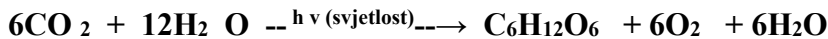


## Vježba br.1. Određivanje inteziteta fotosinteze mjerenjem količine CO<sub>2</sub>

S obzirom na kompleksnost procesa, definisanje fotosinteze može se vršiti određivanjem različitih parametara na različitim nivoima , na nivou svijetle ili tamne faze, određivanjem količine i vrste specifičnih produkata , zatim određivanjem enzimske aktivnosti i dr. Međutim jedan od najjednostavnijih i najočiglednijih metoda za demonstraciju fotosinteze jeste mjerenje usvojenog CO<sub>2</sub> ili oslobođenog kiseonika koji nastaje kao konačan produkt u ovom složenom procesu. Sumarno ovaj proces se može predstaviti jednačinom:



Intezitet fotosinteze predstavlja količinu usvojenog CO<sub>2</sub> ili izdvojenog O<sub>2</sub> po jedinici lisne površine ili mase u jedinici vremena. Najčešće se izražava u mg CO<sub>2</sub> dm<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>.

**Materijal:** Biljka u punoj fotosintetskoj aktivnosti

**Pribor:** Erlenmayer tikvice (100ml) s gumenim čepom i gumenom cijevi dužine 10-ak cm, kružni bušači, analitička vaga, bireta.

**Hemikalije:** 0,1mol/l Ba(OH)<sub>2</sub> , 0,21mol/l HCl, fenolftalein indikator

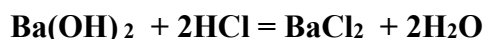
### Postupak:

Mjerenje inteziteta fotosinteze ovom metodom zasniva se na količinskom određivanju asimilovanog CO<sub>2</sub> u boci u kojoj se nalaze listovi ili izdanci. Količina CO<sub>2</sub> se određuje na osnovu razlike u sadržaju CO<sub>2</sub> u boci sa biljnim materijalom (oglednoj) i boci bez listova (kontrolnoj)

Odabrani listovi ili izdanci pričvršćuju se na čep ili posebno ugrađen štapić i unose u bocu (Erlenmayer tikvicu). Na isti način postavlja se i kontrolna boca, ali bez biljnog materijala. Zatvorene Erlenmayer tikvice prenjeti u osvijetljen prostor i ostaviti da ostoje pola sata prije početka ogleda. Nakon 5-6min ekspozicije na svjetlosti , listovi ili izdanci se vade iz boce, i iz zatvorenog sistema otpipetira setačno 20ml 0,1mol/l rastvora Ba(OH)<sub>2</sub> . Boca se brzo zatvori čepom i ostavi da ostoje još pola sata. Isto se uradi i sa kontrolnom bocom. U toku stajanja Ba(OH)<sub>2</sub> reaguje sa CO<sub>2</sub> iz boce i gradi se nerastvorni barijum-karbonat, prema reakciji:



S obzirom da je u toku ogleda doslo do usvajanja CO<sub>2</sub> od strane listova u oglednoj boci, doći će do razlika u količini nadgrađenog BaCO<sub>3</sub> u oglednoj i kontrolnoj boci, a koja se utvrđuje titracijom 0,2mol/l rastvorom HCl. Naime posle određenog vremena , prvo jedna, a zatim druga boca se brzo otvara i u nju dodaje 2-3 kapi fenolftaleina i višak barijum-hidroksida brzo titriše do obezbojavanja rastvora. Zapiše se količina utrošene kiseline za neutralizaciju baze. Neutralizacija se vrši po reakciji:



U međuvremenu potrebno je odrediti lisnu površinu ili masu.

### Izračunavanje:

Količina asimilovanog CO<sub>2</sub> izračunava se na osnovu razlike utrošene 0,2mol/l HCl u titriranju kontrolne i ogledne boce, prema formuli:

$$F_{CO_2} = \frac{(a-b) \times 4,4 \times 100 \times 60}{t \times p}$$

gdje su:

**F** CO<sub>2</sub> - intezitet fotosinteze

**a** - količina utrošene HCl za kontrolnu bocu u ml

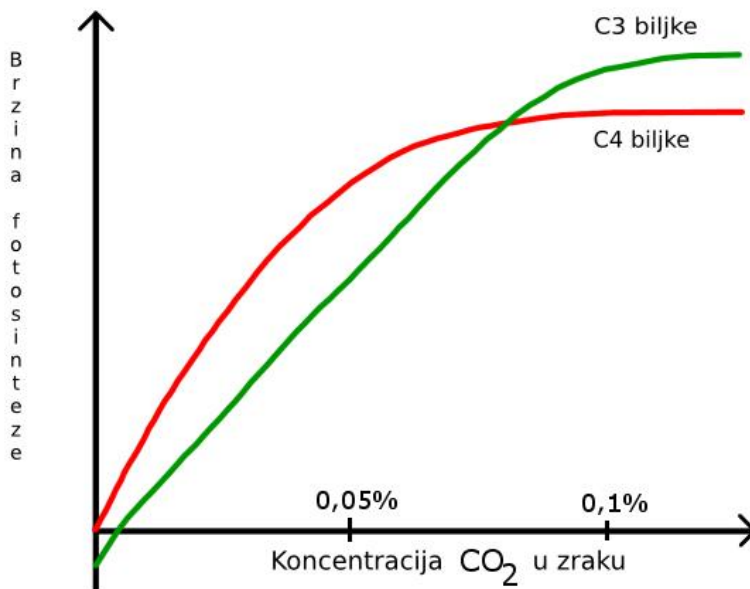
**b** - količina utrošene HCl za oglednu bocu u ml

**100** – faktor za prevođenje na 100cm<sup>3</sup>

**60** - faktor za prevođenje na čas

**t** – vrijeme u min.

**p** - površina u cm<sup>2</sup>



Zavisnost brzine fotosinteze od koncentracije CO<sub>2</sub>

Dok raste koncentracija ugljik dioksida, brzina kojom se sintetiziraju šećeri u fazi svjetlosno zavisnih reakcija se povećava sve dok je ne ograniče neki drugi faktori. Rubisco, enzim koji hvata ugljik dioksid u svjetlosno zavisnim reakcijama, ima afinitet za spajanje ugljik dioksida kao i kiseonika. Kada je koncentracija CO<sub>2</sub> velika, Rubisco će fiksirati ugljik dioksid. Međutim, ako je njegova koncentracija niska, Rubisco će umjesto CO<sub>2</sub> fiksirati kiseonik. Ovaj proces, nazvan fotorespiracija, koristi uskladištenu energiju, ali se njom ne proizvode šećeri.

## **Vježba br.2: Zaštitno djelovanje šećera kod niskih temperatura**

Grada protoplazme narušava se djelovanjem niskih temperatura, pa iz ćelijskog soka obojenih biljnih tkiva izlaze pigmenti, tj. oboji se rastvor u koji je uronjeno niskim temperaturama oštećeno biljno tkivo.

