

Оригинални научни рад

Original scientific paper

UDK: 582.623:630*114.2

Зорана Хркић¹

Јадранка Луковић²

Родољуб Ољача¹

Милан Боришев²

Лана Зорић²

UTICAJ NIKLA I OLOVA NA DUŽINU KORIJENA KLONOVA VRBA (*Salix spp.*)

Izvod: Teški metali predstavljaju značajne zagadivače životne sredine. Njihovi toksični efekti ispoljavaju se na različitim funkcionalnim i strukturnim nivoima biljnog organizma. Biljne vrste imaju različitu sposobnost usvajanja i translokacije metala: od korijena prema nadzemnim organima. Pri tom, teški metali, uglavnom, imaju negativno dejstvo na fiziološke procese biljaka, njihovu anatomiju i morfologiju. Međutim, rezultati ovog rada ukazuju da neki teški metali, kao što su Ni i Pb, mogu imati i pozitivne efekte na biljni organizam. Kod dva klena vrba (*Salix alba* i *Salix nigra*) istražen je uticaj dvije koncentracije nikla i olova (10^{-4} M i 10^{-5} M) na dužinu korijena. U oba slučaja primjenjeni teški metali imali su pozitivan efekat na procentualnu promjenu dužine korijena u poređenju sa kontrolnom grupom biljaka. Rezultati ukazuju da vrsta *Salix nigra*, klon 0408, posjeduje veću otpornost na povišene koncentracije teških metala, zbog čega bi mogla imati potencijalnu primjenu u projektima fitoremedijacije.

Ključне ријечи: teški metali, vrba, korijen, nikl, olovo.

¹ Универзитет у Бањој Луци, Шумарски факултет

² Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет

THE INFLUENCE OF NICKEL AND LEAD ON THE ROOT LENGTH OF WILLOW CLONES (*Salix spp.*)

Abstract: Heavy metals are major environmental pollutants. Their toxic effects are manifested in various functional and structural levels of plant organism. Plant species have different ability to uptake and translocate the metals from roots to aboveground organs. At the same time, heavy metals usually have a negative effect on the physiological processes of plants, their anatomy and morphology. However, the results of this study indicate that some heavy metals such as Ni and Pb can have positive effects on plant body. In two willow clones (*Salix alba* and *Salix nigra*) the influence of two concentrations of nickel and lead (10^{-4} M and 10^{-5} M) on root length was investigated. In both cases the applied heavy metals had a positive effect on the percentage of change in root length compared with a control group of plants. The results indicate that the species *Salix nigra*, clone 0408, has a higher resistance to elevated concentrations of heavy metals, which could have potential use in phytoremediation projects.

Key words: heavy metals, willow, root, nickel, lead.

UVOD

Teški metali u životnoj sredini predstavljaju težak problem na svjetskom nivou, jer su mnogi od njih postojani stotinama i hiljadama godina. Lokaliteti kontaminisani teškim metalima predstavljaju rezultat razvoja industrije i brojnih antropogenih aktivnosti. Ovi elementi se mogu naći u vodi, vazduhu i zemljištu, a stepen njihove toksičnosti za živi svijet zavisiće od njihove koncentracije, kao i od uslova sredine u kojoj se nalaze (Jensen i sar., 2009; Kastori i sar., 1997).

Teški metali su toksični čak i u malim količinama, opstaju u okolini, nemaju nikakvu biološku funkciju, ali se mogu akumulisati do nivoa koji ograničava rast biljaka (Memon et al., 2001). Teški metali utiču na sve fiziološko-biohemijske procese biljaka. Pod njihovim štetnim dejstvom nastaju anatomske i morfološke promjene, dolazi do smanjenja produkcije i promjena hemijskog sastava biljaka. Poseban problem predstavljaju teški metali (kao što je olov), koji preko biljaka ulaze u lance ishrane i tako ugrožavaju zdravlje ljudi (Bogdanović i sar., 1997).

