

# POTENCIJAL JABLANA (*Populus nigra* var. *italica*) U FITOREMEDIJACIJI KADMIJA

## THE POTENTIAL OF POPLAR (*Populus nigra* var. *italica*) IN THE PHYTOREMEDIATION OF CADMIUM

Tamara JAKOVLJEVIĆ\*, Ivana RADOJČIĆ REDOVNIKOVIĆ\*\*, Marina CVJETKO\*\*, Ivana BUKOVAC\*\*, Marija SEDAK\*\*\*, Maja ĐOKIĆ\*\*\*, Nina BILANDŽIĆ\*\*\*

### Sažetak

Fitoremedijacija se smatra obećavajućom, jeftinom te estetski prihvatljivom, *in situ* tehnologijom za remedijaciju teških metala iz onečišćenih tala. Potencijal uporabe drveća u fitoremedijaciji tla prepoznat je zadnjih desetljeća, te je u skladu s tim u ovom radu utvrđen potencijal jablana (*Populus nigra* var. *italica*) u fitoremedijaciji kadmija. U tu svrhu ispitan je fitoekstrakcijski potencijal jablana (*Populus nigra* var. *italica*), distribucija kadmija u pojedine dijelove biljke (list, stabljika, korijen) te potencijal polifenolnih spojeva i enzima fenilalanin-amonijevije lijaze (PAL) u odgovoru biljke na stres uzrokovan akumulacijom različitih količina kadmija. Jablani (*Populus nigra* var. *italica*) su tijekom 55-dnevnog uzgoja u tlu izloženi različitim masenim udjelima kadmija u tlu ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla). S ciljem utvrđivanja razine akumulacije i distribucije kadmija u jablanu utvrđeni su maseni udjeli kadmija u pojedinim dijelovima biljaka (list, stabljika, korijen) (Slika 1.). Akumulacija kadmija u biomasi biljaka povećala se proporcionalno s povećanjem masenog udjela kadmija u tlu. Distribucija kadmija kod vrsta *Populus spp.* smanjuje se sljedećem redoslijedom: korijen > stabljika > list. Kako bi se utvrdio fitoekstrakcijski potencijal ispitivanog jablana (*Populus nigra* var. *italica*) određeni su bioakumulacijski (BF) i translokacijski faktori (TF) prikazani na slici 2. i 3. Određene BF vrijednosti ukazuju na povećane akumulacijske sposobnosti ispitivane vrste jablana pri masenim udjelima kadmija (do  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla) (Slika 2.). Određene TF vrijednosti ukazuju na određenu toleranciju na prisutnost kadmija u tlu do masenog udjela od  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla (Slika 3.). Nadalje, da bi se utvrdio potencijal polifenolnih spojeva u odgovoru biljke na stres uzrokovan akumulacijom različitih masenih udjela kadmija, analiziran je ukupan maseni udio polifenola te aktivnost antioksidativnog enzima fenilalanin-amonijevije lijaze (PAL) u ekstraktima listova jablana. Ukupan maseni udio polifenola kod masenog udjela kadmija od  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla povećan je u odnosu na kontrolu (Slika 4.), dok su izmjerene vrijednosti aktivnosti enzima PAL povećane samo pri masenom udjelu kadmija od  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla u odnosu na kontrolu (Slika 5.). Uočeni povećani maseni udio polifenola povezan je s povećanjem aktivnosti fenilalanin-amonijevije lijaze (PAL) i upućuju na *de novo* sintezu polifenola uslijed izloženosti biljke stresu uzrokovanim kadmijem. Dobiveni rezultati ukazuju da jablan (*Populus nigra* var. *italica*) ima dobar potencijal za fitoekstrakciju tala onečišćenih kadmijem, te da u obrani od oksidativnog stresa uzrokovano izloženosti kadmiju važnu ulogu imaju polifenolni spojevi.

**KLJUČNE RIJEČI:** fitoremedijacija, jablan, kadmij, polifenoli, fenilalanin-amonijevije lijaze

\* Dr. sc. Tamara Jakovljević, Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska, [tamaraj@sumins.hr](mailto:tamaraj@sumins.hr)

\*\* Dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković, izv. prof., Ivana Bukovac, mag. ing. Bioteh., Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilista u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

\*\*\* Marija Sedak, dipl. ing. preh. tehnol., Maja Đokić, dipl. ing. kem. tehnol., Dr. sc. Nina Bilandžić, Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Savska cesta 143, 10000 Zagreb, Hrvatska

## UVOD INTRODUCTION

Globalno onečišćenje, do kojeg je došlo zbog brzog napretka industrije, rudarskog iskorištavanja metala, naglog porasta stanovništva te neadekvatnog zbrinjavanja otpada, potaklo je mnoge stručnjake iz područja prirodnih znanosti na traženje što učinkovitijeg rješenja čišćenja okoliša. Teški metali smatraju se glavnom skupinom anorganskih onečišćivača i izvor onečišćenja razmjerno velikih područja tla. Porijeklo teških metala u tlu je različito. Može biti geogeno, kada teški metali u tlo dopijevaju trošenjem matične stijene iz koje su nastali ili je njihovo porijeklo u tlu vezano za vanjske faktore (antropogeno i imisijsko) (Lasat 2002). Glavni izvor onečišćenja su rudarenje te taljenje olova i cinka, metalurške industrije, odlaganje otpada koji sadrži kadmij, spaljivanje plastičnih kontejnera i baterija, ispuštanje kanalizacijskog mulja, izgaranje fosilnih goriva te primjena fosfatnih gnojiva (Alloway 1995). Kadmiju (Cd), kao jednom od najopasnijih teških metala koji je ujedno i genotoksičan, koncentracija u tlu, vodi i zraku ubrzano raste (Capuana 2011). Kadmij se smatra kumulativnim otrovom zbog toga što remeti metabolizam kalcija i fosfora, uzrokuje bolesti kostiju, respiratornih organa i živčanog sustava te je klasificiran kao kancerogen prve skupine (Lasat 2002, Yang i sur. 2005). Stoga, postoji veliko zanimanje za identifikaciju autohtonih biljnih vrsta sposobnih akumulirati povećane količine kadmija, s ciljem njihove primjene u fitoremedijaciji onečišćenih tala. Fitoremedijacija kao nova tehnologija koja koristi biljke za pročišćavanje tla i vode ekološki je prihvatljiva, potencijalno jeftina, vizualno nenametljiva i nudi mogućnost bioobnove tla onečišćenog teškim metalima (Ali i sur., 2013).

