

Ispitivanje sposobnosti fitoekstrakcije olova i gvožđa kod kukuruza (*Zea mays* L.)

Razmatrana je mogućnost primene metode kombinovane, helatirajućim agensima inducirane, fitoekstrakcije na dekontaminaciju zemljišta koje je zagađeno olovom i gvožđem. Pri tom su kao helatirajući agensi korišćeni EDTA za olovo i EDDHA za gvožđe. Kao kultura za fitoekstrakciju je korišćen kukuruz. Rezultati ukazuju na veliku efikasnost ove metode u remedijaciji zemljišta zagađenog ovim metalima. Pri najoptimalnijim uslovima usvojeno je oko 650 puta više olova od prosečnih vrednosti koje biljka može da usvoji. Gvožđe je usvojeno u većim kolicinama u odnosu na olovo, ali ta vrednost je samo oko 5 puta veća od one koju biljka može prirodno da usvoji.

Uvod

Napredak nauke i tehnologije zajedno sa čovekovim bezobzirnim iskorišćavanjem prirodnih resursa, prouzrokovao je katastrofalan pad kvaliteta životne sredine i neprekidan porast zagađenja svih delova planete, prouzrokujući tako niz globalnih problema koji traže hitno rešenje. Nепrekidne emisije zagađivača u atmosferu, vodu i zemljište prete da ozbiljno poremete ravnotežu u prirodi dovodeći tako u pitanje i opstanak same ljudske vrste. Iz tih razloga, u poslednje vreme se često postavlja pitanje sanacije i redukcije negativnih antropogenih uticaja na različite ekosisteme, traže se ekonomična i efikasna rešenja kojima bi se takav uticaj smanjio na minimum, odnosno eliminisao.

Jedan od najvećih problema ekologije danas svakako predstavljaju teški metali. Teški metali oobuhvataju grupu od 38 elementa, od kojih su neki važni za više biljke, ali u većim koncentracijama oni se ponašaju toksično i izazivaju brojne posledice. Njihova dostupnost u zemljištu zavisi od brojnih prirodnih faktora i procesa, ali velikim delom i od antropogenog uticaja (Kastori *et al.* 1998). čovek svojim uticajem i delatnostima najvećim delom doprinosi povećanju njihove koncentracije u životnoj sredini.

*Vanja Vukojević
(1982) Obrenovac, R.
Rankovića 12/3,
učenik 2. razreda
Gimnazije u
Obrenovcu*

Tako teška industrija, izduvni gasovi, deponije, otpadne vode, rudarstvo, energetika i sl. doprinose povećanju koncentracije teških metala u zemljištu (Kastori *et al.* 1992). Pored toga povećanje kiselosti zemljišta usled kiselih kiša daleko više povećava dostupnost metala biljkama (Kastori *et al.* 1992; Kojić *et al.* 1994). Različiti teški metali u zemljištu imaju, već u malim koncentracijama, izrazito negativno delovanje na biljku, a posredno, zagađivanjem vode, vazduha i biljnog pokrivača i na ostali živi svet., pa je stoga razvijanja sistema rešavanja ovog problema veoma bitno.

Fitoremedijacija predstavlja jedan od takvih sistema. Naime, u cilju uklanjanja polutanata iz ekosistema koriste se sposobnosti biljaka da usvajaju i akumuliraju različite supstance u svojim tkivima. Poslednjih nekoliko godina započet je intenzivan rad na unapređivanju fitoremedijacionih tehnika i njihovom povezivanju sa najnovijim saznanjima o fiziološkim i molekularnim mehanizmima biljaka. Tokom vremena paralelno sa njenim razvojem došlo i do grananja fitoremedijacije na više naučnih disciplina (Salt *et al.* 1998).

Jedna od tih metoda je i fitoekstrakcija – korišćenje biljaka sposobnih za akumulaciju određenih polutanata iz zemljišta u delovima koji se mogu efikasno odstraniti sa staništa. Ova metoda se razvija u dva osnovna pravca – helatima asistirana fitoekstrakcija i kontinuirana fitoekstrakcija (Salt *et al.* 1998). Druga metoda je daleko jednostavnija i ekonomičnija, ali budući da su prirodni hiperakumulatori najčešće biljke sa veoma dugim životnim ciklusom, teško se otkrivaju i imaju uske životne areale, njena primena nije toliko raširena. Stoga je pri hitnim, kratkovremenim intervencijama daleko korisnija metoda helatima asistirane fitoekstrakcije zbog mogućnosti brzog otklanjanja zagađivača iz zemljišta.

Neakumulatori nisu prirodno sposobni da akumuliraju zagađivače iz životne sredine u velikim koncentracijama, pa se zato kod ovakvih vrsta primenjuje metod helatima asistirane fitoekstrakcije (CAP). Suština ovog metoda jeste u primeni odgovarajućih helatirajućih agenasa, jedinjenja koja stvaraju stabilne komplekse sa jonima metala koje biljka može da usvaja ili kao kompleks ili u jonskom obliku, zahvaljujući mehanizmima na ćelijskoj membrani. Ovaj metod se u glavnom primenjuje na teške metale u zemljištu koji lako stvaraju komplekse.

Iako sama ideja o fitoekstrakciji potiče još iz 19. veka, eksperimentalni rad je počeo relativno skoro. Do 1998. godine izašle su samo 4 publikacije (Salt *et al.* 1998) i one su izazvale veliki broj naučnih polemika o procesima usvajanja, transporta i akumulacije polutanata u biljci. Pri tom je isticano je da biljke moraju imati efikasne mehanizme za detoksifikaciju akumuliranog olova. Stoga je razvoj manipulacije rezistencijom biljaka na toksičnost teških metala ključan za razvoj efikasnih mehanizama fitoremedijacije. Upravo to nam metoda CAP obezbeđuje, jer njenom primenom,

biljka usvaja već gotov helat koji se u najvećem broju slučajeva može transportovati, a kojim se toksičnost metala redukuje na minimum.