Pribor i materijal: špric boca sa destilovanom vodom, epruvete, laboratorijski nožić ili skalpel, 1M saharoza, 0,5M saharoza, list crvenog kupusa ilicvekle.

Postupak:

Kao biljni preparat koristi se tanak poprečni presjek lisne drške cvekle ili površinski rez lista crvenog kupusa. Priređeni preparati stave se u tri epruvete napunjene sa 8 ml destilovane vode, odnosno 0,5M ili 1M rastvorom saharoze. Sadržaj rastvora u epruvetama zamrzava se pomoću smjese za hlađenje na temperaturi od oko -20C. Nakon 20-ak minuta zamrzavanja, epruvete se stave u posudu s vodom gdje se otapa zaleđeni sadržaj epruveta. Preparati se vade iz rastvora (ili se rastvor filtrira kroz filter papir) i posmatraju morfološke promjene ćelija i promjene u boji.

Pod uticajem niske temperature koloida struktura protoplazme preparata potopljenof u destilovanoj vodi se mjenja, membrana gubi svojstvo permeabilnosti i dolazi do izlaska antocijanina iz smrznutih ćelija. Takvi preparati se obezboje ,a voda se boji ljubičasto. Ćelije preparata koje su bile u 1M rastvoru saharoze ostaju nepromjenjene, a ćelije u 0,5M rastvoru saharaze djelimično se obezboje.

Uočene promjene jasan su dokaz zaštitnog djelovanja šećera na protoplazmu pri niskim temperaturama.

### Vježba br 3. Određivanje koncentracije mikroelemenata, teških metala u biljnim tkivima ( Fe, Mn, Zn, Cu..)

#### 2.1. Sadržaj elemenata u biljkama, njihova podjela i značaj za biljke

Za rast i razviće biljaka neophodno je prisustvo velikog broja različitih elemenata. Do sadašnjim istraživanjima u biljnim tkivima registrovano je oko 70 elemenata. Međutim, pretpostavlja se da se u njima nalazi i svih 88 elemenata koji učestvuju u izgradnji Zemljine kore. Njihova zastupljenost u biljkama je različita i zavisi od niza unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Osim razlika u sadržaju i značaj pojedinih elemenata u prometu materije je različit. To je bio osnovni razlog da se među elementima koji se nalaze u biljkama izvrši odgovarajuća podjela. Pri tome su pojedini autori koristili različite kriterijume. Neki su za osnovu uzimali njihovu zastupljenost u biljkama, a drugi značaj u prometu materija ili u stvaranju određenih organskih jedinjenja (Kastori, 1983, 1993).

Elementi koji ulaze u sastav biljnog tijela potiču iz vazduha, vode ili zemljišta. Ugljenik, od kojeg su izgrađena organska jedinjenja, biljka u cjelosti uzima iz vazduha u obliku CO<sub>2</sub>. Kiseonik je uglavnom porijeklom od CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>, dok vodonik kao treći najrasprostranjeniji element, znatnim dijelom dolazi iz vode. Ipak, zemljište je glavni izvor svih ostalih elemenata (Nešković, *et al.*, 2003). Prosječan sadržaj nekih biogenih elemenata u biljkama dat je u tabeli 1.

**Tabela 1. Prosječan sadržaj nekih biogenih elemenata u suvoj materiji biljaka**

Element	%	Element	%	Element	Ppm	Element	Ppm
C	45	Ca	0,5	Cl	100	Cu	6
O	45	Mg	0,2	Fe	100	Mo	0,1
H	6	P	0,2	Mn	50		
N	1,5	S	0,1	Zn	20		
K	1,0			B	20		

Mehanizam usvajanja jona elemenata od strane biljaka nije sasvim selektivan. One preko korjenovog sistema u većoj ili manjoj količini usvajaju sve za njih pristupačne jone i molekule koji se nalaze u zemljištu. Međutim, svi ti elementi nisu biljkama neophodni. Iz tog razloga najčešće se primjenjuje podjela elemenata na: **neophodne, korisne i ostale**. U neophodne elemente za više biljke ubrajaju se: C, H, O, N, P, K, Cu, Mg, S, Fe, B, Mn, Zn, Cl, Mo i Co, u korisne elemente Na i Si a u ostale svi drugi elementi koji se nalaze u biljkama. Ova podjela međutim nema opšti značaj za cijeli biljni svijet. Naime, zbog specifičnosti metabolizma biljnih vrsta, značaj pojedinih elemenata za rast i razviće biljaka može da bude veoma različit. Ovim se objašnjava pojava da jedan isti element za jednu biljnu vrstu može da bude neophodan a za drugu samo koristan i obrnuto.

Na osnovu fizičko-hemijskih osobina neophodni i korisni elementi dijele se u četiri grupe: **nemetale** (C, H, O, N, P, S i Cl), **alkalne metale** (K, Ca, Mg, Na), **teške metale** (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo i Co) i **metaloide** (B i Si).

Na osnovu njihove zastupljenosti u biljkama, elementi se veoma često grupišu na **makro i mikroelemente**. U makroelemente ubrajaju se: C, O, H, N, P, K, Ca, Mg, S, Na, Si i Cl. Njihov prosječan sadržaj u suvoj materiji biljaka se kreće od 2 do 60mg/g. Sadržaj mikroelemenata (Cu, Zn, B, Mn i dr.) u suvoj materiji biljaka je manji od 1mg/g. Treba istaći, da podjela elemenata na makro i mikro ne odražava njihovu ulogu u metabolizmu biljaka. Značaj makro i mikro elemenata neophodnih za život biljaka je isti, jer kako bez jednih tako i bez drugih one ne mogu da završe svoj životni ciklus. Po načinu dejstva u metabolizmu biljaka, mikroelementi se znatno razlikuju od većine makroelemenata. Mikroelementi ulaze u sastav velikog broja enzima čije je dejstvo pretežno katalitičko. Djeluju u biljkama pri veoma malim koncentracijama i to često strogo specifično, na šta će se detaljnije ukazati u narednom tekstu.

U grupu **mikroelemenata** najčešće se ubrajaju **gvožđe, cink, bakar, mangan, kobalt, kadmijum, nikel i hrom**. Neophodni mikroelementi većinom spadaju u grupu teških metala, zbog čega prekomjerno povećavanje njihove koncentracije u biljkama može imati nepovoljne posledice ne samo za biljke, već i za životinje, a preko lanca ishrane i na samog čovjeka (Kastori, 1993).