Potencijal uporabe drveća kao prikladnog vegetacijskog pokrova za tla zagađena teškim metalima prepoznat je zadnjih nekoliko desetljeća. Mnoga šumska područja zagađena su teškim metalima zbog taloženja atmosferskih onečišćivača iz industrije i prometa pri čemu dolazi do smanjenja produktivnosti šumske biomase. Vrlo korisno ekološko rješenje za čišćenje onečišćenih šumskih područja te održavanje visoke količine biomase (drva) je uzgoj biljnih vrsta koje imaju velik akumulacijski kapacitet za teške metale na zagađenom tlu (Pajević i sur. 2009). Drveće se smatra jeftinim, održivim i ekološki prihvatljivim rješenjem, posebice kada nije isplativo koristiti druge tehnologije ili ne postoji vremenski pritisak za korištenje tla (Pulford i Watson 2003). Jedna od glavnih prednosti stabala u fitoremedijaciji je njihov duboki sustav korijenja koji je odgovoran za stabilnost tla, smanjujući eroziju supstrata zbog vjetrova i vode. Isparavanje vode pomoću drveća reducira ukupni protok vode, čime se reducira količina teških metala u podzemnim i površinskim vodama. Masivni sustav korijenja pomaže u vezanju tla, a odumiranjem njegovih dijelova, npr. otpadanje lišća u jesen, dovodi do stvaranja organskog pokrova nad zagađenim tlom što omogućuje

nastanjivanje i drugih biljnih vrsta, poboljšava provjetranje tla te poboljšava aktivnost mikroba zaduženih za razgradnju organskih tvari. Korijenje drveća u simbiozi s mikroorganizmima može dovesti do kemijskih promjena nekih metala, pri čemu oni postaju manje biodostupni. Osim toga, stabla poboljšavaju ugodnost okoliša i pružaju staništa divljim životinjama (Pulford i Watson 2003). Provedeno je mnogo studija vezanih uz sadnju drveća na metalima zagađenom području u kojima su se koristile razne vrste vrba (*Salix*), breza (*Betula*), topola (*Populus*), joha (*Alnus*) i javora (*Acer*) (Pulford i Watson 2003, Nikolić i sur. 2008, Pajević i sur. 2009). Zaključeno je da teški metali imaju različitu mobilnost unutar drveća, tako olovo, krom i bakar obično ostaju imobilizirani u korijenu, dok se kadmij, nikel i cink lakše translociraju u nadzemne dijelove biljke. Smatra se da topole i vrbe zbog svog brzog rasta, velike biomase te visoke tolerancije na teške metale predstavljaju velik potencijal kada se govori o uporabi drveća u fitoremedijaciji (Capuana 2011). Stoga je akumulacija teških metala proučavana u različitim *Populus spp.* kao što su *Populus nigra*, *Populus deltoides*, *Populus alba*, transgenična *Populus canescens* te razni hibridi kao što su Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) i I-214 (*Populus x euramericana*) (Capuana 2011, Sebastiani i sur. 2004).

Izlaganje stresu, koji je posljedica visoke koncentracije teških metala, dovodi do pojave oksidacijskog stresa, što uključuje nastanak reaktivnih oksidativnih spojeva (superoksid-radikal, hidrogen-radikal, vodikov peroksid) u biljci kao prvi odgovor u obrani biljke. Nadalje, dolazi do velikih promjena u profilu genske ekspresije koji se očituje u gotovo svim aspektima biljnih funkcija i metabolizma, uključujući signalnu transdukciju, ionsku homeostazu, metabolizam ugljikohidrata i dušika, sekundarni metabolizam, fotosintezu, rast i razvoj (Benavides i sur. 2005). Tijekom evolucije razvilo se više mehanizama zaštite, koji obuhvaćaju regulaciju stvaranja ROS-a, poništavanje njihova djelovanja (antioksidansi) ili pak popravak nastalih oštećenja. Ti mehanizmi uključuju djelovanje enzimskih antioksidanasa koji predstavljaju primarnu liniju antioksidativne zaštite te neenzimskih antioksidanasa (npr. askorbinska kiselina, ASH; glutation, GSH; fenolni spojevi, alkaloidi, neproteinske aminokiseline, karotenoidi i  $\alpha$ -tokoferol) koji čine sekundarnu liniju antioksidativne zaštite (Gill i Tuteja 2010). Osim dobro istraženih antioksidativnih enzima posljednja istraživanja ističu potencijalnu ulogu polifenola kao antioksidansa u obrani biljke od stresa uzrokovane povećanom koncentracijom metala (Michalak 2006). Polifenolni spojevi su jedna od najvažnih grupa sekundarnih metabolita i prisutni su u gotovo svim biljkama. Glavne skupine polifenola definiraju se prema prirodi ugljikova kostura: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignini. Većina prirodnih polifenolnih spojeva prisutna je u obliku konjugata s mono- i polisaharidima, vezanima za jednu ili više fenolnih skupina, a mogu se pojavljivati i kao esteri. Polifenoli pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, što se

prpisuje njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti. Mogu djelovati kao antioksidansi preko hvatanja radikala, a struktura fenolnih spojeva ključna je za njihovu antioksidacijsku aktivnost (Balasundram i sur. 2006). Polifenolni spojevi u biljkama reguliraju brojne fiziološke funkcije. Nositelji su boje pojedinih biljnih dijelova te stoga privlače insekte i ptice koji sudjeluju u oprašivanju i rasprostranjivanju. Sudjeluju u lignifikaciji, dajući čvrstoću biljnoj stijenci i mehanička su prepreka prodoru patogena. U stanjima stresa uvjetovanog UV zračenjem, visokim temperaturama, ozljedom ili infekcijom tkiva, inducira se njihova biosinteza, pa uz fiziološke uloge, ujedno zaštićuju biljku od negativnih utjecaja okoliša (Michalak 2006). Postoje mnoga istraživanja u kojima je dokazan povećan udio polifenolnih spojeva uslijed izlaganja biljaka oksidativnom stresu uzrokovanom visokim masenim udjelom teških metala (Díaz i sur. 2001, Sakkihama i Yamasaki 2002, Kováčik i sur. 2008). Biosinteza polifenolnih spojeva u biljkama najčešće se odvija preko acikličkih međuprodukata koji nastaju u biosintetskom putu šikiminske kiseline. Jedan od puteva biosinteze polifenola je i fenilpropanoidni put koji postoji u višim biljkama i uglavnom je uključen u obrambene mehanizme biljke, sintezu lignina te pigmenta kao što su antocijani. Fenilalanin-amonijeva lijaza (PAL) je prvi i ključni enzim u regulaciji fenilpropanoidnog biosintetskog puta. Taj enzim je važna karika u sintezi sekundarnih metabolita jer je povezan sa sintezom primarnih metabolita, pa tako predstavlja regulatornu točku u procesu kreiranja odgovora na različite okolišne čimbenike (Vogt 2010).