Nekoliko istraživanja sprovedenih na terenu pokazalo je da se neki visoko produktivni usevi, prvenstveno, kukuruz, indijska slačica i suncokret, mogu indukovati da usvajaju i akumuliraju visoke koncentracije olova u iskoristivim delovima biljke (Salt *et al.* 1998). U tim istraživanjima CAP je izvedena primenom EDTA (etilendiamintetrasirćetna kiselina) na zemljište kontaminirano teškim metalima. Dobijeni rezultati su pokazali da EDTA ne stvara stabilan kompleks samo sa olovom već i drugim metalima: kadmijumom, bakrom, niklom i cinkom (Salt *et al.* 1998). Usledio je zaključak, koji je kasnije višestruko potvrđen, da je za izvođenje CAP teških metala moguće koristiti EDTA kao neku vrstu delimično univerzalnog jedinjenja za helatima asistiranu fitoekstrakciju teških metala. Međutim, nije dokazano da se EDTA vezuje za sve teške metale, niti da se za bilo koji drugi teški metal vezuje istim intezitetom kao za olovo.

Priča o kukuruzu za Evropljane počinje još 1492. godine, nakon Kolumbovih otkrića, kada su i stigle prve vesti o čudnoj biljci koju su domoroci u Americi koristili kao jedan od najvećih "darova prirode". Iako je kukuruz još od vremena prvih kolonija postao poznat doseljenicima Novog Sveta, u Evropu je došao tek kasnije. Tokom vremena ova kultura se sve više unapređivala, stvarano je više sorti, hibrida. Istraživanja sprovedena u poslednjih nekoliko godina rezultovala su novim mogućnostima korišćenja kukuruza od kojih je jedna i njegovo angažovanje na planu fitoremedijacije. Njegove pogodnosti su: uspeva u raznim klimatskim zonama (široko rasprostranjen), visoko je produktivan i prilagodljiv, u nekoj meri otporan na zagađenje olovom (Kastori 1995), bolje podnosi suvišak gvožđa.

Iz tih razloga kukuruz je odabran za ovo istraživanje ne samo kao uobičajeni model-sistem (Salt *et al.* 1998) za ispitivanje fitoekstrakcije olova, već i kao eventualnu mogućnost za korišćenje istog u fitoremedijaciji zemljišta.

Olovo je jedan od najvećih zagađivača u prirodi. Prisutno je u zemljištu, vodi i vazduhu, a veoma je mobilno iz jedne sredine u drugu (Stanners & Bourdeau 1991). Nalazi se u najrazličitijim oblicima a postaje toksično već pri veoma malim koncentracijama. Glavni izvor olova predstavljaju, pre svega, izduvni gasovi iz fabrika, elektrana, automobila i sl., koji ponekad sadrže čak 55% olova (Stanners & Bourdeau 1991).

Gvožđe je jedan od najvažnijih mikroelemenata mineralne ishrane i biljke ga usvajaju mnogo više nego ostale mikroelemente. Ono učestvuje, zahvaljujući svojoj polivalentnosti, sposobnosti oksidoredukcije i stvaranja helata, u brojnim fiziološkim procesima biljke. Gvožđe ima veliki uticaj na fotosintezu, na disanje biljaka, u fiksaciji molekuskog azota, sintezi proteina, metabolizmu organskih kiselina (Kastori 1995). Njegov nedosta-

tak u biljci izaziva velike promene i oboljenje biljke poznato pod nazivom gvožđe hloroza (op. cit.). Suvišak gvožđa se u prirodi retko dešava, ali zahvaljujući antropogenom uticaju gvožđe se u nekim industrijskim oblastima javlja u visokim koncentracijama koje mogu biti vrlo često i toksične, a samim tim i imaju nepovoljno dejstvo na biljke.

Cilj ovog istraživanja je da se utvrde mogućnosti korišćenja metode CAP, uz korišćenje kukuruza kao model-sistema, u sanaciji životne sredine koja je zagađena teškim metalima. Pored toga, želeli smo da razmotrimo primenu ove metode u slučaju istovremene zagađenosti zemljišta sa više teških metala. Zbog velikog broja problema koji nastaju usled zagađenja olovom i gvožđem, izabrali smo upravo ove elemente. Kako su nama poznata istraživanja ove vrste vrešena na terenu (u poljskim uslovima), mi smo se opredelili na laboratorijska ispitivanja. Na ovaj način nameravali smo da eliminišemo neželjene uticaji i kontakte sa životnom sredinom.

Pošto je kontaminacija teškim metalima često praćena istiskivanjem gvožđa iz helata, od strane drugih teških metala, tim više ukoliko je helat koji grade stabilniji (Kastori 1995), bilo je zanimljivo videti kako bi se vršilo usvajanje uz prisustvo dva metala u različitom helatnom obliku. Stoga su biljke pored delovanja sa kompleksom EDTA i olova, u ovom istraživanju bile podvrgnute i tretmanu sa neorganskim olovom kako bi mogli da uporedimo podatke o usvajanju i akumulaciji olova, uticaju usvajanja olova na biljku, ali i sa kompleksom gvožđa i etilendiamin-di-hidroksosofenilsirćetne kiseline (Fe-EDDHA) kako bi se proverila mogućnost usvajanja olova kao kompleksa sa EDDHA.