Prema najsavremenijim istraživanjima, odlike mikroelemenata su sljedeće:

- a. djeluju u biljkama u veoma malim koncentracijama*
- b. djeluju u biljkama strogo specifično*
- c. direktno utiču na fiziološko- biohemijske funkcije biljaka i*
- d. pri njihovom nedostatku bilka ne može normalno da završi svoj životni ciklus*

Kada je u pitanju tolerantnost biljnih vrsta prema određenim metalima treba imati u vidu sledeće (Cox & Hutchinson, 1980):

- a. da postoje vrste tolerantne prema određenom metalu, ali genetički nezavisne i i ne tolerantne prema drugim metalima*
- b. postoje vrste tolerantne prema određenom metalu, što vodi povećanju tolerancije prema drugim metalima i*
- c. da postoje vrste genetički rezistentne prema određenom metalu.*

Međutim nedovoljna kao i prekomjerna količina metala u biljnom tijelu može da dovede do niza anatomskih i morfoloških promjena, za koje se dugo smatralo da su bolesti izazvane mikroorganizmima ili nekim abiotičkim faktorima.

### **2.1.1. Gvožđe (Fe)**

Još sredinom prošlog vijeka uočeno je da nedostatak gvožđa izaziva hlorozu listova vinove loze. Na osnovu brojnih istraživanja koja su u to vrijeme izvedena utvrđeno je da je gvožđe elemenat neophodan za biljke i da učestvuje u mnogim važnim fiziološko - biohemijskim procesima. U novije vrijeme simptomi nedostatka gvožđa se

sve češće javljaju. To je posebno izraženo kod nekih višegodišnjih gajenih biljaka, zbog čega problem ishrane biljaka ovim elementom ima sve veći praktični značaj.

Biljke mogu da usvajaju gvožđe kao fero jon ( $Fe^{2+}$ ), feri jon ( $Fe^{3+}$ ) i u vidu *Fe*-helata. Smatra se da je usvajanje gvožđa povezano sa redukcijom  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  (Brown & Ambler, 1974).

Na usvajanje gvožđa od strane biljaka utiče veliki broj različitih faktora spoljašnje sred sredine. Visoka vrijednost *pH*, koncentracija fosfata i  $Ca^{2+}$  - jona u zemljištu smanjuju njegovo usvajanje (Foy *et al.*, 1978). Značajnu ulogu u obezbjeđenju biljaka sa gvožđem ima izlučivanje raznih organskim materija preko korijena, sposobnih da stvaraju stabilnije helatne komplekse sa gvožđem od onih koji se nalaze u zemljištu.

Sadržaj gvožđa u suvoj materiji biljaka kreće se u širokim granicama od 50-1000 *ppm*. U nadzemnim organima najviše ga ima u lišću, zatim stablu a najmanje u zrnu. Korijen biljaka takođe sadrži značajne količine gvožđa. U listovima najveći dio gvožđa nalazi se u hloroplastima, mitohondrijama i jedru. Gvožđe se u stromi plastida nalazi u vidu fitoferitina, jedinjenja koje je veoma bogato gvožđem.

Posredno ili neposredno ovaj element učestvuje u brojnim fiziološko-biohemijskim procesima biljaka: biosintezi hlorofila, fotosintezi, disanju, fiksaciji elementarnog azota, redukciji nitrata i nitrita, metabolizmu ugljenih hidrata i dr. Mnoga istraživanja ukazuju na pozitivnu korelaciju između sadržaja gvožđa i hlorofila. Pored toga, gvožđe je značajno i za fotosintezu pošto se u slučaju njegovog nedostatka narušava građa hloroplasta. Ono ulazi i u sastav citohroma koji učestvuje u transportu elektrona u fotosistemu I i II (Nieboer & Richardson, 1980).

U zemljištu gvožđe se uglavnom nalazi u obliku različitih minerala, amfoternih oksida ili hidroksida. Razlozi zbog kojih dolazi do nedostatka gvožđa i pored njegovog relativno visokog sadržaja u zemljištu, veoma su različiti i specifični za određene klimatske, edafske i agrotehničke uslove. Do nedostatka može doći na svim tipovima zemljišta: alkalnim, kiselim ili neutralnim. Međutim, najčešće se javlja na alkalnim zemljištima bogatim krečom i glinom. Nedostatak *Fe* može da izazove i povećana koncentracija teških metala u zemljišnom rastvoru (*Mn, Ni, Cu, Zn, Co* i *Cr*) zatim



primjena visokih doza fosfornih đubriva, prisustvo veće koncentracije  $HCO_3^-$  jona, pretjerana vlažnost zemljišta, zabarivanje, nakupljanje  $H_2S$  i sl.

Nedostatak gvožđa u biljkama ogleda se prije svega u pojavi hloroze koja se prvo pojavljuje na mlađem lišću, odnosno u pojedinim djelovima biljke, koji postaju blijedo žuti do blijedozeleni. Suvišak gvožđa se u prirodi rijetko javlja.

### 2.1.2. Cink (Zn)

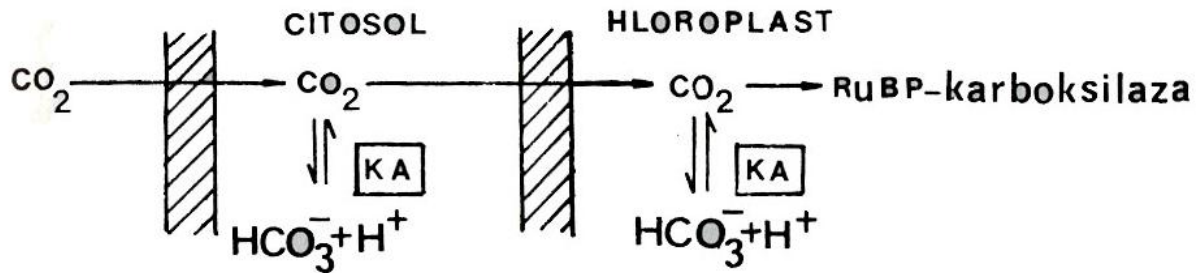
Cink je u malim količinama neophodan za niže i više biljke kao i za čovjeka i životinje. Ulazi u sastav enzimskih sistema i zahvaljujući tome posredno ili neposredno učestvuje u brojnim procesima metabolizma biljaka.

Cink se u zemljištu nalazi u primarnim mineralima, sekundarnim mineralima gline, i u obliku  $Zn$ -sulfida,  $Zn$ -oksida,  $Zn$ -karbonata,  $Zn$ -fosfata. Biljke cink usvajaju u obliku jona  $Zn^{2+}$  helata. Sadržaj ukupnog cinka u zemljištu kreće se od 10-300ppm.

Cink spada u grupu elemenata čija pokretljivost u biljkama nije naročito izražena. Na njegovu translokaciju utiču brojni lokalni faktori, kao npr. temperatura, svjetlost, prisustvo fosfata, gvožđa i dr. Utvrđeno je da joni fosfata smanjuju transport cinka iz korijena u nadzemne organe biljke.