Cilj ovog rada je bio utvrditi potencijal jablana (*Populus nigra* var. *italica*) u fitoremedijaciji kadmija te je u tu svrhu ispitan utjecaj kadmija na fitoekstrakcijski potencijal te distribucija kadmija u pojedine dijelove biljke (list, stabljika, korijen) te utvrditi potencijalnu ulogu polifenolnih spojeva, kao sekundarnih metabolita koji sudjeluju u odgovoru biljke na stres uzrokovan akumulacijom različitih udjela kadmija, zbog čega je analiziran ukupan maseni udio polifenola te aktivnost enzima fenilalanin-amonijeve lijaze (PAL).

## MATERIJALI I METODE MATERIALS AND METHODES

### Biljni materijal – *Plant material*

Biljne presadnice jablana proizvedene iz reznica u Hrvatskom šumarskom institutu, starosti 1/1 tj. ožiljenice starosti 1 godina.

### Postavljanje i provedba pokusa – *Experiment design*

Za pokus je korišteno tlo u čijem je sastavu 5 komponenata u jednakim omjerima: Kompost (Ekoflor), Stajnjak, Litvanski treset Profi mix1, Duperta (supratna mješavina za sjemenke i sadnice povrća, koja se sastoji od treseta, nutritivnih aditiva te elemenata u tragovima, pH od 5,5 do 6,5) i

Profi mix 2, Duperta (supratna mješavina obogaćena aminokiselinama, fosforom, kalijem i mikronutrijentima koji utječu na razvoj korijena i bolju asimilaciju hranjivih tvari, s dodatkom gline, pH od 5,5 do 6,5). Mjesec dana prije sadnje tlo je tretirano s vodenom otopinom kadmijeva klorid-hidrata kako bi se postigao maseni udio kadmija u tlu od 10, 25 i 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla.

Presadnice jablana posađene su pojedinačno u teglice promjera 16 cm. Uzgoj je proveden u Hrvatskom šumarskom institutu u Jastrebarskom, gdje je sveukupno posađeno 60 presadnica jablana i to 15 presadnica za svaki maseni udio kadmija u tlu (0 (kontrola), 10, 25 i 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla). Uzgoj je trajao 55 dana, te su prilikom berbe uzete po 5 biljke za svaki maseni udio kadmija. U uzorcima je određena akumulacija i distribucija kadmija u listu, stabljici i korijenu. Također, određeni su ukupni polifenoli i enzim fenilalanin-amonijeva lijaza (PAL).

### Određivanje koncentracije kadmija – *Determination of cadmium concentration*

Koncentracija kadmija određena je na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru s grafitnom pećnicom i auto-samplerom (Perkin Erlmer Aanalyst 600). Uzorci za analizu prethodno su pripremljeni mokrim spaljivanjem pomoću uređaja za mikrovalnu razgradnju (Anton-Paar-Multiwave 3000). Mjerenje je provedeno na valnoj duljini od 228,8 nm (ISO 11047 1998).

### Određivanje bioakumulacijskog i translokacijskog faktora – *Determination of bioaccumulation and translocation factors*

Kako bi se utvrdio fitoremedijacijski potencijal određeni su bioakumulacijski i translokacijski faktori (Wu i sur. 2010). Sposobnost biljaka da akumuliraju teške metale prikazuje se kao bioakumulacijski faktor (BF), a on se računa kao omjer koncentracije kadmija u biljci te koncentracije kadmija u tlu [1].

$$BF = \frac{c(\text{jablan})}{c(\text{tlo})} \quad [1]$$

Biljka može translocirati teške metale kroz korijenje do drugih dijelova biljke, a ta sposobnost izražava se kao translokacijski faktor (TF) i izračunava se kao omjer između koncentracije kadmija u nadzemnom dijelu biljke i koncentracije kadmija u korijenu [2].

$$TF = \frac{c(\text{izdanak})}{c(\text{korijen})} \quad [2]$$

### Određivanje ukupnih polifenolnih spojeva – *Determination of total phenolics*

List jablana (350 mg) homogenizira se u tarioniku s 10 mL metanola (70 %, v/v). Ekstrakcija se provodi u mikroval-

nom reaktoru pri 75 °C i 150 W kroz 15 minuta. Smjesa se potom centrifugira 15 min pri 6000 o min<sup>-1</sup>. Supernatant se profiltrira kroz filter-papir u odmjernu tikvicu i nadopuni do 10 mL. Ekstrakti se propušu dušikom i čuvaju pri –20 °C do daljne analize. Ukupni polifenoli određeni su u metanolnim ekstraktima. Princip određivanja se temelji na kolornoj reakciji, koja je posljedica reakcije polifenola s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom. Primjenom spektrofotometrijske metode mjeren je intenzitet nastalog obojenja pri 760 nm. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na g suhe tvari uzorka (mg GAE g s.t.<sup>-1</sup>) (Singleton i sur. 1999).

#### Određivanje aktivnosti fenilalanin-amonij lijaze (PAL) – Determination of phenylalanine-ammonium liase activity

Svježe otrgnuti listovi (oko 200 mg) homogeniziraju se u ohlađenom tarioniku uz dodavanje PVPP-a i 2 mL hladnog 0,05 M boratnog pufera pH=8,8. Ekstrakti se centrifugiraju 20 min na 15000 g pri +4 °C te se supernatant prebaci u čiste kivete i čuva pri –20 °C do analize. Koncentracija ukupnih proteina određuje se metodom po Lowry-u (Ambriović Ristov i sur. 2007). Aktivnost PAL određuje se spektrofotometrijski pri 290 nm praćenjem nastanka cimetine kiseline. Enzimskoi ekstrakt (0,1 mL) prethodno ra-