Materijal i metode

Za ispitivanje je korišćen hibrid kukuruza ZPSC-599 Instituta za kukuruz u Zemun Polju. Depesticidizacija semena kukuruza je vršena radi otklanjanja ostataka pesticida TMTD-TS, kojim su semena tretirana radi zaštite od štetočina. Semena su ispirana 2 sata pod mlazom tekuće česmene vode, u erlenmajeru, uz neprekidno mešanje, a zatim u destilovanoj vodi oko 10 minuta. Semena su zatim isključavana u mraku 72 sata na temperaturi od 25°C, u komori sa vodenim zagrevanjem.

Pretretman

Isključala semena su postavljana na pretretman sa hranljivim rastvorom (Remeldov mineralni rastvor), u dužini od 72 sata. Sastav Remeldovog mineralnog rastvora (10 puta koncentrovanog) je (Denfer an Ziegler 1988):

K_2SO_4	$0.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
KCl	$0.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Ca(NO ₃) ₂	2.0 · 10 ⁻³ M
MgSO ₄	0.5 · 10 ⁻³ M
KH ₂ PO ₄	0.1 · 10 ⁻³ M
HBO ₃	1.0 · 10 ⁻⁵ M
MnSO ₄	5.0 · 10 ⁻⁷ M
ZnSO ₄	5.0 · 10 ⁻⁷ M
CuSO ₄	2.0 · 10 ⁻⁷ M
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1.0 · 10 ⁻⁸ M

Neposredno pre postavljanja biljaka na rastvor sa biljkama u prvoj postavci eksperimenta dodavano je i za vreme pretretmana i za vreme tretmana, 10⁻⁴ mola po litru rastvora Fe-EDDHA, kompleksona koji se koristi za usvajanje gvožđa da bi se proverilo da li olovo može da nagradi kompleks sa EDDHA i da li biljka može da ga kao takvog usvoji. U drugoj postavci korišćeno neorgansko gvožđe u obliku feri-hlorida (FeCl₃) za dva reda manje koncentracije. Postavljena je i treća postavka eksperimenta sa dodatkom gvožđa, takođe u obliku feri-hlorida, iste koncentracije kao u prvom eksperimentu.

U predtretmanu je korišćen opisani koncentrovani rastvor razblažen destilovanom vodom 20 puta, a u toku tretmana solima olova ovaj rastvor je razblažen 10 puta. Pored toga u toku pretretmana, u prvoj i trećoj postavci, u rastvor je dodavana duplo manja količina gvožđa nego u toku tretmana. Zamena rastvora i u toku pretretmana i u toku tretmana je vršena na svaka 3 dana.

Postavka eksperimenata

Nakon predtretmana hranljivi rastvor je zamenjen novim, istog sastava ali manjeg razblaženja, i biljke su postavljene na tretman dodavanjem jedinjenja olova u sledećim koncentracijama:

Pb(NO ₃) ₂	– 10 ⁻⁴ M
Pb(NO ₃) ₂	– 10 ⁻⁶ M
Pb-EDTA	– 10 ⁻⁴ M
Pb-EDTA	– 10 ⁻⁶ M

Za pravljenje helata kao helatirajući agens korišćen je komplekson II, (Na₂EDTA), a kao izvor olova, olovo nitrat, i to u odnosu 2.5 : 1. Stabilnost kompleksa je povećana zagrevanjem istog na temperaturi od 50°C.

Za primenu organskog gvožđa je korišćen gotovi rastvor Fe-EDDHA. Različitim koncentracijama svake soli olova tretirane su po četiri biljke, a kontrola se sastojala od 4 biljke koje nisu tretirane solima olova.

Postavljene su tri serije eksperimenta:

I – sa Fe-EDDHA, kao dodatkom gvožđa

II – sa dodatkom FeCl₃ za dva reda manje koncentracije

III – sa dodatkom FeCl_3 iste koncentracije kao u I.

Dužina tretmana je iznosila 7-8 dana, a biljke su gajene pod istim uslovima kao u predtretmanu: u sobi za gajenje kultura na temperaturi od 25°C , na fotoperiodu od 15 sati svetlosti i 9 sati mraka, sa konstantnom vlažnošću vazduha i uspostavljenom aeracijom rastvora.

Nakon pojave trećeg lista, biljke su skinute sa tretmana. Razdvajani su im koren, stablo i listovi i merene njihove dužine i mase. Potom su uzorci pripremani za merenje na atomskom apsorberu, pošto su prethodno 2-3 h sušeni u sušnici na temperaturi 150°C . Tokom sušenja merena je suva masa uzoraka, a sušenje nastavljano sve dok se masa uzoraka nakon sušenja menjala. Zatim je vršeno usitnjavanje uzoraka u avanu sa tučkom.

Posle sitnjenja, uzorci su pripremani postupkom mokrog razlaganja organske materije: stavljeni su u čaše od 50 ili 100 mL, prelivani sa 10 ml koncentrovane HNO_3 i poklopljeni levkom ostavljani da odstoje celu noć. Sledećeg dana je vršeno uparavanje uzoraka, prvo na temperaturi od 80°C (sat i po). Kada su uzorci ohlađeni, u njih je dodavano 10 mL HClO_4 i nastavljeno sa uparavanjem dok se nisu dobili bistri uzorci iz kojih se ne izdvajaju bele pare, a čije zapremine ne prelaze 5 mL. Nakon hlađenja uzoraka, zapremina je doterana do 10mL u normalnom sudu, a zatim su uzorci analizirani na atomskom apsorberu. Korišćen je aparat marke Phillips, Pye Unicomp SP9. Olovo je određivano na talasnoj dužini od 217 nm, a raspon normalnog standarda je bio između 2 i 10 mg/L. Gvožđe je određivano na 248.3 nm a raspon standarda je bio 0.3–11.4 mg/L. Za sagorevanje uzoraka korišten je plamen smeše acetilen-vazduh.