Prosječan sadržaj cinka u suvoj materiji kreće se od 20 do 100 ppm. Postoje biljke akumulatori ili "indikatori" koje mogu da sadrže izuzetno velike količine  $Zn$  čak i do 12000 ppm. Uglavnom se nakuplja u korijenu i mladim listovima.

Cink ima veoma važnu ulogu u prometu biljnih materija, jer ulazi u sastav mnogih enzima. Veoma značajan enzim u čiji sastav ulazi cink je kaboanhidraza, koja katalizuje prenošenje vode na  $CO_2$ , pri čemu nastaje  $HCO_3^-$  i  $H^+$  joni (sl.10.). Smatra se da se ovaj enzim nalazi u hloroplastima i da njegova aktivnost u stromi hloroplasta obezbjeđuje odgovarajuću vrijednost  $pH$  čime se štite bjelančevine od denaturacije, koja može biti izazvana lokalnom promjenom  $pH$  vrijednosti (Edwards & Walker, 1983).



**Slika 10.** Katalitičko dejstvo karboanhidraze pri hidratizaciji CO<sub>2</sub> u fotosintetski aktivnim ćelijama (Edwards, Wallker, 1983.)

Osjetljivost pojedinih biljnih vrsta na nedostatak cinka je različita. Znaci nedostatka uočeni su mnogo češće na višegodišnjim nego na jednogodišnjim biljkama. Na višegodišnjim biljkama, nedostatak cinka najčešće je uočljiv na jabuci, krušci, breskvi, vinovoj lozi, koje se zbog toga često smatraju indikatorima za utvrđivanje nedostatka cinka u zemljištu. Simptomi nedostatka cinka kod pojedinih biljnih vrsta, često su nejednaki pa se u literaturi ova pojava i naziva različito: sitnolisnost, pjegavost i dr. Najtipičniji znaci nedostatka cinka su oni koji su izazvani nedovoljnom količinom auksina, a manifestuju se prije svega malim, uskim i sitnim listovima, skraćanjem internodija i stvaranjem rozete. Pored toga na listovima se uočavaju razne deformacije, kao što su hlorotične pjege i nekroze. Isto tako pri nedostatku cinka, smanjuje se intenzitet fotosinteze što je jedan od osnovnih razloga opadanja produktivnosti biljaka (Turner, 1970).

Značajno je istaći da se nedostatak cinka najčešće javlja na lakim pjeskovitim, alkalnim, krečnim i u fosforom obogaćenim zemljištima.

Povišena koncentracija cinka, kao uostalom i drugih teških metala djeluje toksično na biljke. Otpornost pojedinih biljnih vrsta prema višku cinka veoma je različita. Simptomi se javljaju kada sadržaj cinka u suvoj materiji pređe granicu od 300-500 ppm. Značajan pokazatelj povišene koncentracije cinka je i odnos udjela fosfora i cinka u suvoj materiji biljaka. Višak cinka izaziva manje -više specifične morfološke i fiziološke promjene, što se ogleda u nižem rastu, smanjenju korjenovog sistema i obrazovanja sitnih listova. Takođe, na listovima se javljaju crvenkasto-mrke pjege, a na

rubovima nekroza. Ukoliko udio cinka u biljkama dostigne toksični nivo, one brzo propadaju (Wainwright & Woolhouse , 1977; Lasat *et al.*, 1996; Cosio *et al.*, 2004).

### 2.1.3. Mangan (Mn)

Mangan nije gradivni element. Do sada je iz biljnog materijala izdvojena samo jedna bjelančevina koja sadrži **Mn-manganin**. Najznačajnija uloga mangana u životnim procesima biljaka je aktivacija enzima. Njegovu ulogu u tome u nekim slučajevima i do određene mjere mogu da preuzmu drugi metali kao npr. cink, magnezijum i drugi. Međutim pri tome se često umanjuje aktivnost enzima. Mangan aktivira procese fosforilacije i zahvaljujući tome uključen je bilo posredno ili neposredno u metabolizam ugljenih hidrata, prenos i potrošnju energije i sl. On takođe ima važnu ulogu i u procesu fotosinteze prije svega u reakciji Hill-a. Isto tako treba naglasiti da mangan u ciklusu trikarbonskih kiselina aktivira procese oksidacije i dekarboksilacije. Takođe, nezamjenjiv je pri hidrolizi peptida putem peptidaze, a katalizuje razgradnju arginina, zbog čega se smatra da u nedostatku mangana dolazi do nakupljanja ove amino-kiseline u biljkama.

Njegova uloga u životnim procesima biljaka zasniva se na visokom redoks-potencijalu i mogućnosti promjene valentnog stanja :  $Mn^{2+} \xrightarrow{\quad} Mn^{3+}$  . Zahvaljujući tome, mangan je značajan regulator oksido-redukcionih procesa kod biljaka.

Sadržaj ukupnog mangana u zemljištu najčešće se kreće od 0,02 do 0,03 %. Od njegove ukupne količine u zemljištu samo je od 0,1 do 1,0% pristupačno za biljke.

Sadržaj mangana u biljkama je naročito veliki u mladim organima i tkivima u kojima su metabolički procesi intenzivni. U suvoj materiji biljaka sadržaj mangana kreće se u granicama od 50-250 ppm. Premještanje mangana je posebno izraženo u pravcu meristemskog tkiva i reproduktivnih organa. Listovi su takođe bogati manganom. Veći dio mangana može se izdvojiti iz biljnog materijala tretiranjem sa slabim kiselinama i bazama. Na osnovu toga može se zaključiti da se ovaj element u biljkama pretežno nalazi u vidu neorganskih jedinjenja.

Većina zemljišta sadrži dovoljne količine pristupačnog mangana. Njegov nedostatak se javlja na krečnim i alkalnim zemljištima. Biljkama je najpristupačniji dovovalentni mangan. Nedovoljna obezbjeđenost biljaka manganom, izaziva karakteristične anatomske, morfološke i citološke promjene. Najdetaljnije je proučavana pojava nedostatka mangana kod ovasa, gdje izaziva suhu pjegavost. Njegov nedostatak izaziva i hlorozu. Zbog relativno slabe pokretljivosti mangana u biljakama hloroza ne obuhvata ravnomjerno cio list, već samo interkostalni dio.

Višak mangana u biljakama u prirodi rasporostranjeniji je nego što se može pretpostaviti. Do ove pojave dolazi na zemljištima koja imaju visok sadržaj mangana nisku vrijednost pH i visok redukcionni potencijal. Toksična dejstva viška mangana najprije se mogu uočiti na ćelijama epidermisa. U njegovom višku taloži se  $MnO_2$  u vakuolama ćelija dlačica listova, epidermisa glavnog nerva i lisne drške. Taloženje viška mangana u vidu  $MnO_2$  u fiziološki manje aktivnim djelovima biljaka može se smatrati odbrambenim mehanizmom ili reakcijom. Nepovoljno dejstvo povišenog sadržaja mangana može da se ublaži prisustvom alkalnih i zemnoalkalnih metala. U cilju otklanjanja opasnosti od pretjerane akumulacije mangana u biljakama na kiselim zemljištima preporučuje se kalcifikacija.