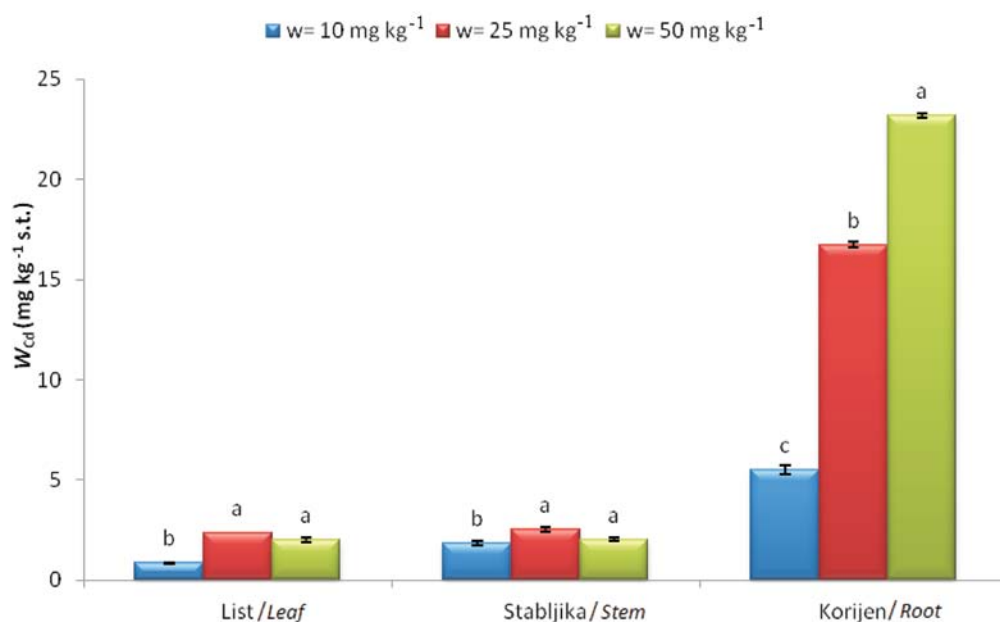
zrijeđen 4 puta pomiješa se s 0,3 mL 50 mM otopine L-fenilalanina te se doda 0,05 M boratnog pufera do volumena od 3 mL. Reakcijska smjesa se zatim inkubira na 30 °C 15 minuta, nakon čega se mjeri apsorbancija pri 290 nm. Specifična PAL aktivnost izrazi se kao množina nastale cimetine kiseline u minuti po mg proteina (μmol min<sup>-1</sup> mgp<sup>-1</sup>). Molarni ekstincijski koefcijent za cimetcnu kiselinu iznosi 10 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Ravi i Sharma 2008).

#### Statistička analiza – Statistical analysis

Sva mjerenja provedena su u paralelama, tako da su rezultati prosječne vrijednosti tri mjerenja te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (±S.D.). Statistička analiza provedena je uporabom programa Statistica 7.1. Razlike između uzoraka su analizirane ANOVA testom te post hoc Turkey's HSD testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini vjerojatnosti p<0,05.

## REZULTATI I RASPRAVA RESULTS AND DISCUSSION

Fitoremedijacija je vrlo učinkovita metoda za uklanjanje teških metala, što je pokazano i brojnim istraživanjima. Fitoremedijacija kao i svaka druga metoda ima svoja ograničenja i nije uvijek djelotvorna, zato je cilj budućih istraživa-



**Slika 1.** Maseni udio kadmija u pojedinim dijelovima jablana (*Populus nigra* var. *Italica*) nakon 55 dnevnog uzgoja u tlu s različitim udjelima kadmija ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  s.t. tla)

\* rezultati su srednja vrijednost ± S.D. ( $n=3$ ), vrijednosti za pojedni organ sa istim slovom (a-c) statistički se ne razlikuju ( $P < 0,05$ ) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

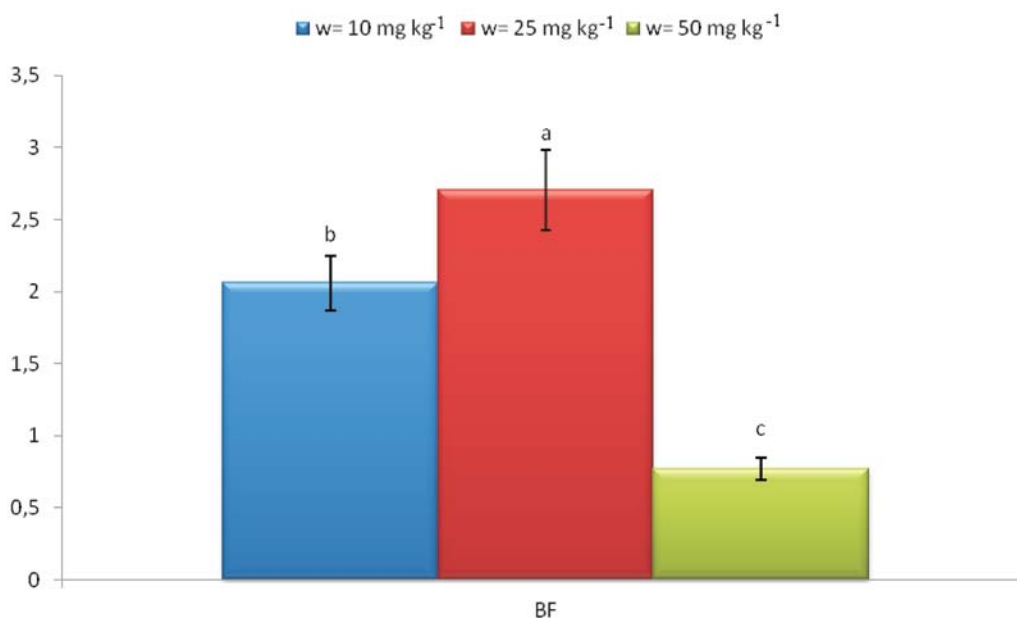
**Figure 1** Cadmium content in different plant parts of poplar (*Populus nigra* var. *Italica*) treated for 55 day with different cadmium concentrations ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  dw of soil)

\*Mean values ( $n = 3$ ) ± SD in each column followed by different lower-case letters are not significantly different ( $P < 0.05$ ) within the specific plant organ for each treatment as measured by Tukey's HSD test

nja unaprijediti ovu metodu. U tu svrhu provode se istraživanja na mnogim biljnim vrstama i u mnogim uvjetima. U posljednje vrijeme velika pozornost pridaje se stablima, pa tako i vrstama *Populus spp.*, zbog svojih prednosti kao što su lagani uzgoj, brzi rast, proizvodnja velike količine biomase i dr. (Pajević i sur. 2009). Tolerancija biljaka na kadmij može se odrediti na temelju promjene u biomasi kao odgovoru na toksičnost kadmija u usporedbi s kontrolom (Pulford i Watson 2003). Jablani (*Populus nigra* var. *italica*) izloženi različitim masenim udjelima kadmija u tlu ( $w= 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla) pokazali su morfološke, fiziološke i biokemijske promjene nakon 55 dnevnog uzgoja u tlu. S ciljem utvrđivanja razine akumulacije i distribucije kadmija u jablanu utvrđeni su maseni udjeli kadmija u pojedinim dijelovima biljaka (list, stabljika, korijen), a rezultati su prikazani na slici 1.

