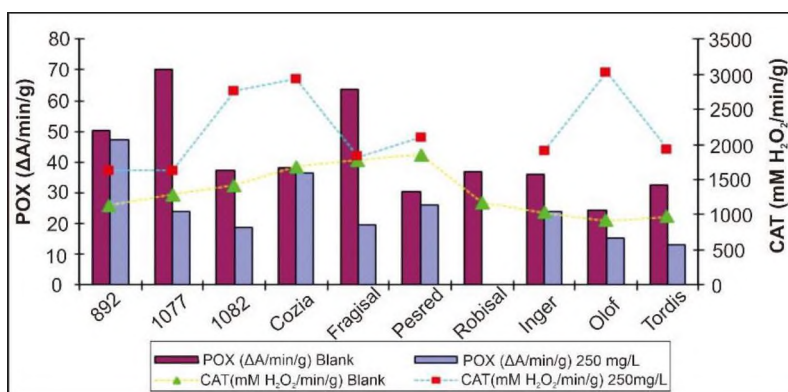
Dobijeni rezultati enzimskih aktivnosti peroksidaze (POX) i katalaze (CAT), ispitivanih iz korenja genotipova vrbe su prikazani u tabeli 1. Rezultati pokazuju da aktivnost enzima varira u zavisnosti od ispitanog genotipa vrbe i od aplikovane doze metala u soluciji u kojoj je biljka uzgajana.

Tabela 1. *Aktivnosti enzima peroksidaze (POX) i katalaze (CAT) određenih u korenju rumunskih (892, 1077, 1082, Cozia, Fragisal, Pesred i Robisal) i švedskih (Inger, Olof i Tordis) genotipova vrbe podvrgnutim tretmanu sa teškim metalima (Cu, Cd i Pb)*

Metali	Konc. (mg/L)	Enzimi	Genotipovi vrbe									
			892	1077	1082	Cozia	Fragisal	Pesred	Robisal	Inger	Olof	Tordis
Cu	Blank		51	70	38	39	63	30	37	35	24	32
	250	POX	47	23	19	46	20	25	n.p.	23	15	12
	500		n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
	Blank		1250	1360	1430	1650	1720	1780	1080	990	820	920
	250	CAT	1600	1600	2700	2920	1800	2150	n.p.	1850	3030	1860
	500		n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
Cd	Blank		51	70	38	39	63	30	37	35	24	32
	5	POX	43	30	16	27	16	7	11	15	32	16
	10		31	35	29	n.p.	18	10	30	34	31	12
	Blank		1250	1360	1430	1650	1720	1780	1080	990	820	920
	5	CAT	1400	2950	1500	6350	3350	2170	6400	2100	3230	2000
	10		650	1400	1650	n.p.	2100	1550	3000	1780	3750	2100
Pb	Blank		51	70	38	39	63	30	37	35	24	32
	250	POX	32	47	23	6	34	34	22	49	49	35
	1000		49	57	28	11	31	10	13	41	n.p.	11
	Blank		1250	1360	1430	1650	1720	1780	1080	990	820	920
	250	CAT	1745	1310	870	1080	1740	1745	2500	3155	2900	2350
	1000		3820	2950	2670	2450	3150	2670	5240	2720	n.p.	2670

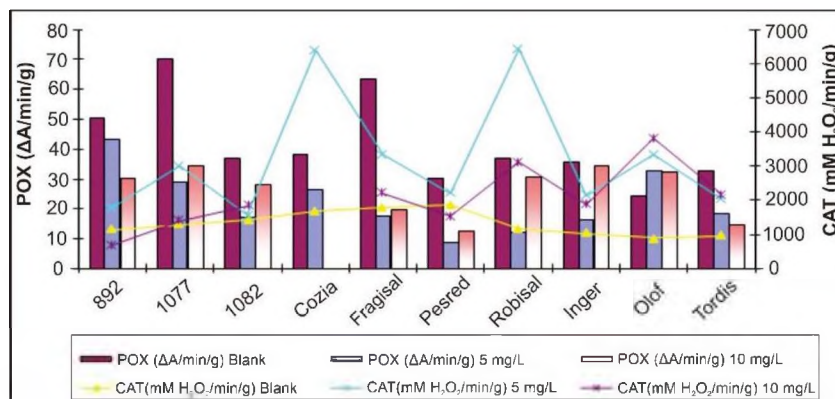
POX-peroksidaza ($\Delta A/\text{min/g}$), CAT-katalaza ($\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$), n.p.-biljka nije preživela

Biljke uzgajane u soluciji bakra koncentracije 500 mg/L nisu preživele. Klonovi rumunskog genotipa Robisal nisu preživeli ni kod jedne aplikovane doze bakra (250 mg/L i 500 mg/L). Aktivnost peroksidaze iz korenja biljaka uzgajanih u soluciji bakra koncentracije 250 mg/L pada u odnosu na aktivnost peroksidaze određene u korenju biljaka odgajanih u blank soluciji, nasuprot tome aktivnost katalaze na prvoj aplikovanoj dozi metala naglo raste što je prikazano na slici 3.