Za razliku od organskih materija koje se vremenom razgrade, teški metali praktično zauvijek kruže u prirodi. Biljke imaju važnu ulogu u tom kruženju, zahvaljujući posebnim mehanizmima koji ih štite od stresa izazvanog toksičnim efektima teških metala (Kuzovkina-Eischen, 2003). Posebno se ističe grupa biljaka hiperakumulatora, vrsta koje usvajaju i akumulišu u svojim organima velike koncentracije teških

metala, bez negativnih efekata po njihov rast (Lux i sar., 2000; Pulford i sar., 2002; Jensen i sar., 2009). Upravo je i savremena tehnologija fitoremedijacije zasnovana na primjeni hiperakumulatora za prečišćavanje lokaliteta kontaminisanih teškim metalima, primarno onih iz antropogenih izvora (Schnoor, 1997; Lux i sar., 2000; Peer i sar., 2003; Prasad i Freitas, 2003; Hinman, 2005).

Među biljkama hiperakumulatorima veoma značajno mjesto zauzimaju drvenaste vrste roda *Salix*, koje posjeduju niz poželjnih karakteristika za primjenu u fotoremedijaciji. To su, prije svega, brz rast, visoka produkcija biomase, genetička raznovrsnost i sposobnost akumulacije i tolerancije visokih nivoa teških metala, posebno Ni i Pb (Lux i sar., 2000; Kuzovkina i sar., 2004; Kuzovkina i Quigley, 2005; Pulford i Dickinson, 2005; Jensen i sar., 2009; Zacchini i sar., 2009; Borišev i sar., 2010).

Fitoremedijacija koristi metaboličke procese u biljkama i fizičku i biohemiju ulogu korijenovog sistema, što dovodi do degradacije kontaminanata (Pivetz, 2001). Vrste roda *Salix* posjeduju ekstenzivan korijenov sistem, čija se dužina i dijametar povećavaju sa dubinom zemljišta i na taj način mogu da dopru do duboko kontaminiranih slojeva zemljišta (Keller i sar., 2003). Mnogobrojna istraživanja danas su usmjerena na pronalazak najotpornijih genotipova vrba koji bi bili pogodni za gajenje na kontaminisanim supstratima i potencijalnu fitoremedijaciju.

Cilj ovog rada je da se utvrdi da li i do kojih promjena dolazi u dužini korijena klonova vrsta roda *Salix* u prisustvu različitih koncentracija nikla i olova.

MATERIJAL I METOD RADA

Za analizu su kao eksperimentalni materijal odabrana dva klena vrba:

1. *Salix alba* – klon 68/53/1
2. *Salix nigra* – klon 0408

Klonovi su dobijeni iz rasadnika naučno-istraživačkog Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredine u Novom Sadu, kao rezultat selekcije genotipova. Reznice stabla vrba su uzete u periodu mirovanja vegetacije, povezane u snopove i čuvane u hladnjači. Neposredno prije upotrebe, reznice su dezinfikovane potapanjem u 2% rastvor bakar-sulfata u trajanju od 24 h. Prilikom pravljenja reznica vodilo se računa da sve budu približno ujednačene debljine i dužine, imajući u vidu značaj njihovih dimenzija na rast i razviće biljaka.

Vrbe su gajene u polukontrolisanim uslovima (u staklari), u hranljivim rastvorima, metodom vodenih kultura. Primjenjeni su hranljivi rastvori po Hoaglandu. Hranljivi rastvori su kontinuirano aerisani pomoću vazdušnih pumpi. Po 18 reznica stavljen

je u kadice zapremine 40 litara. Reznice klonova su u početnom periodu gajene u dejonizovanoj vodi dok se nije razvio korijenov sistem. Rastvori su mijenjani svake dvije sedmice.

Nakon 17 dana ožiljavanja na čistoj dejonizovanoj vodi, biljke su tretirane sa 1/8 koncentracije Hoaglandovog rastvora. Nakon 35 dana od početka ogleda, započet je tretman biljaka teškim metalima. Svaki tretman izvršen je na 36 reznicama, na kojima je mjerena dužina adventivnih korijenova.