Također, analiziran je maseni udio kadmija u tlu koji je odgovarao udjelu koji se želio postići pri planiranju pokusa. U netretiranom tlu nije ustanovljeno prisutnost kadmija. Akumulacija kadmija u biomasi biljaka povećala se proporcionalno s povećanjem masenog udjela kadmija u tlu. U listu jablana utvrđen je statistički značajan porast masenog udjela kadmija kod udjela od  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla u odnosu na udio kadmija kod  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla, pri čemu se udio kadmija kod udjela

od  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla međusobno statistički ne razlikuju. Takvi rezultati utvrđeni su i kod stabljike jablana. Međutim, kod korijena jablana utvrđen je statistički vrlo značajan ( $p<0,05$ ) porast udjela kadmija s povećanjem njegova masena udjela u tlu ( $w= 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla) (slika 1). Ovakvi rezultati odgovaraju rezultatima mnogih provedenih istraživanja s vrstama *Populus spp.* u kojima podaci pokazuju da se veća akumulacija kadmija ponajprije događa u korijenu nego u nadzemnim dijelovima biljke (Pulford i Watson 2003, Gu i sur. 2007, Pietrini i sur. 2010, Lin i sur. 2011, Shukla i sur. 2011). Također, Gu i sur. (2007) u svojoj studiji zamjećuju da je veći udio kadmija u mlađim listovima u odnosu na stare listove. Transport kadmija iz korijena u stabljiku i list kritičan je korak u fitoekstrakciji kadmija. Mnogi čimbenici utječu na količinu kadmija koja će biti transportirana iz korijena vaskularnim sustavom u ostale dijelove biljke. U te čimbenike ubraja se aktivnost sekvencije metala u stanicama korijena, učinkovitost radijalnog simplastnog puta i unos u nadzemne dijelove biljke (Gu i sur. 2007). Distribucija kadmija kod vrsta *Populus spp.* smanjuje se sljedećem redoslijedom: korijen > stabljika > list. Maseni udio kadmija u nadzemnom dijelu hiperakumulirajuće biljke morala bi biti veća od  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari biomase, što nije slučaj za ispitivani jablan. Međutim, u do



**Slika 2.** Vrijednosti bioakumulacijskog faktora (BF) za jablan (*Populus nigra* var. *italica*) nakon 55 dnevnog uzgoja u tlu s različitim masenim udjelima kadmija ( $w= 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  s.t. tla)

\* rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=5$ ), vrijednosti sa istim slovom (a-c) statistički se ne razlikuju ( $P < 0,05$ ) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

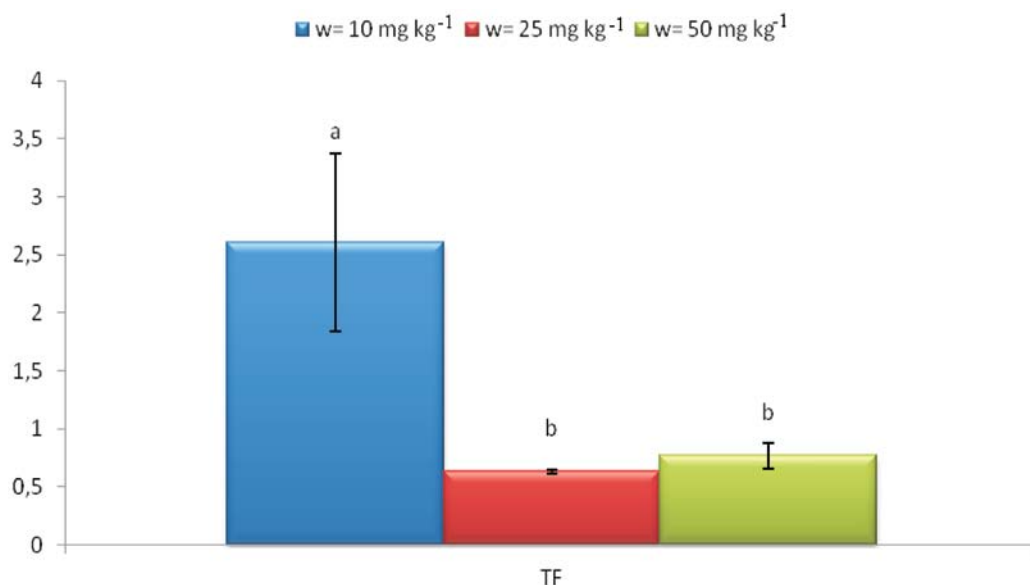
**Figure 2.** Bioaccumulation factor (BF) of cadmium in poplar (*Populus nigra* var. *italica*) treated for 55 day with different cadmium concentrations ( $w= 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  dw of soil)

\*Mean values ( $n = 5$ )  $\pm$  SD in each column followed by non-identical letters (a-c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) in comper to control plants as determined by Tukey's HSD test

sada objavljenoj literaturi mogu se naći radovi u kojima se određeni *Populus* kultivari klasificiraju kao hiperakumulatori kadmija (Gu i sur. 2007). Nadalje, s ciljem određivanja fitoekstrakcijskog potencijala ispitivanog jablana (*Populus nigra* var. *italica*) određeni su bioakumulacijski faktor (BF) i translokacijski faktor (TF) prikazani su na slikama 2 i 3.

Bioakumulacijski faktor definiran je kao maseni udio metala u biljci s obzirom na udio metala u tlu. Vrijednosti bioakumulacijskog faktora (BF) pokazuje kolika je sposobnost biljke da akumulira teške metale s obzirom na njegovu koncentraciju u tlu. Hiperakumulirajuće biljke su one čiji je BF > 1,0 (Cluis 2004). U ovom ispitivanju utvrđena je BF vrijednost za jablan od 2,06 pri masenom udjelu kadmija od 10 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla, pri masenom udjelu kadmija od 25 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari utvrđena je veća vrijednost BF i iznosi 2,70 dok pri masenom udjelu kadmija od 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari utvrđena je manja vrijednost BF koja iznosi 0,769 (slika 2). Translokacijski faktor je definiran kao omjer masenog udjela metala u nadzemnom dijelu biljke s obzirom na udio metala u korijenu, a koristi se za utvrđivanje učinkovitosti biljke u translokaciji kadmija iz korijena u nadzemni dio. TF vrijednosti mogu ukazati na kretanje i distribuciju teških metala u biljci. Hiperakumulirajuće biljke karakterizira TF > 1,0 (Cluis 2004). U ovom ispitivanju utvrđena je TF vrijednost za jablan od

