

AKTIVNOST ENZIMA KATALAZE I SADRŽAJ ORGANSKIH KISELINA KOD HAJDUČKE TRAVE (*Achillea millefolium*) SA SANIRANE DEPONIJE „ŽITKOVAC“ RUDARSKO METALURŠKO HEMIJSKOG KOMBINATA „TREPČA“

Mirjana Smiljić¹, Tatjana Jakšić¹, Nebojša Živić¹, Olivera Papović¹,
Predrag Vasić¹, Marija Marković², Vesna Stankov-Jovanović², Marija Ilić²,
Slaviša Stamenković²

Izvod: U ovom komparativnom istraživanju određeni su aktivnost enzima katalaze i ukupan sadržaj organskih kiselina u podzemnim i nadzemnim delovima lekovite biljke hajdučka trava (*Achillea millefolium*) sa sanirane deponije „Žitkovac“ Rudarsko Metalurško Hemijskog Kombinata „Trepča“ i nezagađenog područja okoline Niša. Aktivnost katalaze je izmerena korišćenjem gasometrijske metode i izražena u ml kiseonika. Sadržaj organskih kiselina u biljnom materijalu određen je modifikovanom metodom titracije u prisustvu indikatora. Uvećanje aktivnosti enzima katalaze kod uzoraka na deponiji u poređenju sa nezagađenim staništem je rezultat stresa uzrokovan hemijskim promenama u zemljištu i predstavlja metabolički vid razgradnje štetnih jedinjenja, odnosno detoksikacije, koja spada u kvalitetne mehanizme sticanja otpornosti, kao odgovor na izmenjene uslove u životnoj sredini. Povećan sadržaj organskih kiselina u uzorcima sa deponije je efikasan mehanizam, koji smanjuje unos teških metala u biljku vezujući se za njih u komplekse i omogućava rast biljke pri visokom nivou kontaminacije.

Ključne reči: *Achillea millefolium*, Trepča, deponija, katalaza, organske kiseline

Uvod

U relativno bliskoj prošlosti kao regiju izrazito narušenih ekoloških prilika mnogi autori su isticali kosovsko-metohijski basen obeležen kompleksnim uticajima zagađenja metalurškog giganta "Trepča". Rudarsko Metalurško Hemijski Kombinat „Trepča“ na severu Kosova sa svim postojećim činiocima opterećenja i narušavanja životne sredine bio je istraživan od strane većeg broja naučnika (Trajković, 1995; Trajković et al., 1998; Milentijević et al., 2016) koji su ga prikazali kao izrazitog zagađivača životne sredine.

Milentijević i sar. (2016) su proučavali uticaj pet jalovišta, odnosno deponija na životnu sredinu na severu Kosova i Metohije. Prema njihovim rezultatima sanirana deponija "Žitkovac" je najproblematičnija u smislu uticaja na životnu sredinu. To je razlog zašto smo odabrali ovu oblast za naše istraživanje.

Biljke koje rastu u kontaminiranim područjima imaju kapacitete za adaptaciju na ekstremnim uslovima okoline kroz promene u fiziologiji, anatomiji i morfologiji. Biohemijsko-fiziološke promene javljaju se pre pojave morfoloških i prvi su indikatori

¹Univerzitet u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici, Prirodno-matematički fakultet, Ive Lole Ribara 29, Kosovska Mitrovica, Srbija
(mirjana.smiljic@gmail.com);

²Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Višegradska 33, Niš, Srbija

prisustva toksina u životnoj sredini. Ogledaju se u povećanju koncentracije određenih biohemijskih parametara, npr. enzima, nekih amino-kiselina, organskih kiselina i dr. Proučavanje ovih mehanizama prilagođavanja bi omogućila adekvatnu procenu vrsta koje potencijalno mogu da se koriste za bioremedijaciju.

U ovom radu ispitivane su fiziološko-biohemijske promene kod biljke *Achillea millefolium* poređenjem sadržaja enzima katalaze i organskih kiselina sa deponije RMHK “Trepča” i sa nezagađenog područja iz okoline Niša.