Rezultati

I serija

U prvoj seriji eksperimenta, u kojoj su biljke bile na tretmanu sa organskim gvoždem i različitim koncentracijama organskog i neorganskog olova, dobijeni su rezultati dati u tabeli 1.

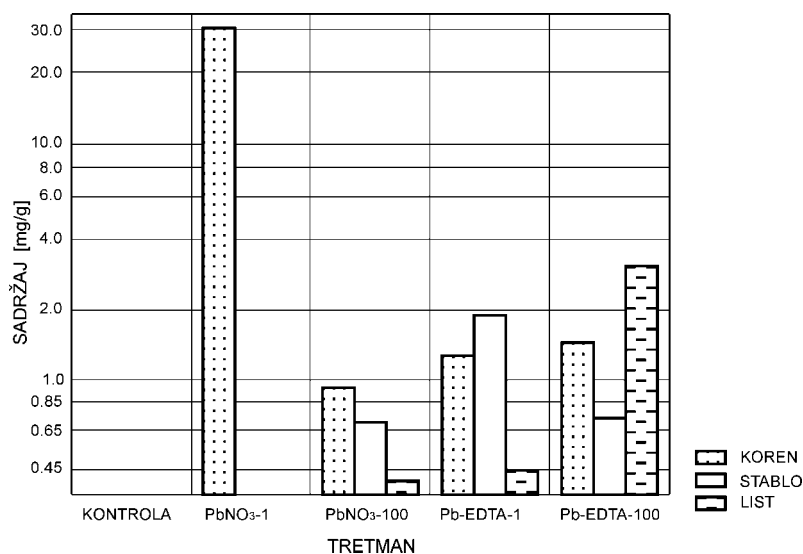
Olovo

U prvoj seriji eksperimenta olovo je najviše usvajano pri malim koncentracijama neorganskog olova, ali u delovima biljke nekorisnim za eksploataciju (koren). Usvojeni metal se u ovom slučaju ne transportuje u više delove biljke, ili se transportuje u veoma malim količinama koje se ne mogu detektovati. Pri velikim koncentracijama neorganskog olova usvaja se znatno manje metala u korenu, ali su zato primećene veće koncentracije u nadzemnim delovima biljke pogodnim za otklanjanje (slika 1).

Tabela 1. Rezultati prve serije eksperimenta, sa prisustvom Fe-EDDHA.

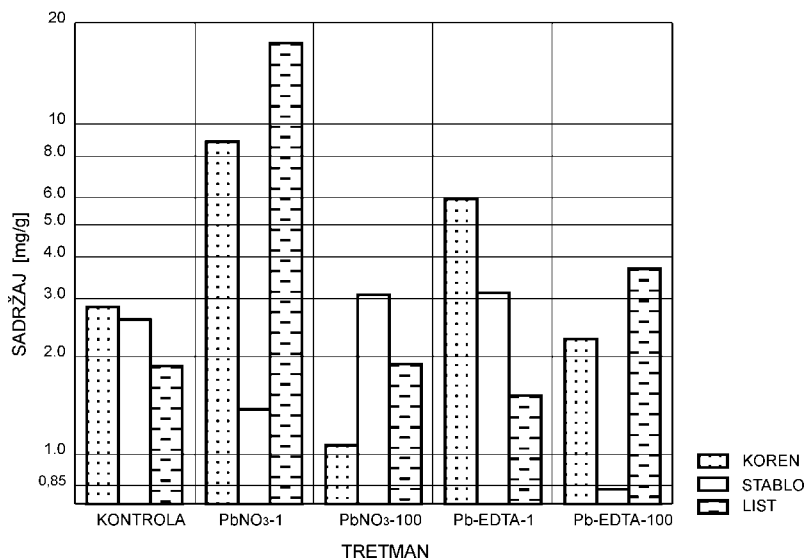
Tretman	Objekat	Dužina	Sveža masa	Suva masa	Konc. Pb u uzorku (mg/L)	Sadržaj Pb mg/g suve mase	Sadržaj Pb mg/g sveže mase	Konc Fe u uzorku mg/L	Sadržaj Fe mg/g suve mase	Sadržaj Fe mg/g sveže mase
kontrola	koren	29	0.4200	0.03	0	0	0	2.723	2.87	0.15
kontrola	stablo	–	0.1175	0.03	0	0	0	2.234	2.64	0.52
kontrola	list	–	0.1700	0.07	0	0	0	2.460	1.92	0.34
PbNO ₃ 1M	koren	6.4	0.3450	0.04	121.8	30.5	3.53	2.460	8.88	1.03
PbNO ₃ 1M	stablo	–	0.0475	0.03	0	0	0	2.384	1.43	0.92
PbNO ₃ 1M	list	–	0.0575	0.01	0	0	0	2.347	17.38	3.02
PbNO ₃ 100M	koren	27.5	0.4025	0.04	3.9	0.975	0.097	2.572	1.12	0.11
PbNO ₃ 100M	stablo	–	0.2425	0.02	1.4	0.7	0.06	2.158	3.13	0.26
PbNO ₃ 100M	list	–	0.1925	0.05	2.0	0.4	0.02	5.094	1.95	0.51
Pb-EDTA 1M	koren	27.8	0.490	0.04	5.3	1.325	1.081	2.535	6.00	0.49
Pb-EDTA 1M	stablo	–	0.1925	0.02	3.9	1.95	0.203	3.927	3.17	0.33
Pb-EDTA 1M	list	–	0.2425	0.06	2.65	0.442	0.11	2.986	0.57	0.14
Pb-EDTA100M	koren	23.75	0.5275	0.05	7.5	1.5	0.142	2.610	2.31	0.22
Pb-EDTA100M	stablo	–	0.225	0.07	5.1	0.729	0.264	3.739	0.83	0.23
Pb-EDTA 100M	list	–	0.500	0.02	6.25	3.125	0.28	2.761	3.73	0.14

Kada je reč o organskom olovu situacija je prilično jasna. Olovo se usvaja i pri malim i pri velikim koncentracijama, s tim da je akumulacija u nadzemnim delovima veća pri većim koncentracijama helata.