2,60 pri masenom udjelu kadmija od 10 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla, pri masenom udjelu kadmija od 25 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla TF vrijednost iznosi 0,63, dok pri masenom udjelu kadmija od 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla TF vrijednost je najmanja i iznosi 0,59 (slika 3). Dobiveni rezultati pokazuju da biljka jablana (*Populus nigra* var. *italica*) ima sposobnost translokacije te da se ta sposobnost smanjuje s povećanjem količine kadmija u tlu na kojem biljka raste. Veoma niska vrijednost translokacijskog faktora za biljku jablana koja je rasla na tlu s masenim udjelom kadmija 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla ukazuje da prevelika količina kadmija u tlu, pa tako i u biljci može inhibirati sustave koji su zaslužni za translokaciju kadmija iz korijena u ostale dijelove biljke (Lux i sur. 2010). Uzevši u obzir utjecaj različitog masenog udjela kadmija na rast biljaka te određene bioakumulacijske i translokacijske faktore dobiveni podaci upućuju na to da ispitivana vrsta jablana (*Populus nigra* var. *italica*) ima određene karakteristike biljaka koje bi se mogle razmatrati za fitoekstrakciju onečišćenih tala kadmijem. Sama fitoremedijacija najviše ovisi o visokim masenim udjelima metala u biljnoj biomasi i produkciji relativno velike količine biomase, upravo zbog toga drveće ima veliki potencijal (Gu i sur. 2007). Određene BF vrijednosti ukazuju na povećane akumulacijske sposobnosti ispitivane vrste jablana pri masenim udjelima kadmija (do 25 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla). Određene TF vrijednosti ukazuju

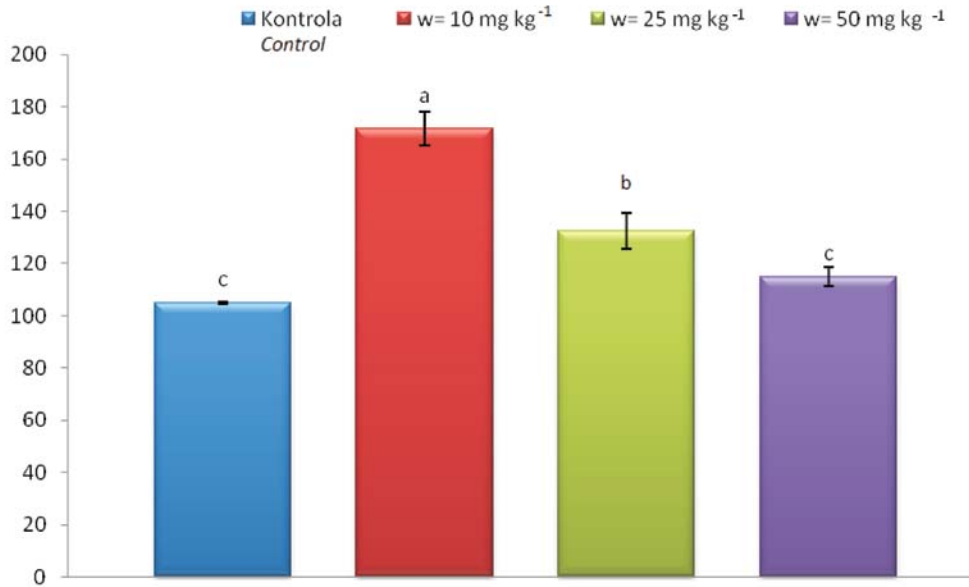


**Slika 3.** Vrijednosti translokacijskog faktora (TF) za jablan (*Populus nigra* var. *italica*) nakon 55 dnevnog uzgoja u tlu s različitim masenim udjelima kadmija ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  s.t. tla)

\* rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=5$ ), vrijednosti sa istim slovom (a-b) statistički se ne razlikuju ( $P < 0,05$ ) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

**Figure 3.** Translocation factor (TF) of cadmium in poplar (*Populus nigra* var. *italica*) treated for 55 day with different cadmium concentrations ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  dw of soil)

\*Mean values ( $n = 5$ )  $\pm$  SD in each column followed by non-identical letters (a-c) indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) in comper to control plants as determined by Tukey's HSD test

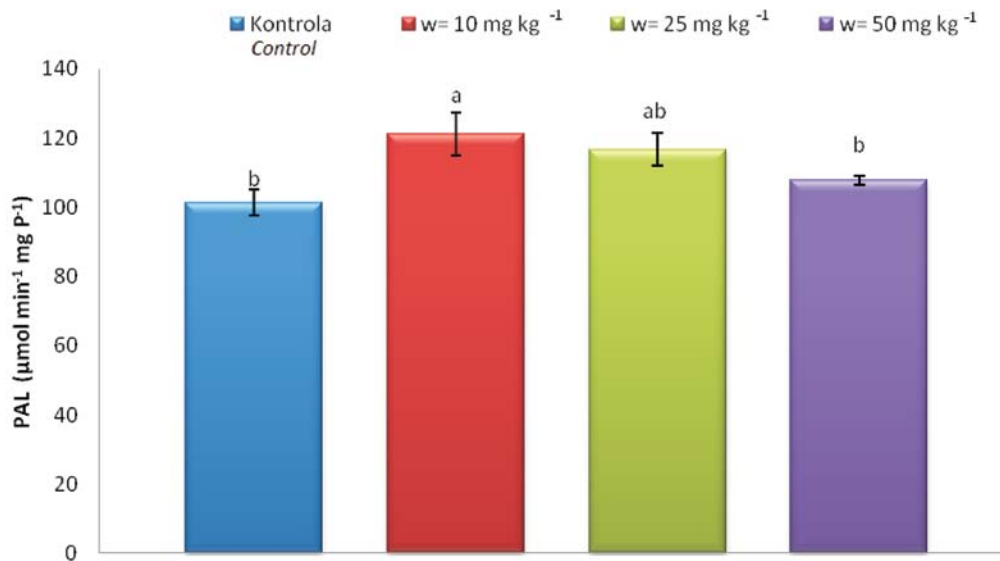


**Slika 4.** Maseni udio ukupnih polifenola u listova jablana (*Populus nigra* var. *italica*) nakon 55 dnevnog uzgoja pri različitim masenim udjelima kadmija u tlu ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe tvari tla)

\* rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ), vrijednosti sa istim slovom (a-b) statistički se ne razlikuju ( $P < 0,05$ ) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

**Figure 4** Total polyphenol content in poplar (*Populus nigra* var. *italica*) leaves treated for 55 day with different cadmium concentrations ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  dw of soil)

