

SADRŽAJ PIGMENATA HLOROPLASTA U LEKOVITOJ BILJCI *Teucrium chamaedrys* SA SANIRANE DEPONIJE RUDARSKO METALURŠKO HEMIJSKOG KOMBINATA “TREPČA”

Mirjana Smiljić¹, Vesna Stankov-Jovanović², Slobodan Ćirić²,
Nikola Stamenković², Marija Ilić², Tatjana Jakšić¹, Nebojša Živić¹,
Slaviša Stamenković², Marija Marković²

Izvod: U ovom radu upoređen je sadržaj pigmenata hloroplasta (hlorofil a, b, a+b, karotenoidi) iz listova lekovite biljne vrste podubica - *Teucrium chamaedrys* sa deponije „Žitkovac“ Rudarsko Metalurško Hemijskog Kombinata „Trepča“ i nezagađenog područja okoline Niša. Pigmenti hloroplasta su određeni spektrofotometrijski u acetonskim ekstraktima eksperimentalnih i kontrolnih uzoraka biljaka. Sadržaj hlorofila a, a+b i odnos a/b je bio veći kod u uzorcima listova sa deponije u poređenju sa kontrolnim uzorcima sa nezagađenog staništa iz okoline Niša. Kao odgovor na stresne uslove uzrokovane zagađenjem i punim intenzitetom sunčeve svetlosti zabeležen je i povećan sadržaj karotenoida kod uzoraka listova sa deponije, što obezbeđuje zaštitu hlorofila od fotooksidacije odnosno štetnog dejstva ultravioletnog zračenja.

Gljučne reči: *Teucrium chamaedrys*, deponija, pigmenti hloroplasta, hlorofil, karotenoidi

Uvod

Industrijski kompleks u Kosovskoj Mitrovici i Topionica u Zvečanu su dva najveća zagađivača životne okoline u urbanim područjima severnog dela Kosova i Metohije (Vasković, 2016.). Tehnološki proces eksploatacije i obrade rude u RMHK „Trepča“ je praćen velikom količinom industrijskog otpada, koji je odlagan na deponije koje formiraju jalovišta, bez odgovarajućeg sistema za praćenje uticaja na okolne ekosisteme. Na taj način je uzrokovao enormno zagađenje lokalnih područja, uključujući vodene tokove, vazduh i poljoprivredno zemljište. Jedan od tih lokaliteta je sanirana deponija „Žitkovac“, koja predstavlja naše područje istraživanja.

Hemijski sastav industrijskog otpada na deponiji „Žitkovac“, prema Milentijević i sar. (2010.) je sledeći: S - 8,2%, Fe₁₁S₁₂ - 31,4%, As - 8,2%, Mn - 7%, FeS₂ - 0,85%, Fe - 22%, Zn - 1,62%, ZnO_x - 0,057%, Pb - 0,48% and PbO_x - 0,105%.

Biljke koje rastu na kontaminiranim područjima imaju sposobnost da se adaptiraju na ekstremne uslove staništa, što uključuje promene u njihovoj anatomiji i fiziologiji (Jakšić et al., 2017).

Biljni pigmenti spadaju u najvažnije organske molekule, jer su neophodni za proces fotosinteze. Najvažniji od pigmenata su hlorofili, čija je koncentracija sa fiziološke

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

tačke gledišta značajna iz više razloga. Koncentracija hlorofila zavisi od jačine sunčevog zračenja koje apsorbuje list, a ona utiče na fotosintetski potencijal, a samim tim i na primarnu produkciju (Blackburn., 2007). Karotenoidi su druga velika grupa pigmenata, koju čine karoteni i ksantofili. Karotenoidi apsorbuju zračenje i doprinose energiji fotosinteze, jer su neophodna strukturalna komponenta fotosintetske antene i kompleksa reakcionog centra (Bartley and Scolnic., 1995). Količina hlorofila generalno se smanjuje pod uticajem stresa, a odnos hlorofila a i b se menja sa promenom abiotičkih faktora u koje spada intenzitet svetlosti (Fang et al., 1998). Merenje ukupnog hlorofila, kao i hlorofila a i hlorofila b posebno može da pruži korisne uvide u interakcije biljaka i njihove okoline (Richardson et al., 2002). Dok promena količine hlorofila ukazuje na stres i fenološke stadijume, koncentracija karotenoida pruža dodatne informacije o fiziološkom statusu vegetacije (Young et al., 1990).

Na osnovu iznetih činjenica, u fokusu našeg istraživanja je ispitivanje fizioloških promena kod lekovite biljke *Teucrium chamaedrys* koja uspeva na deponiji RMHK „Trepča“, poređenjem kvantitativnog sadržaja pigmenata hloroplasta i njihovog odnosa sa sadržajem istih u uzorcima sa nezagađenog područja.