Slika 1. Sadržaj olova po jedinici suve mase u prvoj seriji.

Figure 1. Contents of lead on dry weight unit in series one.



Slika 2.
Sadržaj gvožđa po jedinici suve mase u prvoj seriji.

Figure 2.
Contents of iron on dry weight unit in series one.

Gvožđe

Na osnovu rezultata jasno je da se gvožđe usvaja pri svim tretmanima, i da se transportuje u nadzemne delove biljke. Akumulacija u eksploativnim organima biljke je znatno veća pri manjim koncentracijama neorganskog olova (naročito u listovima), dok se usvajanje i akumulacija gvožđa kod velikih koncentracija istog skoro i ne menja u odnosu na kontrolu. Usvajanje je povećano i pri kombinaciji sa malim koncentracijama helatnog olova, s tim da je transport gvožđa do lista smanjen, pa se veći deo gvožđa zadržava u stablu. Zanimljivo je da se pri velikim koncentracijama kompleksa olova gvožđe usvaja signifikantno više u listu u odnosu na prethodni tretman sa malim količinama Pb-EDTA, dok se je u stablu situacija obrnuta (slika 2).

II serija

U drugoj seriji eksperimenata gde su biljke tretirane sa neorganskim gvoždem i različitim koncentracijama organskog i neorganskog olova, dobijeni su rezultati dati u tabeli 2.

Olovo

Usvajanje i akumulacija olova u drugoj seriji eksperimenta su se vršili relativno smanjenim intezitetom koji je bio praćen smanjenjem transporta u nadzemne delove biljke. Važno je napomenuti da je ponovo zabeležen drastičan porast usvajanja olova u korenu biljke pri tretmanu sa malim količinama neorganskog olova. Kompleksirano olovo se takođe usvajalo i akumuliralo delimično smanjenim intezitetom, što se vidi iz slike 3.

Tabela 2. Rezultati druge serije eksperimenta, sa dodatkom gvožđa u neorganskom obliku.

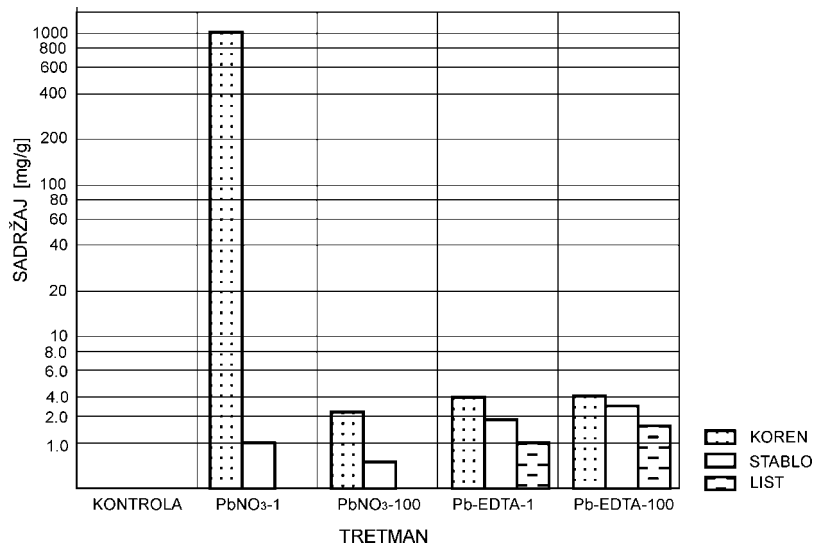
Tretman	Objekat	Dužina	Sveža masa	Suva masa	Konc. Pb u uzorku (mg/L)	Sadržaj Pb mg/g suve mase	Sadržaj Pb mg/g sveže mase	Konc Fe u uzorku mg/L	Sadržaj Fe mg/g suve mase	Sadržaj Fe mg/g sveže mase
kontrola	koren	10.3	0.4	0.04	0	0	0	6.261	0.68	0.07
kontrola	stablo	–	0.77	0.05	0	0	0	6.072	0.45	0.03
kontrola	list	–	0.49	0.05	0	0	0	5.771	0.49	0.05
PbNO ₃ 1M	koren	10.1	0.41	0.04	1018.0	25.4	2.48	35.532	0.62	0.06
PbNO ₃ 1M	stablo	–	0.46	0.04	2.0	0.5	0.0036	4.379	0.59	0.05
PbNO ₃ 1M	list	–	0.40	0.04	0	0	0	17.380	0.59	0.06
PbNO ₃ 100M	koren	10	0.40	0.04	3.2	0.8	0.08	4.492	0.64	0.06
PbNO ₃ 100M	stablo	–	0.62	0.03	1.5	0.5	0.015	6.261	0.72	0.03
PbNO ₃ 100M	list	–	0.41	0.03	0	0	0	9.750	1.70	0.124
Pb-EDTA 1M	koren	10.3	0.43	0.03	4.0	1.33	0.093	24.000	0.85	0.06
Pb-EDTA 1M	stablo	–	0.73	0.04	2.85	0.7125	0.04	6.336	0.98	0.05
Pb-EDTA 1M	list	–	0.59	0.05	2.0	0.67	0.034	3.400	0.75	0.08
Pb-EDTA 100M	koren	9.8	0.58	0.03	4.1	1.37	0.85	11.556	0.87	0.04
Pb-EDTA 100M	stablo	–	0.52	0.04	3.5	0.875	0.067	5.132	0.93	0.07
Pb-EDTA 100M	list	–	0.40	0.04	2.6	0.65	0.065	7.051	0.70	0.07