Sl. 3. Varijacija aktivnosti peroksidaze i katalaze na tretman genotipova vrbe bakrom

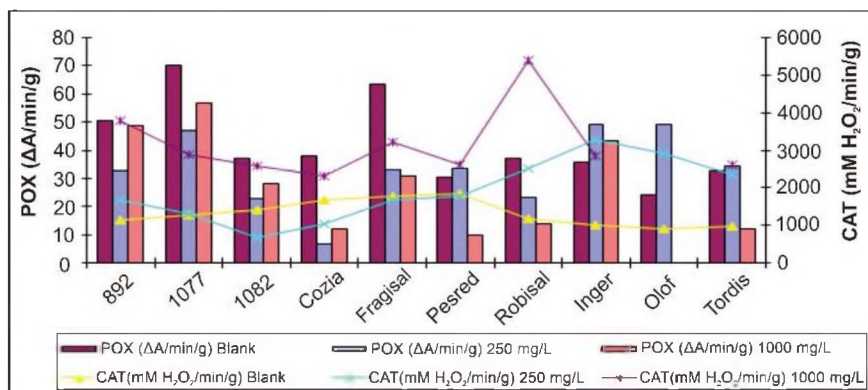
Kod biljaka uzgajanih u solucijama sa kadmijumom je primećeno da aktivnost peroksidaze pada kod svih ispitivanih genotipova vrbe pri aplikaciji obe doze metala ($\text{Cd} = 5 \text{ mg/L}$ i $\text{Cd} = 10 \text{ mg/L}$), osim kod švedskog genotipa Olof gde je primećen rast aktivnosti ovog enzima kod obe aplikovane doze metala, slika 4. Aktivnost katalaze raste naglo kod svih izučavanih genotipova vrbe pri aplikaciji prve doze kadmijuma, dok kod druge aplikovane doze aktivnost varira u zavisnosti od genotipova. Klon vrbe rumunskog genotipa Cozia nije preživio u soluciji koja sadrži 10 mg/L Cd.



Sl. 4. Varijacija aktivnosti peroksidaze i katalaze na tretman genotipova vrbe kadmijumom

U slučaju biljaka koje su podvrgnute tretmanu olovom, primećuje se varijacija enzimske aktivnosti u zavisnosti od genotipova. Kod rumunskih genotip-

ova (osim kod genotipa Pesred) aktivnost peroksidaze opada, dok se kod švedskih genotipova aktivnost povećava kod prve aplikovane doze. Kod druge aplikovane doze olova (1000 mg/L) aktivnost peroksidaze se smanjuje u odnosu na aktivnost peroksidaze u korenu klonova uzgajanih u blank soluciji. Aktivnost katalaze ima nasumične varijacije u zavisnosti od genotipova i aplikovane doze olova što je prikazano na slici 5. Klon vrbe švedskog genotipa Olof nije preživio kod druge aplikovane doze olova.



Sl. 5. Varijacija aktivnosti peroksidaze i katalaze na tretman genotipova vrbe olovom

Biljke koje su bile uzgajane u suplementovanim solucijama nikla nisu preživjele, slika 6.



Sl. 6. Fotografija biljaka koje su uzgajane u suplementovanim solucijama nikla

5. ZAKLJUČAK

Potrebna su istraživanja kako bi se otkrili načini dekontaminacije i remedijacije životne sredine. Upotreba biljaka u remedijaciji životne sredine se pokazala kao jako povoljna i efikasna metoda. Fitoremedijacija nudi jeftinu i sigurnu alternativu konvencijalnim metodama. Upotrebom sposobnosti određenih

biljaka da uklone zagađivače iz životne sredine smanjuje se rizik od zagađenja. Na osnovu rezultata enzimskih aktivnosti peroksidaze i katalaze utvrđenih iz korenja deset genotipova vrbe, može se zaključiti da je vrba efikasna u uklanjanju bakra, kadmijuma i olova iz životne sredine, dok se u eksperimentu sa niklom pokazala neefikasno.

ZAHVALNOST

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ugovor o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada evidencioni broj: 451-03-68/2020-14/200052.

LITERATURA

- [1] M. Yadav, R. Gupta, R.K. Sharma, Green and sustainable pathways for wastewater purification, *Advances in water purification techniques, Meeting the Needs of Development and Developing Countries*, (2019) 355-383.
- [2] T. Vamerali, M. Bandiera, G. Mosca, Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, *Environmental Chemistry Letter*, 8 (2010) 1-17.
- [3] W.L.F. Brinkmann, W. Plass, The spacial distribution of heavy metals in the soil of the Steinbach basin-Rhine-Main area. *Processing of international symposium on recent investigation in the zone of aeration*, Munch, 1 (1984) 57-68.
- [4] V. Masindi, K.L. Muedi, Environmental contamination by heavy metals, Hosman El-Din M. Saleh & Refaat F. Aglan, *Intech Open* (2018).
- [5] H. Ali, E. Khan, I. Ilahi, Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation, *Journal of chemistry*, (2019) 1-14.
- [6] S. Manohar, C.D. Jadia, M.H. Fulekar, Impact of ganesch idol immersion on water quality, *Indian Journal of Environmental Protection*, 27(3) (2006) 216-220.
- [7] S.A. Aboulroos, M.I.D. Helal, M.M. Kamel, Remediation of Pb and Cd polluted soils using in situ immobilization and phytoextraction techniques, *Soil and Sediments Contamination*, 15 (2006) 199-215.
- [8] P.L. Gratao, M.N.V. Prasad, P.F. Cardoso, P.J. Lea, R.A. Azevedo, Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1) (2005) 53-64.