Biljke su tretirane sa po dva teška metala, pojedinačno (Ni i Pb), svaki u dvije koncentracije (10^{-4} M i 10^{-5} M). Soli teških metala rastvarane su u 25% Hoaglandovom rastvoru, dok je pH rastvora održavan u rasponu od 4,5 do 5,0. Kontrolne grupe reznica takođe su gajene u 25% Hoaglandovom rastvoru. Kao teški metali primijenjeni su Ni (u obliku soli $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) i Pb (u obliku Pb-EDTA).

STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku analizu podataka dobijenih mjeranjem dužine korijenova korišten je softver STATISTICA for WINDOWS verzija 8. Izračunata je osnovna statistika, a poređenje kontrolnih i tretiranih grupa biljaka izvršeno je Dankanovim testom, za nivo značajnosti $p \leq 0.05$ i $p \leq 0.01$. Rezultati su prikazani tabelarno.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dobijeni rezultati o dužini korijenova dva klena vrba tokom tretmana sa dvije koncentracije Ni prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1: Uticaj različitih koncentracija Ni na dužinu korijenova kod vrsta *Salix alba* L. i *Salix nigra* Marsh. (srednja vrijednost ± standardna greška i koeficijent varijacije)

	Dužina korijenova			
	Ni koncentracija			
	Kontrola za $\text{Ni } 10^{-5}$	$\text{Ni } 10^{-5}$	Kontrola za $\text{Ni } 10^{-4}$	$\text{Ni } 10^{-4}$
<i>Salix alba</i> – klon 68/53/1				
O T	9.4±2.3 (35.2)	8.6±1.2 (37.8)	10.2±2.4 (40.1)	12.1±1.8 (40.7)
I T	9.9±1.3 (18.6)	9.6±1.6 (43.1)	10.5±2.4 (39.8)	12.8±1.4 (28.6)
% u odnosu na O T	8.0±13.1 (231.0)	9.8±3.9 (105.7)	3.0±0.2 (14.7)	15.4±11.9 (205.6)

II T	10.2±0.8 (11.1)	10.8±1.6 (40.7)	10.5±2.5 (41.2)	12.8±1.4 (29.6)
% u odnosu na O T	17.3±37.6 (307.7)	23.8±5.4 (59.6)	2.3±1.1 (86.6)	15.5±12.8 (218.1)
<i>Salix nigra – klon 0408</i>				
O T	12.7±1.1 (16.5)	12.0±2.6 (49.0)	10.9±0.8 (23.8)	8.4±0.7 (25.5)
I T	13.0±1.1 (17.3)	12.7±3.6 (63.3)	11.8±0.8 (22.1)	8.4±0.8 (26.8)
% u odnosu na O T	2.7±1.6 (120.6)	0.3±7.5 (6196.7)	10.1±5.3 (174.7)	1.1±2.8 (782.9)
II T	13.3±1.5 (22.2)	12.0±2.7 (49.8)	11.9±0.9 (24.5)	8.7±0.8 (24.9)
% u odnosu na O T	4.1±5.3 (255.7)	5.6±13.0 (521.5)	12.6±9.2 (244.5)	4.5±1.9 (115.3)

O T - početak tretmana; I T - 10 dana nakon tretmana metalom; II T - kontrola i Ni 10^{-5} M 46 dana nakon tretmana; II T - kontrola za Ni 10^{-4} 28 dana nakon tretmana, Ni 10^{-4} M 23 dana nakon tretmana.

Vrsta *Salix nigra*, u poređenju s vrstom *Salix alba*, karakteriše se sporijim rastom korijena kao i manjom procentualnom promjenom dužine korijena u odnosu na početak tretmana, pri dejstvu obje koncentracije Ni. Nikl nije imao negativno dejstvo na izduživanje korijena tretiranih biljaka u poređenju sa kontrolnom grupom.

Zavisno od koncentracije, dejstvo nikla na izduživanje korijena bilo je različito kod dva klena vrba. Kod klena 68/53/1 procentualna promjena dužine korijena veća je u uslovima Ni 10^{-5} M, nego u uslovima Ni 10^{-4} M, dok je kod klena 0408 situacija obrnuta.