Materijal i metode rada

Biljni materijal je sakupljen u jesen (27. Septembar 2016) sa deponije „Žitkovac“ RMHK „Trepča“. Kontrolni uzorci su sakupljeni u istom periodu sa nezagađenog područja u okolini Niša. Uzorci biljaka su čuvani u zamrzivaču do analize. Uzorak analizirane biljke je deponovan u herbarijumu Prirodno-matematičkog fakuleta, Univerziteta u Nišu (HMN) - vaučer broj 12514. Kao materijal korišćeni su nadzemni i podzemni delovi biljke.

Aktivnost enzima katalaze određena je gasometrijskom metodom (Мошова, 1982.). Ova metoda se zasniva na određivanju količine oslobođenog kiseonika posle delovanja H_2O_2 koji je dodavan biljnom ekstraktu koji sadrži katalazu. Najpre je odmereno 0,5-1g biljnog materijala. Zatim je material ekstrahovan u avanu sa 0,5g $CaCO_3$ da bi se postigla $pH=7,7$ koja je optimalna za dejstvo enzima i 20 ml destilovane vode koja je dodavana postepeno. Nakon toga je ekstrakt prenešen u erlenmajer sa bočnim odvodom i pomoću aparature odmerena aktivnost enzima katalaze. Erlenmajer je zapušten zapušačem kroz koji je probodena igla sa špricom. Špric sadrži 5ml 3% H_2O_2 . Na početku ogleada u erlenmajer je ubrizgan H_2O_2 . Sadržaj je jedan minut mućkan, pa je sačekano jedan minut, a zatim je opet jedan minut mućkan. Nakon ovog vremena od tri minuta na skali birete je očitana količina oslobođenog kiseonika. Svaka analiza ponavljena je tri puta i izračunata je srednja vrednost. Rezultati su predstavljeni grafički. Aktivnost enzima katalaze je izražena u cm^3/lg ($ml O_2/g$ svežeg biljnog materijala).

Organske kiseline u biljnom materijalu određene su modifikovanom metodom titracije u prisustvu indikatora (Плешков, 1985). Organske kiseline ekstrahovane su iz biljnog materijala zagrevanjem sa vodom na temperaturi od $75^\circ C$, 60 minuta u vodenom kupatilu. 10gr biljnog materijala ekstrahovano je u avanu sa 100ml destilovane vode. Ekstrakt je bez gubitka prenet u erlenmajer od 100ml i ostavljen u vodeno kupatilo na tempetaturi $75^\circ C$, 60 minuta. Nakon toga, erlenmajer je brzo ohlađen tekućom vodom. Sadržaj je filtriran u normalni sud od 100ml koji je potom dopunjen destilovanom vodom do crte. 50ml filtrata preneto je u čašu i vršena je titracija 0,1N NaOH uz pomoć pH-metra dok se vrednost na pH-metru nije izjednačila sa brojkom 8,5, zbog toga što organske kiseline spadaju u slabe kiseline, za razliku od jakih kiselina koje se titruju do neutralne sredine ($pH=7$). Opšta kiselost izračunavana je formulom:

$$x = [(c(NaOH) \cdot V(NaOH)) \cdot (100/50)] / 10, \text{ gde je:}$$

x - količina kiselina u ispitivanom rastvoru izražena u mekV/lgr sveže težine,

c(NaOH) – koncentracija rastvora NaOH (mol/dm^3),

V(NaOH) – zapremina standardnog rastvora NaOH utrošenog za titraciju (ml),

100 - opšta zapremina ekstrakta (ml),

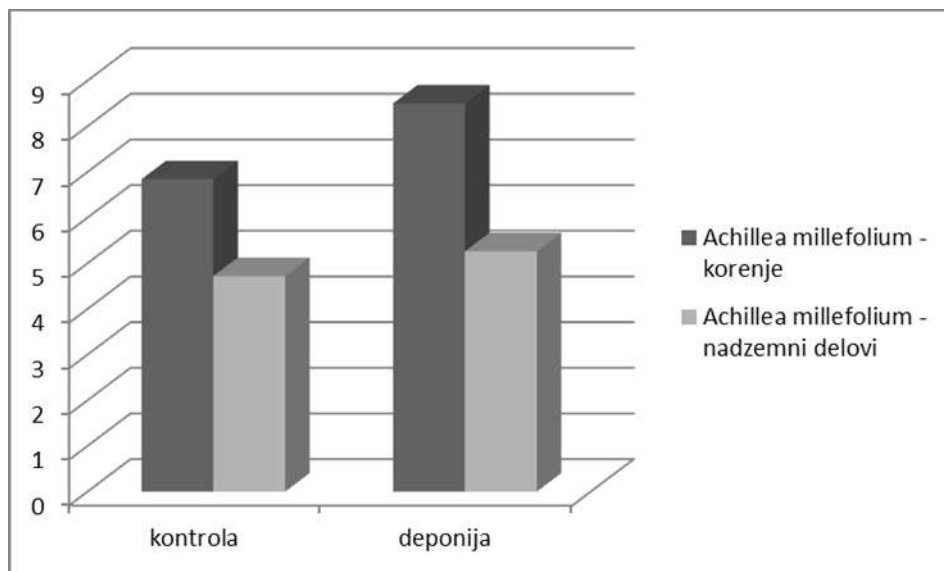
50 - količina filtrata upotrebljenog za titraciju,

10 - količina biljnog materijala upotrebljenog za ekstrakciju (gr).

Rezultati istraživanja i diskusija

Zagađivači mogu delovati na enzime izrazito inhibitorno i to neposredno ili posredno preko fizioloških biohemijskih procesa, i u smislu aktivacije enzima koji će katalizovati njihovu razgradnju. Enzim katalaza kao odgovor na prisustvo zagađivača uklanja slobodne radikale povećane u stresnim uslovima.

Supstrat na koj deluju ovi enzimi je vodonik-peroksid, na šta ukazuje i podatak da njihovo prisustvo u medijumu podstiče i povećanje aktivnosti ovih enzima – supstratna indukcija (Jablanović et al., 1985; Trajković, 1995; Trajković i Ilić, 2004).



Graf. 1. Aktivnost enzima katalaze (ml O₂/g svežeg biljnog materijala) u podzemnim i nadzemnim delovima vrste *Achillea millefolium*

Graph. 1. Activity of enzyme catalase (ml O₂/g of fresh plant material) in underground and above-ground plant parts of the species *Achillea millefolium*

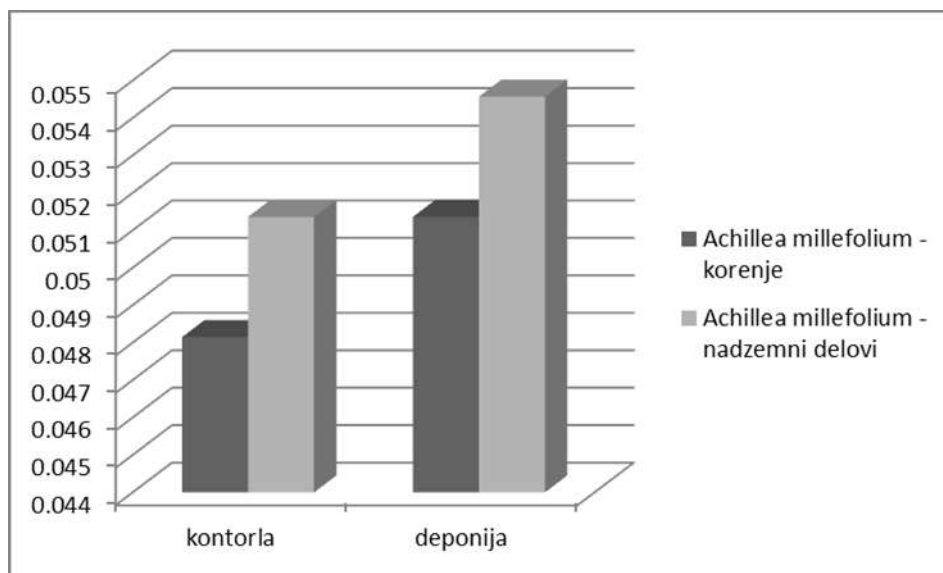
Vodonik-peroksid nastaje u toku različitih procesa metabolizma kao redukovani oblik kiseonika i može izazvati niz metaboličkih promena u biljnim tkivima. Zbog velike toksičnosti za žive ćelije neophodno je njegovo uklanjanje ili degradacija. Iz tog razloga, on se razara aktivnošću enzima katalaze do produkata koji nisu opasni za biljke: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Aktivnost enzima katalaze je izmerena u podzemnim i nadzemnim biljnim delovima sa deponije i nezagađenog područja, koje je predstavljalo kontrolnu grupu uzoraka. Rezultati, koji su dati na Grafikonu 1, pokazuju da je aktivnost katalaze povećana u podzemnim i nadzemnim delovima eksperimentalnih uzoraka sa deponije, u poređenju sa kontrolnim uzorcima sa nezagađenih staništa. Ovi nalazi su u saglasnosti sa činjenicom da zemljište, na kome je deponovana jalovina, može da bude veliki izvor zagađenja, koji je uzrokovan hemijskim promenama u sastavu supstrata.