#### **2.1.4. Bakar (Cu)**

Bakar ulazi u sastav enzima i zahvaljujući tome posredno ili neposredno utiče na odvijanje mnogih procesa važnih za život biljaka.

Biljke bakar usvajaju iz zemljišta. Sadržaj ukupnog bakra u zemljištu kreće se od 2 do 100 ppm, a pristupačnog od 2 do 50 ppm. Do pojave simptoma nedostatka dolazi kada je sadržaj pristupačnog bakra u zemljištu manji do 2 do 3 ppm. Biljke usvajaju male količine ovog elementa. Pretežno ga usvajaju u vidu  $Cu^{2+}$ - jona i u vidu helata (Mercer & Richmond, 1970).

U toku svog rasteanja i razvića biljke različitim intenzitom usvajaju bakar. Pokretljivost bakra u biljakama nije naročito izražena. Na to ukazuje činjenjenica, da se prvi znaci nedostatka bakra javljaju na najmlađim organima i na vegetacionoj kupi.

Premještanje bakra iz korijena u nadzemne organe je sporo, zbog čega se i pri njegovoj visokoj koncentraciji u spoljašnjoj sredini, sadržaj u listovima sporo povećava. Ukoliko je sadržaj bakra u suvoj materiji lista manji od 4 ppm, smatra se da biljke nijesu u dovoljnoj mjeri obezbijedene sa bakrom, dok sadržaj preko 20 do 50 ppm ukazuje na višak ovog elementa. Analizom raspodjele bakra posmatra na nivou cijele biljke, uočeno je da je njegov sadržaj u korijenu znatno veći nego u ostalim organima. Utvrđeno je da se bakar u značajnoj mjeri nakuplja i u hloropalstima. U tom pogledu on je veoma sličan gvožđu.

Bakar spada u grupu polivalentnih elemenata. Za biljke je od posebnog značaja bakar stepena oksidacije +2, zbog toga što ga one pretežno u tom obliku usvajaju iz spoljašnje sredine (Vesk & Allway, 1997 ; Vesk *et al.*, 1999).

Osnovna uloga bakra u životnim procesima biljaka ogleda se i u tome što on ulazi u sastav niza enzima. Enzimi koji sadrže bakar pretežno učestvuju u metabolizmu fenola. Cu-enzimi koji sudjeluju u stvaranju i preobražuju fenola jesu fenoloksidaze. Preko svoje uloge u metabolizmu fenola, bakar u značajnoj mjeri utiče i na procese lignifikacije tj. sinteze i ugrađivanja lignina u mehanička tkiva i sprovodne sudove.

Na obezbjeđenost biljaka sa bakrom kao i na njegovu fiziološku aktivnost mogu da utiču i drugi elementi, u prvom redu metali. Poznat je antagonizam, naročito pri većim koncentracijama, između bakra sa jedne i *Fe*, *Mn*, *Al* i *Zn* s druge strane (Sandmann & Boger , 1980 a, 1980 b).

Nedostatak bakra kod biljaka je veoma rasprostranjena pojava, a osjetljivost pojedinih vrsta na njegov nedostatak je različita. Kao simptomi nedostatka bakra često se navode: hloroza, nekroza, odumiranje vršnih izdanaka, smanjenje porasta i prinosa biljaka i na kraju njihovo odumiranje. Ovi simptomi međutim, nisu svojstveni samo nedostatku bakra. Tipični nedostaci bakra su venjenje, uvijanje listova, odumiranje najmlađih listova, kao i određene anatomske promjene, u prvom redu poremećaj u građi, provodnih sistema i mehaničkih tkiva. Zbog poremećenog vodnog režima pri nedostatku bakra listovi gube turgor i uvijaju se slično kao u uslovima suše.

Nedostatak bakra se obično javlja na alkalnim krečnim, lakim pjeskovitim i tresetnim zemljištima bogatim sa organskom materijom. Nasuprot ovom, višak bakra se

javlja na kiselim zemljištima u kojima sadržaj bakra pristupačnog za biljke može ponekada da bude veoma visok. Visoke koncentracije bakra u mnogim biljkama smanjuju porast korijena i to u znatno većoj mjeri nego nadzemnih organa. Prvi znaci viška se obično javljaju na starijim listovima u vidu hloroze na vrhu i po rubu listova. Korijen tih biljaka je mrke boje, kratak, zadebljao, sa malim brojem korjenovih dlačica (Reilly, 1969; Reilly *et al.*, 1970).

### 2.1.5. Kobalt (Co)

Kobalt je redovan sastojak biljnih ćelija. Njegova uloga u životnim procesima biljaka nije dovoljno poznata. Međutim naglašava uloga ovog elementa u simbiotskoj fiksaciji atmosferskog azota, oksidacionim procesima, kao i njegov pozitivan uticaj na prinos nekih gajenih biljaka. Ulazi u sastav vitaminina B<sub>12</sub> zbog čega je njegova prisutnost u biljkama od posebnog značaja za zdravlje čovjeka i životinja.

Kobalt spada u grupu polivalentnih metala ( $Co^{2+} \rightarrow Co^{3+}$ ) i zahvaljući tome može da učestvuje u oksido-redukcionim procesima. Kobalt ulazi i u sastav nekih metaloenzima. U ovu grupu enzima spadaju glicin-glicin dipeptidaza biljaka i životinja i lecitinaza izilovana iz *Clostridium perfringens*.

Prosječan sadržaj kobalta u zemljištu se kreće od 1 do 40 ppm, dok je njegova koncentracija u zemljišnom rastvoru veoma niska. Biljke u prosjeku usvajaju male količine kobalta, i to u vidu  $Co^{2+}$ -jona.

Sadržaj kobalta u suvoj materiji biljaka kreće se u širokim granicama i to najčešće od 0,02 od 0.4 ppm. Postoje izvjesne vrste biljaka koje su sposobne da u svojim organima nakupljaju i znatno veće količine kobalta, čak i preko 1000 ppm. Njegova raspodjela u biljkama je specifična. Više se nagomilava u generativnim nego u vegetativnim organima. Kod nekih biljaka u značajnoj mjeri se nagomilava u prašnicima, žigu i stubiću. U listovima se pretežno nagomilava po ivici. Kobalt se u značajnoj mjeri nagomilava i u hloroplastima (Mitchell, 1972).