Materijal i metode rada

Biljni materijal je sakupljen u jesen (27. septembar 2016) sa deponije „Žitkovac“ RMHK „Trepča“. Kontrolni uzorci su sakupljeni u isto vreme 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.

Za analizu se uzimaju reprezentativni uzorci listova..Listovi se sitno iseckaju i na analitičkoj vagi odmeri tačno 0.5 g. Odmereni materijal se stavlja u avan i vrši homogenizacija tučkom, uz dodatak 5–10 ml acetona. Da bi se pospešila homogenizacija dodavano je malo kvarcnog peska. Kako bi se sprečilo zakišeljavanje rastvora dodaje se mala količina $MgCO_3$. Homogenizacija traje obično oko 3 minuta, posle čega se sadržaj iz avana filtrira uz pomoć vakuuma. Dobijeni filtrat predstavlja ekstrat pigmenata, koji se prenosi u odmereni sud od 25 ml, sud dopuni acetonom do crte i dobro promućka. Kako je koncentracija pigmenata u najvećem broju slučajeva velika, da bi se moglo vršiti očitavanje na spektrofotometru, dobijeni ekstrakt treba razblažiti 10 puta. Apsorbancija ovako pripremljenog ekstrakta se očitava na spektrofotometru na talasnim dužinama 662, 644 i 440nm a zatim vrši izračunavanje.

Za izračunavanje količine hlorofila *a* i *b* i ukupnih karotenoida u acetonskom rastvoru primenjivan je obrazac Holma i Wetsteina:

$$\text{Hlorofil } a = 9.784 \cdot A_{662} - 0.990 \cdot A_{644}$$

$$\text{Hlorofil } b = 21.426 \cdot A_{644} - 4.650 \cdot A_{662}$$

$$\text{Hlorofil } a + b = 5.134 \cdot A_{662} + 20.436 \cdot A_{644}$$

$$\text{Karotenoidi} = 4.695 \cdot A_{44} - 0.268 \cdot (a + b)$$

gde je: A – apsorbancija pri odgovarajućoj talasnoj dužini, a vrednosti 9.784, 0.990, 21.426, 4.650 i 0.288 predstavljaju molarne apsorbacione koeficijente po Holmu (1954) i Wetstein-u (1957.) za aceton i dužinu optičkog puta od 1cm.

Kada je izračunata koncentracija pigmentata (mg/l), pristupa se izračunavanju količine pigmentata po g svežeg ili suvog biljnog materijala prema obrascu:

$$C = \frac{C_1 \cdot V \cdot R}{G \cdot 1000}$$

gde su: C – sadržaj pigmentata mg/g svežeg ili suvog biljnog materijala; C_1 – koncentracija pigmentata izračunata po obrascu Holma i Wetststeina ; V – prvobitna zapremina ekstrakta (ml); R – razblaženje, ako ga ima; G – odmerena sveža (suva) masa biljnog materijala (g); 1000 – faktor za pretvaranje (g u mg).

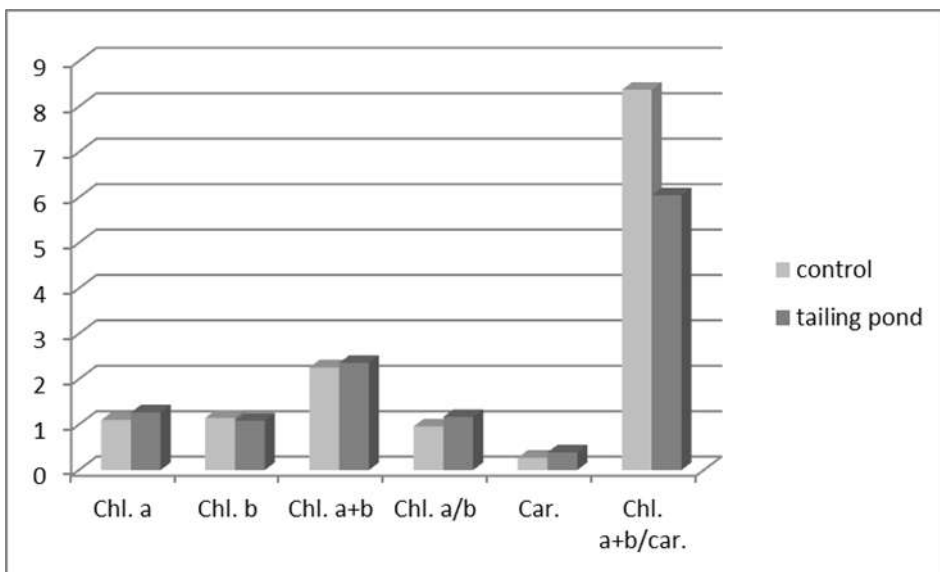
Rezultati istraživanja i diskusija

Sadržaj hlorofila a, ukupni sadržaj hlorofila a i b, odnos hlorofila a i b (a/b) i sadržaj karotenoida je bio veći kod uzoraka sa deponije nego kod kontrolnih. Sadržaj hlorofila b i odnos zbira hlorofila a+b i karotenoida (Chl. a+b/car.) je bio veći kod uzoraka iz nezagađenog područja nego sa deponije (Grafikon 1).