- [9] N. Rajakaruna, K.M. Tompkins, P.G. Pavićević, Phytoremediation: an affordable green technology for the clean-up of metal-contaminated sites in Sri Lanka, *Ceylon Journal of Science (Biological Science)*, 35(1) (2006) 25-35.
- [10] R. Soare, M. Dinu, C. Babeanu, M. Popescu, Antioxidant enzyme activities of some Brassica species, *Bulletin UASVM Horticulture*, 74(2) (2017) 191-196.
- [11] S. Goswami, S. Das, Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. And the role of antioxidant enzymes in metal tolerance, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126 (2016) 211-218.
- [12] B. Wang, L. Lui, Y. Gao, J. Chen, Improved phytoremediation of oilseed rape (*Brassica napus*) by *Trichoderma* mutant constructed by restriction enzyme-mediated integration (REMI) in cadmium polluted soil, *Chemosphere*, 74 (2009) 1400-1403.
- [13] S.S. Andra, R. Datta, R. Reddy, S.K.M. Saminathan, D. Sarkar, Antioxidant enzymes response in Vetivier Grass: A reenhouse study for chelant-assisted phytoremediation of lead-contaminated residential soils, *Clean-Soil, Air, Water*, 39(5) (2011) 428-436.
- [14] P. Vervaeke, S. Luyssaert, J. Mertens, E. Meers, F.M.G. Tack, N. Lust, Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial, *Environmental Pollution*, 126 (2003) 275-282.
- [15] Y. Cao, C. Ma, H. Chen, G. Chen, J.C. White, B. Xing, Copper stress in flooded soil: Impact on enzyme activities, microbial community composition and diversity in the rhizosphere of *Salix integra*, *Science of the Total Environment*, 704 (2020)135350
- [16] E.M. El-Mahrouk, M.A. Hegazi, M.E. Abdel-Gayed, Y.H. Dewir, M.E. El-Mahrouk, Y. Naidoo, Phytoremediation of Cadmium-, Copper-, and Lead contaminated soil by *Salix mucronata* (Synonym *Salix safsaf*), *Horticultural Science*, 54(7) (2019) 1249-1257.
- [17] B.A. Wani, A. Khan, R.H. Bodha, *Salix*: A viable option for phytoremediation, *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5 (2011) 567-571.
- [18] M.B. Ali, P. Vajpayee, R.D. Tripathi, U.N. Rai, S.N. Singh, S.P. Singh, Phytoremediation of lead, nickel, and copper by *Salix acmophylla* Boiss.: Role of antioxidant enzymes and antioxidant substaces, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70 (2003) 462-469.
- [19] R.B. Van Huystee, Some molecular aspects of plants peroxidase biosynthetic studies, *Annual Review of Plant Physiology*, 38 (1987) 205-219.

- [20] I. Raskin, P.B.A.N. Kumar, S. Dushenkov, D. Salt, Bioconcentration of heavy metals by plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 5 (1994) 285-290.
- [21] V. Krstić, D. Simonović, S. Đorđievski, B. Pešovski, T. Urošević, B. Trumić, Z. Sovrlić, Prečišćavanje otpadnih voda savremenim metodama biosorpcije i fitoremedijacijom, *Bakar*, 44 (2019) 1.
- [22] C.D. Jadia, M.H. Fulekar, Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques, *African Journal of Biotechnology*, 8(6) (2009) 921-928.
- [23] M.S. Liphadzi, M.B. Kirkham, Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals: a technology for rehabilitation of the environment, *South African Journal of Botany*, 71(1) (2005) 24-37.
- [24] H. Ali, E. Khan, M.A. Sajad, Phytoremediation of heavy metals- Concepts and applications, *Chemosphere*, 91 (2013) 869-881.
- [25] J. Park, J. Kim, K. Kim, Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals using *Brassica napus*, *Geosystem Engineering*, 15(1) (2012) 10-18.
- [26] I.C. Babeanu, G. Marinescu, E. Glodeanu, G. Ciobanu, *Biochimie vegetala practica*, Ed INFO, Craiova (2003).
- [27] C. Babeanu, R. Soare, M. Dinu, Antioxidant enzyme activities in some cultivars of *Brassica oleracea* var. *capitata* F. *alba*. *SGEM Conference Proceedings*, 17(61) (2017) 471-478.
- [28] A.K. Sinha, Colorimetric assay of catalase, *Analytical Biochemistry*, 47 (1972) 389-396.