Organske kiseline su sekundarni metaboliti, proizvedeni degradacijom ugljenih hidrata, masti i proteina i uglavnom uključuju oksalnu, mravlju, limunsku, fumarnu, jabučnu, ćilibarnu, sirćetnu i fosforu kiselinu kao i mnoge druge koji nastanu u manjem iznosu (Rivasseau et al., 2006.).

Biohemijska funkcija organskih kiselina zavisi od različitih ekoloških uslova. Oni su donori protona u nekim reakcijama oksido-redukcije, na primer preobražaj jabučne u oksalatnu kiselinu. Neke ranije studije su pokazale da sadržaj organskih kiselina u biljkama zavisi od disanja, transpiracije kao i različitih biohemijskih procesa u biljkama (Gašić, 1992).

Uzorci hajdučke trave sa deponije imaju veći sadržaj organskih kiselina u podzemnim i u nadzemnim delovima u odnosu na kontrolne uzorke (Grafikon 2), što je u skladu sa rezultatima do kojih su došli Trajković i sar. (2007.). Ova biljna vrsta pripada grupi biljaka otpornih na zagađenje teškim metalima i ubrzava sintezu organskih kiselina koje vezuju teške metale i stvaraju helatne komplekse, koji nisu toksični za biljku (Trajković, 1995.).



Graf. 2. Sadržaj organskih kiselina (mekv/g svežeg biljnog materijala) u podzemnim i nadzemnim delovima vrste *Achillea millefolium*

Graph. 2. Content of organic acids (mekv/g of fresh plant material) in underground and above-ground plant parts of the species *Achillea millefolium*

Zaključak

Uvećana aktivnost katalaze kod hajdučke trave predstavlja metabolički vid detoksikacije, koji spada u kvalitetne mehanizme sticanja otpornosti, a što je uzrok zagađene sredine u kojoj se biljka nalazi.

Povećan sadržaj organskih kiselina u nadzemnim i podzemnim organima ispitanih uzoraka biljke zavisi od anatomsko-morfoloških osobina kao i hemijskog sastava vrste, što je genetički predodređeno. Takođe zavisi i od koncentracije i vrste zagađujućih materija, kao i od dužine vegetiranja biljke u zagađenoj sredini. Koren ima zaštitnu ulogu, a povećan sadržaj organskih kiselina u njemu vezuje teške metale u komplekse koji nisu toksični za biljke.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta OI 171025, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Za saradnju i usmeravanje pri izboru metoda za ovaj rad dugujemo zahvalnost prof. dr Radmili Trajković, redovnom profesoru Prirodno matematičkog fakulteta u Prištini sa privremnim sedištem u Kosovskoj Mitrovici.