Nikl se smatra elementom neophodnim za rast mnogih biljaka. Lako se transportuje iz korijena u nadzemne biljne organe. U višim koncentracijama može biti toksičan (Jadia i Fulekar, 2009). Kroz korteks korijena Ni se najvećim dijelom transportuje simplastom i akumuliše u celijama pericikla, gdje ispoljava citotoksično dejstvo inhibišući grananje korijena (Nagy i sar., 1997). Kod oba istražena klena vrba ustanovljeno je da Ni nije uzrokovao vidljivu nekrozu tkiva korijena. Punshon i sar. (2005) ustanovili su da je Ni u korijenu *Salix nigra* lokalizovan uglavnom na spoljašnjoj strani epiblema, u parenhimskom tkivu korteksa korijena i centralnom cilindru. Isti autori takođe su utvrdili da se Ni u potpunosti nalazi unutar lumena ksilemskih sudova i da se ne veže za njihove celjske zidove.

Dobijeni rezultati o uticaju Ni na dužinu korijena dva klena vrba mogu se dovesti u vezu sa translokacijom Ni u nadzemne organe. Borišev i sar. (2009) ustanovili su da je nivo translokacije Ni u nadzemne dijelove ispitanih klonova vrba zavisio

od koncentracije. Bio je dva puta veći kod biljaka koje su rasle u uslovima Ni 10^{-4} M u poređenju sa biljkama koje su rasle u uslovima Ni 10^{-5} M. Takva distribucija Ni mogla bi ukazivati na to da se ovaj metal dobro premješta kroz tkiva korijena istraženih klonova vrba i da se brzo transportuje u nadzemne organe.

Dobijeni rezultati o dužini korijenova dva klena vrba tokom tretmana sa dvije koncentracije Pb prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2: Uticaj različitih koncentracija Pb na dužinu korijenova kod vrsta *Salix alba* L. i *Salix nigra* Marsh. (srednja vrijednost ± standardna greška i koeficijent varijacije)

	Dužina korijenova		
	Pb koncentracija		
	Kontrola	Pb 10^{-5}	Pb 10^{-4}
<i>Salix alba</i> – klon 68/53/1			
O T	14.3±2.6 (37.1)	8.7±1.3 (30.9)	12.2±2.9 (58.7)
I T	16.1±3.5 (44.2)	8.4±1.5 (35.9)	13.1±3.0 (55.6)
% u odnosu na O T	10.8±3.8 (70.3)	-3.8±4.6 (-242.2)	9.0±1.9 (52.1)
II T	14.6±3.0 (41.4)	13.4±2.0 (29.6)	15.8±2.6 (40.0)
% u odnosu na O T	0.9±3.9 (867.8)	54.8±8.1 (29.5)	43.0±19.8 (113.3)
<i>Salix nigra</i> – klon 0408			
O T	14.0±6.0 (60.6)	15.2±3.7 (42.2)	10.4±1.0 (19.2)
I T	14.3±5.6 (55.7)	15.5±3.7 (41.7)	10.7±1.1 (21.1)
% u odnosu na O T	4.4±4.4 (141.4)	2.0±0.9 (73.8)	2.6±1.5 (113.9)
II T	17.2±4.7 (39.9)	17.2±5.0 (51.0)	11.3±1.1 (19.4)
% u odnosu na O T	33.1±23.1 (98.7)	9.9±6.9 (120.6)	9.5±4.8 (102.0)

O T - početak tretmana; I T - 10 dana nakon tretmana metalom; II T - 51 dan nakon tretmana.

Ako se izuzme negativna vrijednost za dužinu korijena u uslovima Pb 10^{-5} M kod klena 68/53/1, može se reći da je u odnosu na kontrolu olovo imalo manji uticaj na procentualnu promjenu dužine korijena u odnosu na nikl. Drugi tretman olovom kod klena 68/53/1 imao je pozitivan efekat na izduživanje korijena u poređenju sa kontrolnim biljkama.