Biološke reakcije lekovite biljne vrste *Teucrium chamaedrys* na uslove koji postoje na saniranoj deponiji u odnosu na nezagađeno područje zavise od: mikroklimatskih uslova supstrata, temperature i svetlosti, gustine populacije biljaka na deponiji, borbe za opstanak sa ostalim biljkama, ograničenja u pogledu hranljivih resursa u supstratu kao i od intenziteta zagađenja odnosno sadržaja teških metala u supstratu na deponiji. Rastenje biljaka na saniranoj deponiji je drugačije od rasteња na nezagađenom zemljištu i zavisi od odgovora biljaka na stresne uslove koji se javljaju na supstratu deponije.

Izmenjeni ekofiziološki faktori na saniranoj deponiji u odnosu na nezagađeno područje utiču na morfologiju i fiziologiju ispitanih uzoraka biljaka. Uočene razlike u sadržaju pigmentata mogu biti odgovor na izmenjene morfološke karaktere. Uvećan sadržaj teških metala u supstratu sanirane deponije je u korelaciji sa izmenom nekih morfoloških karakteristika kod ispitanih uzoraka biljaka. Uzorci na saniranoj deponiji su izloženi većoj količini upadne svetlosti tokom rasta.

Hulbert (1988.) je dokazao da uvećan intenzitet upadne količine svetlosti utiče na izmenu anatomskih i fizioloških karakteristika biljaka. U saglasnosti sa podacima do kojih su došli Knapp et al. (1998.) primećeno je da uzorci sa sanirane deponije koje rastu pri visokom intenzitetu svetlosti imaju deblje i šire listove, veću specifičnu masu lista i veću gustinu stoma. U skladu sa ovim parametrima, možemo reći da je nivo odnosa fotosintetskih pigmentata u listovima i efikasnost iskorišćenja vode i azota veća na otvorenim površinama sanirane deponije. Povećanje debljine lista može da doprinese povećanju mezofila u odnosu na celu lisnu površinu, što dovodi do povećanja iskorišćenja CO₂ i stepena fotosinteze (Nobel et al., 1975).



Graf. 1. Poređenje sadržaja pigmenta hloroplasta u listovima (mg/g) lekovite biljne vrste *Teucrium chamaedrys*: sa deponije „Žitkovac“ (tailing pond) i nezagađenog područja iz okoline Niša (control).

Legenda: hlorofil a (Chl.a), hlorofil b (Chl.b), hlorofil a+b (Chl a+b), odnos hlorofila a i b (Chl a/b), karotenoida (Car.) i odnos zbira hlorofila a+b i karotenoida (Chl. a+b/car.)

*Graph. 1. Comparison of chloroplast pigment content of leaves (mg/g) in medicinal plant *Teucrium chamaedrys* from tailing pond „Žitkovac“ (tailing pond) on lead-zinc mine „Trepča“ and uncontaminated area near city of Niš (control).*

Legend: chlorophyll a (Chl.a), chlorophyll b (Chl.b), Chlorophyll a+b (Chl. a+b), olatio of chlorophyll a and b (Chl a/b), carotenoids (Car.) and ratio of chlorophyll a+b and carotenoids (Chl. a+b/car.)

Povećan sadržaj karotenoida kod uzoraka sa deponije verovatno obezbeđuje zaštitu hlorofila od fotooksidacije, odnosno štetnog dejstva ultravioletnog zračenja.

Zaključak

Izmenjeni uslovi na supstratu sanirane deponije „Žitkovac“ RMHK „Trepča“ zahtevaju od biljaka anatomske, fiziološke i biohemijske aklimatizacije. Sposobnost biljaka da se prilagode stresnim uslovima je od ključnog značaja za njihov opstanak. Dinamika biljnih pigmenta je tesno povezana sa fiziološkim statusom biljke.

Kao odgovor na zagađenje na deponiji kod lekovite biljke *Teucrium chamaedrys* (podubica) zabeležen je povećan sadržaj hlorofila a, hlorofila a+b, i odnosa hlorofila a/b u poređenju sa kontrolnim uzorcima iz nezagađenog područja. Takođe je uvećan i sadržaj karotenoida što doprinosi zaštiti od štetnog dejstva UV zračenja.

Prema rezultatima koji su prikazani u ovom radu možemo reći da ispitani uzorci lekovite biljke *Teucrium chamaedrys* imaju dobar potencijal za adaptaciju na uslove stresa uzrokovanog zagađenjem na saniranoj deponiji rudarsko metalurškog kombinata „Trepča“.