Simptomi nedostatka kobalta kod viših biljaka nisu dovoljno poznati izuzev kod mahunarki, kod kojih se pri nedovoljnoj obezbjeđenosti ovim elementom, uočavaju znaci

nedostatka azota. Kao posljedica nedostatka kobalta na mladim listovima se javlja hloroza. Za razliku od simptoma prouzrokovanih nedostacima kobalta, simptomi viška kobalta, na biljkama u prirodi u normalnim uslovima još nisu uočeni, čak ni na serpentinskim zemljištima koja obično sadrže veće količine kobalta. U osnovi višak kobalta izaziva hlorozu i nekrozu a u ekstremnim slučajevima može da dovede i do odumiranja i opadanja listova. Takođe višak kobalta izaziva i određene morfološke promjene na korjenu, koji dobija tamnu boju. Usled antagonizma, povećani sadržaj kobalta dovodi do nedostatka gvožđa.

Pored navedenih neophodnih mikroelemenata, u biljkama se nalazi još oko 40-tak mikroelemenata čija pojedinačna koncentracija u suvoj materiji biljaka, obično ne prelazi 2 ppm. Za neke od njih je utvrđeno da u određenim koncentracijama mogu povoljno da djeluju na sintezu organske materije biljaka ali i da učestvuju u fiziološko-biohemjskim procesima. Ovdje se prije svega ubrajaju : *Pb, As, Cd, Ni, Cr* i dr.

**Hrom (Cr)** - nije osnovni biljni element, ali je veoma značajan u metaboličkim procesima sisara. Serpentinsko zemljište je toksično za mnoge biljke i uopšteno se može pretpostaviti da prisustvo hroma zajedno sa niklom doprinosi još većoj fitotoksičnosti. Utvrđeno je da biljke koje rastu na ovakvom zemljištu zahtijevaju izvjestan stepen adaptacije na prisustvu hroma u toksičnim koncentracijama, tako da se mora voditi računa o relativnom sadržaju hroma u samim vrstama. Najveći broj biljnih vrsta koji se javlja na *Cr* – bogatom zemljištu ne sadrži znatnu količinu metala u sebi sa izuzetkom vrste *Leptospermum scoparium (Myrtaceae)* sa serpentinskim zemljišta na Novom Zelandu sadrži 20,00 ppm *Cr* u lišću (Lyon et. al., 1969 ; Bowen, 1966 ; Pratt ,1966).

**Kadmijum (Cd)** - se u normalnim uslovima ne nalazi u zemljištu u velikoj koncentraciji. Međutim pod uticajem određenih industrijskih procesa dolazi do povećanja koncentracije kadmijuma kako u atmosferi, tako i u zemljištu. Usvajanje kadmijuma od strane biljaka u velikoj mjeri je zavisno od pH vrijednosti i sadržaja fosfora (Miller et al., 1976). U malim koncentracijama kadmijum nije toksičan za biljke. Ipak, kod nekih biljnih vrsta zahvaljujući procesima akumulacije, koncentracija kadmijuma se postepeno povećava, i preko lanca ishrane postaje toksična čak i za životinje koje ove biljne vrste koriste u svojoj ishrani (Vallee & Ulmer, 1972). Visoka

koncentracija kadmijuma u biljnim vrstama izaziva hlorozu listova, što dovodi do usporavanja fotosinteze, inhibicije respiracije, mitohondijalnog transporta elektrona, enzimске aktivnosti i sl. (Lee *et al.*, 1976). Root *et al.*, 1975 su pokazali da  $Cd^{2+}$  jon ima snažan uticaj na usvajanje i transport cinka posebno kod vrste *Zea mays*.

**Olovo (Pb)** – Što se tiče olova poznato je da djeluje veoma toksično na živi svijet. Međutim, u literaturi postoje podaci i o stimulativnom dejstvu malih doza ovog elementa na porast biljaka. Njegov sadržaj u suvoj materiji biljaka kreće se od 0,3 do 1,5 ppm. Pošto izduvni gasovi motornih vozila sadrže olovo u blizini saobraćajnica, njegov udio u biljakama se znatno povećava, zbog čega treba izbjegavati njihovu upotrebu u ishrani ljudi i životinja.

Eksperimentalnim istraživanjima još od prije nekoliko decenija dokazano je da usvajanje jona i drugih čestica neke supstance od strane biljaka zavisi od određenih fizioloških procesa. Naime, utvrđeno je da usvajanje jona nije običan osmotsko-difuzni, već manje-više aktivan proces. Brzina kojom se biljka snadbjeva elementima zavisi od koncentracije jona koji mogu da difunduju u ćelije korijena, prije svega **pasivnim transportom**, niz gradijent vodnog i elektrohemijskog potencijala između zemljišta i biljke, ali često i takozvanim **aktivnim transportom**, kada se elementi akumuliraju u biljci čak i nasuprot gradijentu njihove koncentracije između zemljišta i biljke, pri čemu se koristi energija koja se dobija, prvenstveno iz procesa disanja.

Joni mineralnih elemenata apsorbirani, prije svega, korjenskim dlačicama, prolaze prije svega **apoplastičnim putem**, zajedno sa vodom, kroz ćelijske zidove i intercelularne prostore, a zatim i **simplastičnim putem**, već od ćelija rizoderma i parenhima kore korijena do ćelija endoderma, gdje izražena Kasparijeva zadebljanja ćelijskih zidova predstavljaju svojevrsan filter i hidrodbrambenu barijeru daljem apoplastičnom transportu vode i jona kroz korijen. Odatle, oni isključivo simplastičnim putem prolaze u protoplast i dalje se transportuju u provodni sistem korijena do svih dijelova biljke.



### 2.2.1. Biogeochemijski ciklus metala

Zahvaljujući čitavom nizu fizičkih, hemijskih i bioloških procesa u životnoj sredini kako je, već istaknuto tek u različitim vidovima migracije pojedinih hemijskih elemenata, a među njima i teških metala. Istraživanja pokazuju da postoji reverzibilno prelaženje metala iz litosfere u hidrosferu, atmosferu i biosferu i taj, cjelokupni kružni tok predstavlja **biogeochemijski ciklus** metala. Priroda geochemijskih procesa a time i migracija hemijskih elemenata u zemljištu, vodenim ekosistemima i atmosferi, u znatnoj mjeri je uslovljena ulogom i uticajem biljnih i životinjskih organizama. Od svih organizama biljke imaju svakako najveći značaj. Zahvaljujući prije svega procesima fotosinteze, one apsorbiraju iz stijena i zemljišta različite vrste metala (Boičenko *et al.*, 1985). S druge strane učestvujući u različitim oksido-redukcionim reakcijama tokom fotosinteze, metali se raspoređuju po različitim djelovima biljke (Laxen & Harrison, 1977) koncentrišući se u pojedinim vrstama biljnih ćelija. Pri tome oni se vezuju za čitav niz litofilnih supstanci, stvarajući različita kompleksna jedinjenja. Ispitujući uticaj fotosinteze na biogeochemijski ciklus metala Boičenko je konstatovao da *Fe*, *Mn*, *Zn* i *Mo* reaguju sa proteinima a *Ti* sa organskim fosfatima. Nastali biogeni kompleksi mogu biti veoma stabilni, te se kao takvi zajedno sa detritičnim materijalom pojavljuju u zemljištu i sedimentima obogaćujući ih odgovarajućim metalnim komponentama.