Kod istraženih klonova vrba olovo nije uzrokovalo nekrozu tkiva korijena. Usvojeno olovo većinom se zadržava na mjestima razmjene katjona u čelijskom zidu i njegova translokacija od korijena do izdanaka je veoma ograničena. Brojne vrste akumuliraju olovo u čelijskom zidu, prije svega u čelijama endoderma i pericikla (Kastori i sar., 1997). Borišev i sar. (2009) su ustanovili da je kod istih klonova vrba akumulacija Pb u korijenu bila nekoliko puta veća, a translokacija u nadzemne organe značajno niža u poređenju sa Ni.

S obzirom da biljke generalno slabo usvajaju olovo, kao i da su zabilježeni pozitivni efekti niskih koncentracija Pb na rast biljaka (Kabata-Pendias i Pendias, 2001), time se i može objasniti ovakav efekat Pb na dužinu korijena vrba.

ZAKLJUČAK

Tretman teškim metalima (Ni i Pb) nije imao značajnije negativne efekte na dužnu korijena istraženih klonova vrba. Ako se izuzme malo smanjenje dužine korijena klon 68/53/1 pri tretmanu sa $Pb 10^{-5} M$, može se reći da su i nikl i olovo imali čak pozitivno dejstvo na izduživanje korijena. Ova činjenica ukazuje da analizirani klonovi vrba imaju sposobnost visoke tolerancije i akumulacije usvojenih teških metala (Ni i Pb). Sporiji rast korijena i manja procentualna promjena dužine korijena vrste *Salix nigra*, klon 0408, pri tretmanu sa oba teška metala primjenjena u dvije koncentracije, ukazuje da je ovaj klon otporniji na povišene koncentracije teških metala u odnosu na klon vrste *Salix alba*. To ukazuje da navedeni genotip ima veći potencijal fitoekstrakcije i da bi mogao imati primjenu u fitoremedijaciji lokaliteta kontaminisanih teškim metalima.

LITERATURA

- Bogdanović, D., Ubavić, M., Hadžić, V. (1997): Teški metali u zemljištu. U: Kastori, R. (ur.): Teški metali u životnoj sredini. pp. 95-152. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo. Feljton, Novi Sad.
- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Pilipović, A., Krstić, B., Orlović, S. (2009): Phytoextraction of Cd, Ni, and Pb Using Four Willow Clones (*Salix spp.*). Polish J. of Environ. Stud. Vol. 18, No. 4 (2009), 553-561.
- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Krstić, B., Pilipović A. (2010): Influence of Cd and Ni on content of N, P, K, nitrates and activity of nitrate reductase in clones of *Salix spp.* Biotechnol. & Biotechnol. eq. 24/2010/SE, Special edition/on-line, 228-235.

- Hinman, C. (2005): Low Impact Development Technical Guidance Manual for Puget Sound. Appendix 5 Phytoremediation. pp. 203-214. Washington State University, Pierce County Extension.
- Jadia, C. D., Fulekar, M. H. (2009): Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (6), 921-928.
- Jensen, J. K., Holm, P. E., Nejrup, J., Larsen, M. B., Borggaard, O. K. (2009): The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. Environmental Pollution 157, 931-937.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001). Trace Elements in Soils and Plants. pp. 158-172, 222-234, 325-333. Third Edition. CRC Press LLC.
- Kastori, R., Petrović, M., Arsenijević-Maksimović, I. (1997): Teški metali i biljke. U: Kastori, R. (ur.): Teški metali u životnoj sredini. pp. 195-257. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo. Feljton, Novi Sad.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M. (2003): Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: Comparison of different plant species in the field. Plant and Soil, 249: 67-81.
- Kuzovkina-Eischen, Y. A. (2003): Stress tolerance and horticultural evaluation of the genus *Salix*. Dissertation. pp. 39-47. The Ohio State University.
- Kuzovkina, Y. A., Knee, M., Quigley, M. F. (2004): Metal Resistance and Accumulation in North American Willow (*Salix* L.) Species. Working Party on Environmental Applications of Poplar and Willow, pp. 151. 22nd session of the International poplar Commision and 24nd session of its Executive Committee, Santiago, Chile.
- Kuzovkina, Y. A., Quigley, M. F. (2005): Willows beyond wetlands: Uses of *Salix* L. Species for environmental projects. Water, Air, and Soil Pollution 162: 183-204.
- Lux, A., Masarovicova, E., Liskova, D., Kralova, K. Varga, L. (2000): Study of woody plants utilizable for phytoremediation in Slovakia. pp. 379-391. Ecosystem Service and Sustainable Watershed Management in North China International Conference, Beijing P. R. China.
- Memon, A. R., Aktoprakligil, D., Özdem, A., Vertii, A. (2001): Heavy metal accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants. pp. 111-116. Researchs Articles. Tübitak, Marmara Research Center, Institute for Genetic Engineering and Biotechnology.