Gvožđe

Gvožđe se akumulira i usvaja za red veličine manjim intezitetom nego u prethodnoj seriji, što se objašnjava primenom gvožđa u neorganskom obliku (feri-hlorid). U kombinaciji sa neorganskim olovom unos gvožđa se povećava u odnosu na kontrolu, dok je unos pri tretmanu sa organskim olovom bio prilično ujednačen kod tretmana sa malim i velikim koncentracijama Pb-EDTA. Najveće vrednosti su zabeležene u korenu biljaka na tretmanu sa velikim količinama neorganskog olova (slika 4).

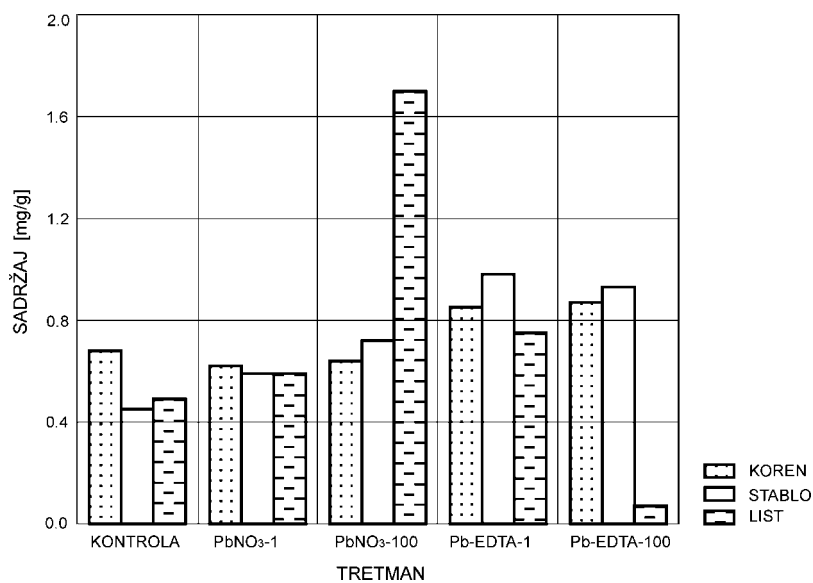
Osim razlike u koncentracijama usvojenog i akumuliranog olova primćena je i razlika u masi biljnih delova. Biljke iz druge serije eksperimenta su imale znatno veće sveže mase, dok su im suve mase bile približno jednake. To ukazuje na na veći sadržaj vode koji je izgubljen tokom sušenja. Takođe, biljke iz prve serije su bile izduženije, dok su biljke tretirane malim koncentracijama olovo-nitrata bile znatno manje razvijene u odnosu na ostale biljke.

Biljke iz treće serije eksperimenata, gajene na neorganskom gvožđu u obliku FeCl₃ koncentracije 10⁻⁴ mol/L rastvora, nisu pokazale nikakav razvoj, pa nisu ni analizirane.



Slika 4.
Sadržaj olova po jedinici suve mase u drugoj seriji.

Figure 4.
Contents of lead on dry weight unit in series two.



Slika 5.
Sadržaj gvožđa po jedinici suve mase u drugoj seriji

Figure 5.
Contents of iron on dry weight unit in series two.

Diskusija

Kukuruz je očigledno sposoban da usvaja olovo bez pomoći helata, i to u vrlo velikoj količini, ali samo ako se olovo u rastvoru ili zemljištu nalazi u manjim koncentracijama. Približno 20% više olova se usvojilo tamo gde je već postojao kompleks Fe-EDDHA sa gvožđem u trovalentnom obliku.

Kako po Kastoriju (Kastori 1995) teški metali pri velikim koncentracijama mogu da istiskuju jone gvožđa iz helatnih kompleksa, moguće je da razlika potiče od dela olova koje je je istislo Fe iz helata, ili kompleksiralo sa viškom kompleksona. To se međutim ne može pouzdano tvrditi, jer kod tih biljaka nije primećena distribucija olova u gornje delove biljke. Nameće se objašnjenje da pri malim koncentracijama olova kukuruz usvaja olovo, ali se ono taloži u apoplastu korena i tu se zadržava. Ovim se može i objasniti podatak da je kukuruz biljka koja donekle toleriše olovo u zemljištu (Kastori 1995). Iako je najviše olova usvojeno upravo pri tretiranju malim koncentracijama (20-30 puta više nego u drugim koncentracijama), raspored ovog olova u biljci je nepovoljan za korišćenje u fitoekstrakciji.

Kod tretmana velikim koncentracijama olovo-nitrata distribucija olova je drugačija – olovo je prisutno i u gornjim delovima biljke kod serije kojoj je dodavan i Fe-EDDHA kompleks. Količina usvojenog olova je drastično manja. Pošto je neorgansko olovo slabo mobilno kroz ksilem, velika je verovatnoća da je uzrok tim razlikama zapravo istiskivanje gvožđa iz Fe-EDDHA od strane olova. Tako stvoreni helat bi mogao da se kreće kroz ksilem i da se nagomilava u nadzemnim delovima biljke.