Napomena

Ovaj rad je urađen u okviru Projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja OI 171025. Za usmeravanje pri izboru metoda za ovaj rad izražavamo zahvalnost prof. dr Radmili Trajković, redovnom profesoru Prirodno matematičkog fakulteta u Prištini sa privremnim sedištem u Kosovskoj Mitrovici.

Literatura

- Bartley G. E., Scolnic P. A. (1995). Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*, 7, 1027-1038.
- Blackburn G. A. (2007). Hypercentral remote sensing of plant pigments, *Journal of Experimental Botany*, 58 (4), 855-867.
- Fang Z., Bouwkamp J., Solomos T. (1998). Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 49, 503-510.
- Holm G. (1954). Chlorophyll mutations in barley, *Acta Agriculturae Scandinavica*, 4, 457-471.
- Hulbert, L. C. (1988). Causes of fire effects in tall grass prairie. *Ecology*, 69, 46-58.
- Jakšić T., Smiljić M., Stankov-Jovanović V., Stamenković S., Papović O., Vasić P., Marković M. (2017). Activity of catalase in invasive plants from tailing pond of lead-zinc mine "Trepča". Objavljeno u *Book of abstracts of the 7th ESENIAS Workshop with Scientific Conference, Networking and regional cooperation towards Invasive Alien Species Prevention and Management in Europe*. Trichkova T, Tomov R, Vladimirov V, Kalcheva H, Vanev Y, Uludağ A, Tyufekchieva V (eds.), 102. Sofia, Bulgaria: Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences (IBERBAS); East and South European Network for Invasive Alien Species (ESENIAS).
- Knapp A. K., Briggs J. M., Hartnett D. C., Collins L. S. (1998). *Grassland Dynamics. Long-Term Ecological Research in Tallgrass Prairie*. New York, USA: Oxford University Press.
- Milentijević G., Nedeljković B., Ristović I. (2010). Analiza uticaja rada MMCC "Trepča" na zagađivanje voda reke Ibar teskim metalima na području Zvečana. Objavljeno u *Zbornik radova III Međunarodnog Simpozijuma "Energetsko rudarstvo, Nove tehnologije, Održivi razvoj 2010"*, Ristović I. (ed.), 141-147. Banja Junaković, Apatin, Srbija: Rudarsko Geološki Fakultet.
- Nobel P. S., Zaragoza L. J., Smith W. K. (1975). Relation between mesophyll surface area, photosynthetic rate, and illumination level during development for leaves of *Plectranthus parviflorus* Hanckel. *Plant physiology*, 55, 1067-1070.

- Richardson A. D., Duigan S. P., Berlyn G. P. (2002): An evaluation of non-invasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytologist*, 153, 185-194.
- Vasković Đ. (2016). Upravljanje industrijskim otpadom u Republici Srbiji, Objavljeno u *Zbornik radova Fakulteta tehničkih nauka, Novi Sad, broj 2/2016. Oblast: Industrijsko inženjerstvo i menadžment*, Vasković Đ. (ed.), 311-314. Novi Sad, Srbija: Fakultet Tehničkih nauka.
- Wettstein D. (1957). Chlorophyll letale und der submicroscopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12, 427-434.
- Young A., Britton G. (1990). Carotenoids and Stress. Objavljeno u: *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Alscher R.G., Cumming J.R. (eds), 87-112. New York. Wiley-Liss.

CONTENT OF CHLOROPLAST PIGMENTS IN MEDICINAL PLANT *Teucrium chamaedrys* FROM TAILING POND OF MINING AND METALLURGICAL CHEMICAL COMPANY “TREPČA”

Mirjana Smiljić¹, Vesna Stankov-Jovanović², Slobodan Ćirić²,
Nikola Stamenković², Marija Ilić², Tatjana Jakšić¹, Nebojša Živić¹,
Slaviša Stamenković², Marija Marković²

Abstract

In this paper, the contents of chloroplast pigments (chlorophyll a, b, a+b and carotenoids) in the leaves of medicinal plant *Teucrium chamaedrys* from tailing pond „Žitkovac“ of Mining and Metallurgical Chemical Company „Trepča“ and from uncontaminated area near city of Niš were compared. Chloroplast pigments were determined spectrophotometrically in the acetone extracts of experimental and control samples of plant material. The contents of chlorophyll a, a+b and ratio a/b were higher in leaves of samples from tailing pond in comparison with control samples from uncontaminated habitat near city of Niš. In response to stress conditions caused by pollution and full intensity of sunlight in samples of leaves from tailing pond providing the protection of chlorophyll from photooxidation or ultraviolet radiation damage.

Key words: *Teucrium chamaedrys*, tailing pond, chloroplast pigments, chlorophyll, carotenoids

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