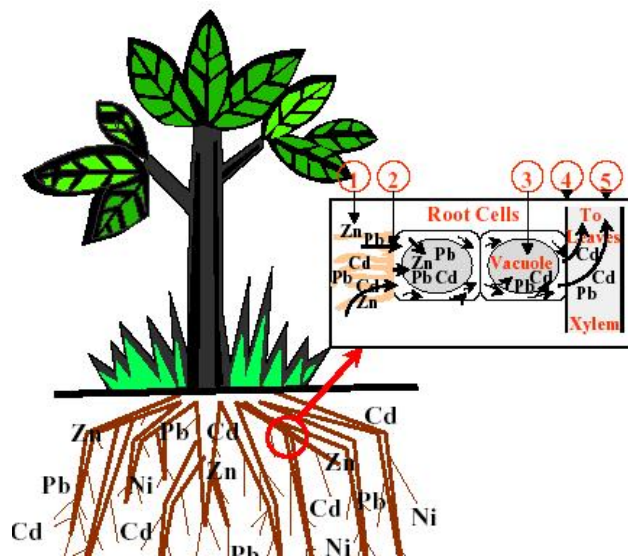
#### 2.2.4. Uklanjanje toksičnih metala iz vode i zemljišta upotrebom biljaka (akumulatora)

Zagađivanje vode i zemljišta toksičnim metalima predstavlja veliki problem za životnu sredinu. Kao jedna od specifičnih metoda za odstranjivanje metala iz ovih segmenata životne sredine, predstavlja korišćenje određenih biljaka koje imaju sposobnost akumulacije metala (Hudon, 1998). Ovaj način uklanjanja metala poznat je pod imenom fitoremedijacija a sastoji se iz:

1. **fitoekstrakcije** – vrši se upotrebom metal-akumulirajućih biljaka u cilju uklanjanja metala iz zemljišta
2. **rizofiltracije** - vrši se upotrebom korjenova biljaka u cilju uklanjanja metala iz vode

Kao što je poznato, zagađivanje biosfere toksičnim metalima intenzivirano je početkom industrijske revolucije, a primarne izvore zagađenja predstavljaju kako je ranije istaknuto, sagorijevanje fosilnih goriva, topljenje ruda, kanalizacione vode, pesticidi i sl. Toksične metale u osnovi možemo podijeliti na **teške metale** i **radionukleide**. S obzirom da ne podliježu hemijskoj razgradnji (degradaciji) predstavljaju veoma opasne i trajne zagađivače životne sredine.

Upotreba mikrobiološke bioremedijacije u cilju premještanja teških metala iz zagađenog zemljišta, većim dijelom je ograničena njihovom imobilizacijom putem padavina ili redukcijom. Većina biljaka ima sposobnost akumulacije teških metala iz vode i zemljišta od kojih su neki od velikog značaja za njihov rast i razvoj kao što su: *Fe*, *Mn*, *Zn*, *Cu*, *Mo* i *Ni*. Određen broj biljaka ima sposobnost akumulacije i metala koji nemaju određeni biološki značaj (*Cd*, *Cr*, *Pb*, *Co*, *Se*, *Hg*). Pretjerana akumulacija teških metala može biti toksična za većinu biljaka (Rascio, 1977; Peterson, 1983,1993; Salt *et al.*,1995; Lasat, 1996; Lasat *et al.*, 1998, 2000 ).



**slika 13. Usvajanje i akumulacija metala u biljkama**

1. adsorpcija metalnih jona na površini korijena
2. transport jona kroz ćelijsku membranu
3. imobilizacija teških metala (vezivanjem u kompleksna jedinjenja) u ćelijskim vakuolama
4. transport jona kroz provodna tkiva korijena (ksilem)
5. translokacija metalnih jona u nadzemne organe (stablo i listove)

Međutim, treba imati u vidu da je većina biljaka osjetljiva i na minimalne količine teških metala u podlozi. Ipak, veliki broj vrsta opstaje na staništima koja se odlikuju velikim količinama teških i toksičnih metala. Njihov opstanak moguć je zahvaljujući brojnim adaptivnim mehanizmima koje su razvile kako bi savladale nepovoljne uslove staništa. Najčešće biljke uspijevaju da na jedan ili više sledećih načina omoguće opstanak na mjestima sa velikom količinom teških metala:

- **ograničavaju** uzimanje i propustljivost teških metala kroz ćelijsku membranu
- **imobilišu** veće količine jona teških metala, tako što ih deponuju u ćelijske zidove i tako sprečavaju kontakt sa protoplastom
- **izdvajaju** apsorbirane teške metale vezujući ih u kompleksna jedinjenja, u ćelijskim vakuolama
- usvojene teške metale **vezuju** u citoplazmi za organska jedinjenja male molekulske težine, polipeptide i proteine koji sadrže amino-kiseline sa sumporom (cistein i metionin). Polipeptidi vezuju metal za slobodne SH-grupe cisteina, stvarajući

stabilne organo-metalne komplekse – *fitohelatine*. Ovako vezani joni teških metala mogu se zadržati u citoplazmi ili preneti do vakuole, u kojoj se u kiselj sredini, metalni jon oslobađa, a polipeptid transportuje nazad gdje obnavlja svoju ulogu (Grill *et al.*, 1985; Murphy & Taiz, 1995). Teški metali, među kojima su i oni neophodni biljkama kao mikroelementi, mogu se osloboditi iz pomenutih organo-metalnih kompleksa i uključiti u metabolizam biljake, ukoliko postoji potreba za njima.

Sposobnost biljaka da razviju otpornost na teške metale je genetički determinisana. Zemljišta bogata teškim metalima rezultat su geoloških i klimatskih promjena tokom pedogeneze, a biljke adaptirane na ovakva zemljišta bogata različitim metalima nazivaju se *metalofite*. One mogu biti indikatori, prisustva teških metala ili nekog posebnog hemijskog elementa u podlozi. Metalofite magacioniraju ogromne količine teških metala (0,5-8 g/kg).

### **3.3.3. Priprema uzoraka biljnog materijala za analizu**

Nakon donošenja u laboratoriju izvršena je determinacija uzoraka. Zatim su uzorci u odgovarajućoj prostoriji sušeni u hladu na sobnoj temperaturi. Sjeckanje materijala vršeno je makazama od kvalitetnog čelika, a zatim su uzorci pakovani u odgovarajuće papirne kese.