\* results as mean value  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ), values with same letter (a-b) not statistically different ( $P < 0.05$ ) tested with post hoc Turkey's HSD test



**Slika 5.** Aktivnost fenilalanin-amonijevlje lijaze (PAL) u ekstraktu listova jablana (*Populus nigra* var. *italica*) nakon 55 dnevnog uzgoja pri različitim masenim udjelima kadmija u tlu ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  s.t. tla)

\* rezultati su srednja vrijednost  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ), vrijednosti sa istim slovom (a-b) statistički se ne razlikuju ( $P < 0,05$ ) kako je izmjereno post hoc Turkey's HSD testom

**Figure 5** Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) activity in poplar (*Populus nigra* var. *italica*) leaves treated for 55 day with different cadmium concentrations ( $w = 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  dw of soil)

\* results as mean value  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ), values with same letter (a-b) not statistically different ( $P < 0.05$ ) tested with post hoc Turkey's HSD test

na određenu toleranciju na prisutnost kadmija u tlu do masenog udjela od 10 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla.

Kako bi se utvrdila potencijalna uloga polifenolnih spojeva, u odgovoru biljke na stres uzrokovane akumulacijom različitih udjela kadmija analiziran je ukupan maseni udio polifenola te aktivnost enzima fenilalanin-amonijeve lijaze (PAL) u ekstraktima listova jablana nakon 55 dnevnog uzgoja. Iz dobivenih vrijednosti za ukupan maseni udio polifenola (slika 4) uočeno je statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) masenog udjela ukupnih polifenola kod masenog udjela kadmija od 10 mg kg<sup>-1</sup> i 25 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla, dok pri masenom udjelu od 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.

Izmjerene vrijednosti za aktivnost enzima PAL prikazanih na slici 5 ukazuju na statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) pri masenom udjelu kadmija od 10 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla u odnosu na kontrolu, dok pri masenim udjelima kadmija od 25 mg kg<sup>-1</sup> i 50 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla nije uočena statistička značajna razlika.

Povećanje masenog udjela polifenola povezano je s povećanjem aktivnosti enzima koji su uključeni u metabolizam polifenolnih spojeva, čime dolazi do *de novo* sinteze polifenola uslijed izloženosti biljke stresu uzrokovanim teškim metalima. Povećanje masenog udjela topljivih polifenola kao što su intermedijari u biosinezi lignina tijekom stresa može se odraziti na tipične promjene u anatomiji stanice kao što su: povećanje izdržljivosti stanične membrane te stvaranje fizičkih barijera, čime se stanica štiti od toksičnih učinaka teških metala. Također, kod povećanog masenog udjela polifenola dolazi do uspješnog keliranja s teškim metalima, čime se ističe njihovo antioksidativno djelovanje. Povećani udio polifenola, nakon izloženosti teškim metalima koji je uočen u našem radu, zabilježen je i kod drugih biljnih vrsta kao što su *Triticum aestivum*, *Phaseolus vulgaris* i *Phyllanthus tenellus* (Diáz i sur. 2001, Michalak 2006, Kováčik i sur. 2008). Tako je u radu Diáz i sur. (2001) istraživ utjecaj kadmija na biljku *Phyllanthus tenellus* te je dokazano da on utječe na povećanu akumulaciju topljivih i netopljivih polifenola. Povećanje masenog udjela polifenola u biljci izloženoj teškim metalima povezano je s povećanjem aktivnosti enzima uključenih u biosintezu polifenola, iz čega proizlazi da teški metali utječu na *de novo* sintezu fenolnih sastojaka. Nadalje, Kováčik i sur. (2008) ispitivali su utjecaj kadmija na enzim PAL u listu i korijenu biljke *Matricaria chamomilla* kroz 7 dana. Njihovi rezultati pokazuju da je aktivnost PAL u listu povećana kod svih koncentracija kadmija (3 μM, 60 μM i 120 μM) dok je u korijenu povećana samo kod visokih koncentracija kadmija (60 μM i 120 μM). Zaključak njihove studije je da je biljka *Matricaria chamomilla* rezistentna na visoke koncentracije kadmija te da PAL i polifenoli imaju važnu ulogu u detoksifikaciji oksidativnog stresa uzrokovanim kadmijem (Kováčik i sur. 2008).

## ZAKLJUČAK CONCLUSION

Ispitivani jablan (*Populus nigra* var. *italica*) je biljka koja dobro uspijeva u našem podneblju te često služi kao ukrasna biljka u parkovima i drvoredima. Ovim istraživanjem dokazana je njezina tolerancija na kadmij te mogućnost uspješne primjene u fitoremedijaciji. Određene vrijednosti za bioakumulacijski faktor i za traslokacijski faktor skupno ukazuju da ispitivani jablan može biti razmatrana kao vrsta s potencijalom za fitoekstrakciju tala onečišćenih kadmijem do masenog udjela kadmija od 10 mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari tla. Nadalje, uočen povećani maseni udio polifenola koji je povezan s povećanjem aktivnosti fenilalanin-amonijeve lijaze (PAL) upućuju na *de novo* sintezu polifenola uslijed izloženosti biljke stresu uzrokovanim kadmijem.

Budući da u Republici Hrvatskoj postoje područja koja se klasificiraju kao kritična s obzirom na sadržaj kadmija, dobiveni rezultati mogli bi poslužiti kao dobra informacija u budućim planiranjima čišćenja takvih područja. Također bitno je spomenuti da u Republici Hrvatskoj još uvijek postoji velik broj nerazminiranih ali i razminiranih područja. Velik dio tih područja su poljoprivredne površine za koja uslijed aktivnosti razminiravanja postoji realna opasnost za povećanu koncentraciju teških metala u tlu. U svrhu iskorištavanja gospodarskog potencijala takvih područja, a ujedno i zaštite zdravlja ljudi i životinja, fitoremedijacija može predstavljati tehnologiju od velikog značenja, pa je stoga i ispitivanje autohtonih biljnih vrsta sa sposobnošću fitoakumulacije izuzetno važno.

## LITERATURA REFERENCES

- Ali, H., E., Khanb, M. A., Sajadc, 2013: Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869–881.
- Ambriović Ristov, A., A. Brozović, B. Bruvo Madarić, H. Cetković, M. Herak Bosnar, D. Hranilović, S. Katusić Hecimović, N. Mestrović Radan, S. Mihaljevic, N. Slade, D. Vujaklija, 2007: Metode u molekularnoj biologiji, Institut Ruđer Bošković, 1021 str., Zagreb.
- Alloway, B. J., 1995: Heavy Metals in Soils, Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman & Hall, 368 str., London.
- Balasundram, N., K. Sundram, S. Samman, 2006: Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.*, 99: 191–203.
- Benavides, M. P., S. M. Gallego, M. L. Tomaro, 2005: Cadmium toxicity in plants, *Braz. J. Plant. Physiol.*, 17: 21–34.
- Capuana, M., 2011: Heavy metals and woody plants – Biotechnologies for phytoremediation, *iForest*, 4: 7–15.
- Cluis, C., 2004: Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination, *BioTech. J.*, 2: 60–67.