- Nagy, E., Mihalik, E., Erdei L.(1997): Effect of cadmium stress on the leaf structure of *Typha angustifolia*. IX Hungarian Plant anatomy symposium, Szeged, Hungary, 10-12. September, Book of abstracts, pp 87.
- Peer, W. A., Baxter. I. R., Richardson, E. L., Freeman, J. L., Murphy, A. S. (2003): Phytoremediation and hyperaccumulator plants.. In: Tamas M and Martinioia E. (eds): Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification. pp. 1-13. Topics in Current Genetics Vol 14, Springer, Berlin.
- Pivetz, B. E. (2001): Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. pp. 2-36. U.S.EPA Ground Water Issue. EPA/540/S-01/500.
- Prasad, M. N. V., Freitas, H. M. (2003): Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting of phytoremediation technology. Electronic Journal of Biotechnology (online), Vol.6, No.3: 286-290.
- Pulford, I. D., Riddell-Black, D., Stewart, C. (2002): Heavy Metal Uptake by Willow Clones from Sewage Sludge-Treated Soil: The Potential for Phytoremediation. International Journal of Phytoremediation: Vol. 4, No. 1: 59-72.
- Pulford, I. D. and Dickinson, N. M. (2005): Phytoremediation technologies using trees. pp. 375-395. In: Prasad, N. M. V., Naidu, R. (eds.): Trace Elements in the Environment. CRC Press NY.
- Punshon, T., Jackson, B. P., Lanzirotti, A., Hopkins, W. A., Bertsch, P. M., Burger, J. (2005): Application of Synchrotron X-Ray Microbeam Spectroscopy to the Determination of Metal Distribution and Speciation in Biological Tissues. Spectroscopy Letters, 38: 343-363.
- Schnoor, J.L. (1997): Phytoremediation.Ground-Water Remediation Technologies Evaluation Report Te-98-01. pp. 1-37. The University of Iowa, Department of Civil and Environmental Engineering and Center for Global and Regional Environmental Research.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L., Massacci, A. (2009): Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. Water Air Soil Pollut. 197: 23- 24

THE INFLUENCE OF NICKEL AND LEAD ON THE ROOT LENGTH OF WILLOW CLONES (*Salix spp.*)

Zorana Hrkić, Jadranka Luković, Rodoljub Oljača, Milan Borišev, Lana Zorić

Summary

This paper investigated the individual influence of two heavy metals, nickel and lead, on the length of the willow roots. Willow clones were treated with two concentrations of selected metals. After analyzing the percentage change of clones root length in specific time intervals from start of treatment, data were processed, to determine how elevated concentrations of heavy metals affect the root as the plant organ which uptake them.

It was found that treatment of Ni and Pb had no significant negative effects on the root length of investigated willow clones. With the exception of a small decrease in root length in clone 68/53/1 at treatment with Pb 10^{-5} , we can say that applied metals even had a positive effect on the root lengthening. This indicates that the analyzed clones of willow are capable of high tolerance and accumulation of Ni and Pb.

*Slower growth of roots and the lower percentage changes in the root length of *Salix nigra*, clone 0408, when it was treated with both heavy metals indicates that this clone is resistant to elevated concentrations of heavy metals in relation to clone species *Salix alba*. This genotype has a greater phytoextraction potential and could have applications in phytoremediation of sites contaminated with heavy metals.*