Helatno olovo se usvaja slabije u drugoj seriji (sa neorganskim gvožđem), pa se nameće zaključak da Fe-EDDHA ima pozitivno dejstvo na njegovo usvajanje. To usvajanje ima znatno povoljniji raspored u biljci u odnosu na neorgansko olovo. Najbolje su se pokazale biljke gajene na velikim koncentracijama kompleksa olova zajedno sa helatnim gvožđem. Najveći deo usvojenog olova se transportuje i akumulira u stablu i listu stvarajući tako depozit olova pogodan za odstranjivanje. Kao vrlo važna, nameće se i činjenica da su biljke iz druge serije u morfološkom pogledu izgledale mnogo bolje, što potvrđuje da je olovo usvojeno, transportovano i akumulirano u obliku helata, jer je tako značajno smanjena njegova toksičnost.

Gvožđe se usvaja mnogo bolje pri korišćenju kompleksa Fe-EDDHA nego pri upotrebi neorganskog gvožđa, što se i očekivalo. Značajno je i to da je količina usvojenog gvožđa veća u svim tretmanima nego u kontroli. To implicira mogućnost zavisnosti usvajanja i akumulacije gvožđa od, za biljku, stresne situacije (Salt *et al.* 1998) i/ili zastupljenosti oba metala. Ovu mogućnost potvrđuje i to da su najveću količinu gvožđa usvojile biljke gajene u prvoj liniji eksperimenta sa malim koncentracijama neorganskog olova. Interesantno je da se u ovim uslovima (u prisustvu oba helata) usvaja i najveća količina olova.

Jasno je da transport helatnog kompleksa u biljci predstavlja jedan od najznačajnijih faktora fitoekstrakcije .

Skorašnja istraživanja pokazuju da je moguće da biljke mogu kao odgovor na visoke koncentracije Fe sintetisati i izbacivati u spoljašnju sredinu određene kompleksone koji vezuju slobodne jone metala iz podloge

(Cakmak *et al.* 1996). Ovako vezani joni teških metala se možda redukuju na membrani, (Fe^{+3} - Fe^{+02} gvožđe reduktaza) (Chaney *et al.* 1972), ili se kao netaknuti kompleks unose u ćeliju (za gvožđe – Denfer & Ziegler 1988; Kochian 1991; Römeld & Marschner 1981). Dosadašnja istraživanja su pokazala da se ovako veliki organski molekuli usvajaju u koren pino-citozom (dr. željko Vučinić, lična komunikacija) ili uz pomoć posebnih nosača koji omogućavaju njihov ulazak u biljku (Eide *et al.* 1996; Kampfenkel *et al.* 1995; Guerinot 1997).

Pošto ksilemski zidovi imaju veliku sposobnost razmene katjona očekuje se da oni delimično usporavaju kretanje katjona metala (Salt *et al.* 1998). To je jedan od pokazatelja da se teški metali većim delom prenose kao stabilan kompleks, jer se transportuju u nekatjonskim, helatnim kompleksima.

S obzirom da su joni metala slabije pokretni kroz ksilem i apoplast u nevezanom obliku, i da su koncentracije Fe u nadzemnim delovima znatno veće pri korišćenju helatnog gvožđa verovatno je da se gvožđe prenosi kao vezano u kompleksu. Sasvim je sigurno da se tako transportovano gvožđe ne skladišti u potpunosti za stalno već se vrlo sporo premešta u mlade delove biljke. Nije sigurno da li se kompleks, nakon transporta, potpuno razlaže, pošto su 2+ joni gvožđa delimično mobilni kroz floem i simplast (Denfer & Ziegler 1988), ili se pak delimično skladišti kao kompleks.

Kod olova situacija je još jasnija. Pošto su joni olova skoro potpuno nepokretni kroz ksilem (M. Nikolić, usmena komunikacija), olovo u nadzemnim delovima biljke je moglo dotle biti transportovano samo kao kompleks. Ono se potom verovatno tamo trajno akumulira odakle se, vrlo sporo, distribuiralo ksilemom u nove, mlade delove biljke. Olovo nije mobilno u floemu (Denfer & Ziegler 1988), pa je njegova fitoekstrakcija efikasnija.

Neorgansko olovo transportovano u nadzemne delove biljke je najverovatnije vezano u kompleks ili istiskivanjem Fe iz Fe-EDDHA ili vezivanjem za neki helatirajući agens same biljke. Stoga je vrlo važno nastaviti sa proučavanjem genetski programiranih procesa (Salt *et al.* 1998) sinteze kompleksona kod biljaka kao jednom od orijentacija fitoekstrakcije.

Kretanje manjeg dela slobodnih metalnih jona i gotovo celokupnog dela helatno vezanih metala kroz ksilem je najverovatnije upravljano transpiracionim putevima. U nadzemnim delovima biljke voda isparava, a kompleksi metala ostaju i akumuliraju se (Blaylock *et al.* 1997).

Zaključci

1. Kukuruz najbolje usvaja olovo pri velikim koncentracijama Pb-EDTA-3125 mg/kg suve mase (oko 650 puta više od normalnih koncentracija koje navodi Kastori – oko 5 mg/L (Kastori 1998)) i prisustvu Fe-EDDHA.

2. Pri velikim koncentracijama olova u rastvoru, ono se ne usvaja drastično više nego na malim koncentracijama. Moguće je da postoje dva mehanizma reakcije na olovo u rastvoru. Jedan, po svoj prilici difuzija za male koncentracije i membranama kontrolisano usvajanje za velike koncentracije (Salt *et al.* 1998).
3. Gvožđe se usvaja u znatnim količinama u svim kombinacijama pri primeni Fe-EDDHA, mada najviše pri malim koncentracijama olovo-nitrata (oko 6 puta više od normalnih – 3120 mg/L (Kastori 1998)). Moguće je da biljka male koncentracije olova doživljava kao stres i zato tako reaguje.
4. Gvožđe se usvaja bolje u prisustvu olova, pa je moguće da postoji sinergizam u njihovom usvajanju, naročito u helatnom obliku.
5. Brzina usvajanja i transporta istraživanih metala najverovatnije najviše zavisi od transpiracionog fluksa kroz ksilem.
6. Moguće je izvoditi istovremenu fitoekstrakciju olova i gvožđa primenom odgovarajuće kombinacije kompleksona.