- Diáz, J., A. Bernal, F. Po Mar, F. Merino, 2001: Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification, *Plant Sci.*, 161: 179.
- Gill, S. S., N. Tuteja, 2010: Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol. Bioch.*, 28: 909–930.
- Gu, J., Q. Liwang, J. Wusheng, L. Donghua, 2007: Cadmium accumulation and its effects on growth and gas exchange in four *Populus* cultivars, *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 49: 7–14.
- ISO 11047, 1998: Soil quality – Determination of Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni and Zn.
- Kováčik, J., M. Bačkor, J. Kaduková, 2008: Physiological responses of *Matricaria chamomilla* to cadmium and copper excess, *Environ. Toxicol.*, 23: 123–30.
- Lasat, M. M., 2002: Phytoextraction of toxic metals – a review of biological mechanisms, *J. Environ. Qual.*, 31: 109–120.
- Lin, T., X. Zhu, F. Zhang, X. Wan, 2011: The detoxification effect of nitrogen on cadmium stress in *Populus yunnanensis*, *Bot. Res. J.*, 4: 13–19.
- Lux, A., M. Martinka, M. Vaculik, P.J. White, 2010: Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review, *J. Exp. Bot.*, 62: 21–37.
- Michalak, A., 2006: Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress, *Pol. J. Environ. Stud.*, 15: 523–530.
- Nikolić, N., D. Kojić, A. Pilipović, S. Pajević, B. Krstić, M. Borišev, S. Orlović, 2008: Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation and antioxidant enzyme activity, *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 80: 95–103.
- Pajević, S., M. Borišev, N. Nikolić, B. Krstić, A. Polipović, S. Orlović, 2009: Phyto remediation capacity of poplar (*Populus spp.*) and willow (*Salix spp.*) clones in relation to photosynthesis, *Arch. Biol. Sci.*, 61: 239–247.
- Pietrini, F., M. Zacchini, V. Iori, L. Pietrosanti, D. Bianconi, A. Massacci, 2010: Screening of Poplar clones for cadmium phytoremediation using photosynthesis, biomass and cadmium content analyses, *Int. J. Phytoremediat.*, 12: 105–120.
- Pulford, I. D., C. Watson, 2003: Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review, *Environ. Int.*, 29: 529–540.
- Ravi, I., V. Sharma, 2008: Defense response of moth bean (*Phaseolus aconitifolius*) to *Macrophomina phaseolina*: role of polyphenols PAL and  $\beta$ -1,3-glucanase, U: Recent advances in plant biotechnology and its applications (ur. A. Kumar, S. K. Sopory), I.K International, str. 452–465 str., New Delhi.
- Sakkihama, Y., H. Yamasaki, 2002: Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminium ions, *Biol. Plantarum*, 45: 249.
- Sebastiani, L., F. Scebba, R. Tognetti, 2004: Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*P. x euramericana*) exposed to industrial waste, *Environ. Exp. Bot.*, 52: 79–88.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, 1999: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.*, 299: 152–178.
- Shukla, O. P., A. A. Juwarkar, S. K. Singh, S. Khan, U. N. Rai, 2011: Growth responses and metal accumulation capabilities of woody plants during the phytoremediation of tannery sludge, *Waste Manage.*, 31: 115–123.
- Vogt, T., 2010: Phenylpropanoid Biosynthesis, *Mol. Plant*, 3: 2–20.
- Wu, F., W. Yang, J. Zhang, L. Zhou, 2010: Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoides x Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil, *J Hazard Mater* 177: 268–273.
- Yang, X., Y. Feng, Z. He, P. J. Stoffela, 2005: Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18: 339–353.

## Summary

phyto remediation is considered a promising, inexpensive and aesthetically acceptable, in situ technology to remediate heavy metals from contaminated soils. The potential use of trees in the phytoremediation of soil has been recognized in the past decades. Thus, the potential of poplar (*Populus nigra* var. *italica*) in phytoremediation of cadmium (Cd) was investigated. Aims of this study were to explore the cadmium phytoextraction ability of poplar, the accumulation and distribution of cadmium in different plant parts (leaf, stem, root), the potential role of polyphenolic compounds and the activity of enzyme phenylalanine-ammonium liase (PAL) in response to plant stress caused by the accumulation of different cadmium amounts. During 55 days long growing period soil was treated with different amount of cadmium ( $w= 10, 25, 50 \text{ mg kg}^{-1}$  soil). The accumulation of cadmium and the distribution in different parts of poplar (leaf, stem, root) were explored (Figure 1). Total cadmium accumulation in plant biomass increased with the increase in cadmium concentration in soil. Cadmium distribution in poplar decreased in the order: root > stem > leaf. In order to evaluate phytoextraction ability of poplar, the bioaccumulation factor (BF) and the translocation factor (TF) were calculated (Figure 2 and 3). Certain BF values indicate increased accumulation ability of poplar up to  $25 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  soil (Figure 2). TF values indicate specific tolerance for cadmium concentration up to  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  soil (Figure 3). Further, in order to evaluate potential of polyphenolic compounds in plant response to stress caused by exposure to different concentration of cadmium, total polyphenol content in poplar leaves

was analysed as well as activity of antioxidant enzyme phenylalanine-ammonium liase (PAL). Total polyphenol content in poplar treated with 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> soil and 25 mg Cd kg<sup>-1</sup> soil increased compared to the control (Figure 4). Furthermore, phenylalanine-ammonium liase (PAL) activity increased only in poplar treated with 10 mg Cd kg<sup>-1</sup> soil compared to the control (Figure 5). Observed higher total polyphenol content is connected with increased phenylalanine-ammonium liase (PAL) activity and de novo polyphenol synthesis in plant during the stress caused by exposure to cadmium. Results indicate that the tested poplar (*Populus nigra* var. *italica*) can be considered as a species with potential for phytoextraction of cadmium from polluted soil. Furthermore, antioxidant enzymes and polyphenolic compounds in poplar have the important role in the defence from oxidative stress caused by exposure to cadmium.

---

**KEY WORDS:** phytoremediation, poplar, cadmium, polyphenolic compounds, enzyme phenylalanine-ammonium liase