Literatura

- Gašić O. (1992). Biohemija biljaka, Beograd, SFRJ: Naučna knjiga.
- Jablanović M., Hoxa Y., Abdullahi K., Filipović R. (1985). Catalase Activity in the Plants Exposed to Contamination with Heavy Metals. *Acta Biol Med Exp*, Vol. 10, 21.
- Milentijević G., Nedeljković B., Lekić M., Nikić Z., Ristović I., Djokić J. (2016). Application of a Method for Intelligent Multi-Criteria, Analysis of the Environmental Impact of Tailing Ponds in Northern Kosovo and Metohija, *Energies* 9, 935.
- Мошева Л. В. (1982). Определение активности каталазы объектов, Практикум по физиологии растений (Ред. Грелкова Н.Н.) 134, Москва, СССР: Каос.
- Плешков Б. П. (1985). Практикум по биохемии растений, Москва, СССР: Издательство „Колос“
- Rivasseau C., Boisson A., Mongélard G., Couram G., Bastien O., Bligny R. (2006). Rapid analysis of organic acids in plant extracts by capillary electrophoresis with indirect UV detection Directed metabolic analyses during metal stress, *Journal of Chromatography A*, 1129: 283-290.
- Trajković R. (1995). Uticaj zagađivača vazduha na neke biohemijske i fiziološke parametre kod biljaka u industrijskim zonama Kosovske Mitrovice i Obilića, Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Prištini, Priština.
- Trajković R., Jablanović M., Ilić Z. (1998). Examination of some biochemical parameters in vegetable species grown in the surroundings of Kosovska Mitrovica Objavljeno u *Proceeding of 2nd Balcan Symposium on Field crops. Ecology & Physiology, Cultural Practices, Volume 2*, Stamenković S. S. (ed.) 173-177. Novi Sad, Yugoslavia: Institute of Field and Vegetable Crops.
- Trajković R., Ilić Z. (2004). Uticaj navodnjavanja otpadnim vodama na sadržaj enzima katalaze u različitim tkivima povrtarskih vrsta. Objavljeno u *Zbornik saopštenja sa Naučno-stručnog savjetovanja agronoma Republike Srpske sa međunarodnim učesćem. „Proizvodnja hrane u uslovima otvorenog tržišta“*, 109. Teslić, Republika Srpska: Poljoprivredni fakultet Banja Luka, Poljoprivredni institut i Društvo agronoma Republike Srpske.

Trajković R., Nešić M., Blagojević N. (2007). Uticaj aerozagađenja na sadržaj ukupnih organskih kiselina lekovitih biljaka borskog regiona. Objavljeno u *Proceeding of 9th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions*, Randelović V. (ed.) 145-151. Niš, Serbia: Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Niš and Biological Society „Dr Sava Petrović, Niš.

ACTIVITY OF ENZYME CATALASE AND CONTENT OF ORGANIC ACIDS IN MILFOIL (*Achillea millefolium*) ON TAILING POND „ŽITKOVAC“ OF MINING AND METALLURGICAL CHEMICAL COMPANY „TREPČA“

Mirjana Smiljić¹, Tatjana Jakšić¹, Nebojša Živić¹, Olivera Papović¹, Predrag Vasić¹, Marija Marković², Vesna Stankov-Jovanović², Marija Ilić², Slaviša Stamenković²

Abstract

In this comparative study, the activity of enzyme catalase and total content of organic acids were determined in underground and above-ground plant parts of medicinal plant *Achillea millefolium* from tailing pond “Žitkovac” of Mining and Metallurgical Chemical Company „Trepča“ and from uncontaminated area near city of Niš. Catalase activity was measured using the gasometric method and the values obtained for this activity were expressed as ml of O₂. The content of organic acids in the plant material was determined by modified titration method in the presence of indicator. An increased catalase activity on tailing pond, in comparison with uncontaminated habitat, is a result of stress that is caused by chemical changes in the soil on tailing pond representing good metabolic ways of detoxification, which belongs to the mechanisms of defence and acquiring resistance. An increased content of organic acids in samples on tailing pond is an efficient mechanism reducing the heavy metal uptake, binding them to complexes and allowing the plant growth at high level of contamination.

Key words: *Achillea millefolium*, “Trepča“, tailing pond, catalase, organic acids

¹University of Priština temporarily settled in Kosovska Mitrovica, Faculty of Science and Mathematics, Ive Lole Ribara 29, Kosovska Mitrovica, Serbia (mirjana.smiljic@gmail.com);

²University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Višegradska 33, Niš, Serbia