Zaključci ukazuju na velike mogućnosti helatime asistirane fitoekstrakcije, ali i na to da je potrebno nastaviti sa radom na terenu kao proverom i primenom laboratorijskih istraživanja. Takođe je neophodno nastaviti i sa ispitivanjem induciranja kombinovane fitoekstrakcije sa više kompleksona, kako bi se istražila mogućnost sanacije zemljišta zagađenog sa više metala odjednom. S obzirom da do sada nisu poznati podaci o ovakvom metodu, ovo su prve i, samim tim, značajne informacije o ideji na kojoj se može razviti niz eksperimenata. Rezultati ukazuju na velike mogućnosti koje bi rešile problem zemljišta zagađenim kako malim koncentracijama teških metala (tereni pored auto puteva i u okolini tačkastih emisera zagađivača u atmosferu...), tako i jako ugroženih terena kao što su jalovine iz rudnika ili deponije nusprodukta sagorevanja uglja u termoelektranama.

Literatura

- Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S, Zakharova O., Gussman C., et al 1997. Enhanced accumulation of Pb in *Indian mustard* by soil-applied chelating agents. *Enviro. Sci. Technol.*, **31**: 860-65
- Cakmak I., Oyturk L., Karnalik S., Marschner H., Ekiy H. 1996. Zinc efficient wild grasses enhance release of phytosiderophores under zinc deficiency. *J. Plant Nutr.*, **19**: 551-63
- Chaney R.L., Brown J.C., Tiffin L.O. 1972. Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake in soybeans. *Plant Physiol.*, **50**: 208-13
- Denfer D. & Ziegler, H. 1988. *Udžbenik botanike za visoke škole*, dio I (morfolologija i fiziologija). Zagreb: Školska knjiga
- Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expressions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 5624-28

- Guerinot M.L. 1997. Metal uptake in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **S.**, **48**: 96
- Hill-Cottingham, D.G. & Lloyd-Jones, C.P. 1965. The behavior of iron chelating agents with plants. *J. Exp. Bot.* **16**: 233-42
- Kampfenkel K., Kushnir S., Babiyshuk E., Inze D., Van Montagu M. (1995) Molecular characterization of putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* **270**, 28479-86
- Kastori R. 1995. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Nauka
- Kastori R., Petrović M., Petrović, N. 1992. *Effect on Excess Lead, Cadmium, Copper, and Zinc in Water Relations in Sunflower*. Novi Sad: Faculty of Agriculture, University of Novi Sad.
- Kastori R., Plesnčar M., Sakač Z., Panković D. and Arsenijević I. 1998. *Effect of Excess Lead on Sunflower Growth and Photosynthesis*. Novi Sad: Institute of Agriculture, University of Novi Sad
- Kochian L.V. 1991. Mechanisms of micronutrient and translocation. *Micronutrients in Agriculture*, **8**: 229-96
- Kojić M., Popović, R., Karadžić, B. 1994. *Fitoindikatori i njihov značaj u proceni uslova ekoloških uslova staništa*. Beograd: Nauka
- Römheld V., Marschner H. 1981. Effect of Fe stress on utilization of Fe chelates by efficient and inefficient plantstress. *J. Plant Nutr.*, **3**: 551-60
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. 1998. *Phytoremediation*. New Jersey: AgBiotech Centegers University.
- Sarić M., Krstić B., Stanković Ž. 1991. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Nauka
- Stanners D., Bourdeau P. 1991. *Europes Enviroment*. Copenhagen: European Enviroment Agency

Vanja Vukojević

The possible use of corn in phytoextraction of lead and iron from polluted soils

Contaminated soils represent a big environmental problem that can be partially solved by application of phytoremediation methods. Phytoextraction, one of these methods, uses the capability of plants to absorb and accumulate metals or organic pollutants in their tissues. Recently, big efforts were performed on development of chelate-assisted phytoextraction (CAP). The aim of this method is usage of chelator agents to stimulate metal accumulation in harvestable parts of plants. Although the idea of CAP originated from XIX century, its experimental development started recently with some field experiments. The results of these projects, together with need for heavy metal decontamination, made a clear way for development of this method.

In our sources, there is no published data about simultaneous chelate-assisted phytoextraction of more heavy metals. This project had to consolidate the possibilities for usage of this method on soils polluted with lead and iron.

The experiment was performed first with lead as one of the most toxic metals and then with iron that, although very important for the plant, has a disastrous effect on plants in high concentrations. EDTA for lead and ED-DHA for iron were used as chelator agents for conducting this method.

Corn was selected for conducting chelate-assisted phytoextraction not just as a model system but as a potential species for performing CAP in practice. It was selected because of its high resistance to iron pollution and its relatively good bearing of higher lead concentrations.

The results showed big efficiency of this method: on optimal conditions lead was accumulated 650 times more comparing to some earlier results about levels that plants are naturally capable to accumulate it. Iron was accumulated in even larger amounts, but comparing to some earlier results on iron uptake it was 5 times larger.

Simultaneous method of chelate-assisted phytoextraction gave a very good result, because the highest concentrations, in harvestable parts of plants, were accumulated. Therefore the potential of conducting this method in polluted soils decontamination is very important, and probably the only one that is efficient at this moment.