#### **3.3.3.1. Postupak za razaranje biljnog materijala (mokri postupak)**

Uzorke od oko 10 grama osušenog biljnog materijala (korijen) zagrijavati 6-8 h sa 10 cm<sup>3</sup> rastvora 16M HNO<sub>3</sub> u Kjeldalovom balonu od 50 cm<sup>3</sup> u koji su predhodno stavljene 2-3 staklene kuglice. Uzorke pažljivo zagrijavati na električnom grijaču ili po mogućnosti na pješčanom kupatilu sve dok se reakciona smješa u balonu ne svede na zapreminu od 3 cm<sup>3</sup>. Nakon hlađenja ostatku dodati 6cm<sup>3</sup> 70%-tne perhlorne kiseline i 3cm<sup>3</sup> koncentrovane sumporne kiseline, a zatim balon zagrijavati sve dok sve perhlorna

kiselina ne ispari i ne pojavi se bijele pare SO<sub>3</sub>. Ostatak ponovo ohladiti, a zatim dodati 1cm<sup>3</sup> 30%-tnog vodonik peroksida, a zatim reakcionu smesu ponovo zagrijevati do ključanja. Dodavanjem vodonik-peroksida i zagrijavanje nastaviti 2 puta i zatim produžiti oko 5 minuta nakon razvijanja bijelih para SO<sub>3</sub>. Nakon toga reakcionu smjesu ohladiti, prenijeti u normalni sud od 50 cm<sup>3</sup>, a zatim dodati 5cm<sup>3</sup> hidroksilamin-hidrohlorida (HONH<sub>2</sub>Cl) i dopuniti redestilovanom vodom do crte. Sadržaj metala u ispitivanim uzorcima određivan je atomsko-apsorpcionom spektrofotometrijom (AAS).

### **Određivanje koncentracije Fe,Mn,Zn i Cu AAS-om:**

Koncentracije navedenih elemenata u osnovnom rastvoru određuju se apsorpcijskom tehnikom pomoću atomsko-apsorpcionog spektrofotometra. Za mjerenje je neophodno pripremiti serije standarsnih rastvora s poznatim koncentracijama navedenih elemenata .Očitavanje s AAS-a je u µg g<sup>-1</sup> ili mg l<sup>-1</sup> (ranije oznake ppm) i označavaju koncentraciju ispitivanog elementa u osnovnom rastvoru-

Izračunavanje koncentracije ispitivanih teskih metala vrši se po formuli:

$$\mu\text{g g}^{-1} = \frac{\mathbf{C \times V}}{\mathbf{m}}$$

**µg g<sup>-1</sup>- konc. elementa u uzorku biljke**

**C - masena konc. ispitivanog rastvora uzorka**

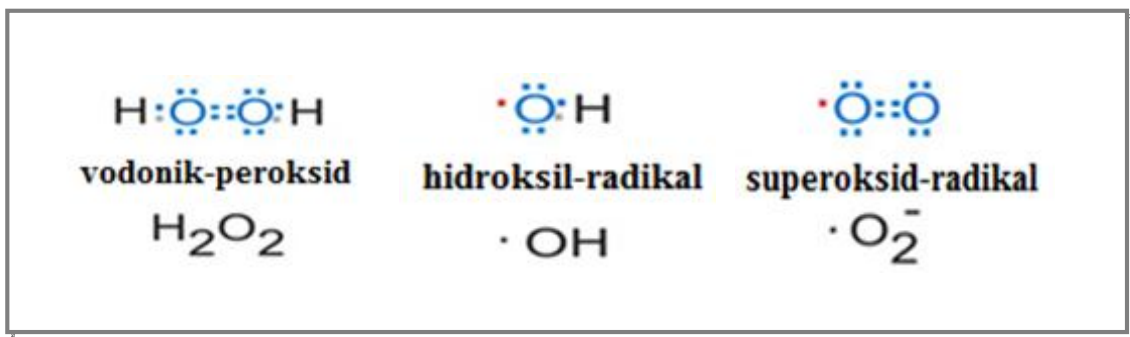
**u µg ml<sup>-1</sup> (očitana sa AAS-a)**

**V - zapremina osnovnog rastvora u ml**

**m - masa ispitivane biljke u g**

#### Vježba br. 4. Oksidativni stres i enzimi antioksidativne zaštite

U biljkama izloženim okolnim stresovima stvaraju se slobodni radikali (Sl.7), a biohemijski najznačajniji su reaktivni oblici kiseonika (ROS) uključujući i superoksid radikal ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ) i vodonikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Povrede uzorkovane slobodnim radikalima, nazvane oksidativni stres, jedan su od najvažnijih štetnih faktora u biljkama koje su izložene stresovima kao što su: suša, ekstremne temperature, prejak intezitet svjetla, zaslanjenost kao i zagađenost zemljišta (Wang i sar., 2005). Slobodni radikali oštećuju različite biološke makromolekule (oksidiraju lipide membrana, izazivaju denaturaciju proteina i mutaciju DNK) što dovodi do znatnog oštećenja ćelija, inhibicije fotosinteze kao i redukcije prinosa. Biljke (kao i drugi organizmi) posjeduju antioksidanse za odbranu od slobodnih radikala, a oni mogu biti enzimski i neenzimski.

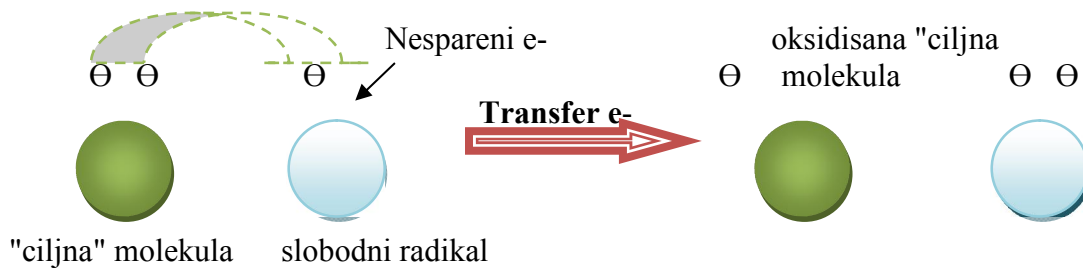


**Slika 7.** Elektronska struktura zajedničkih reaktivnih kiseoničnih vrsta (prema [https://sr.wikipedia.org/active\\_oxygen\\_species.svg](https://sr.wikipedia.org/active_oxygen_species.svg))

Antioksidansima nazivamo jedinjenja koja sprečavaju oksidaciju. Glavni kriterijum prema kome neko jedinjenje može biti svrstano u potencijalne antioksidanse jeste mogućnost da u malim koncentracijama u poređenju sa odgovarajućim supstratom, značajno odloži ili spriječi oksidaciju supstrata, tj. da ROS ispolje veći afinitet prema antioksidantu u odnosu na biosupstrat (Halliwell, 1994).

U evoluciji, kao adaptivni odgovor na toksično djelovanje kiseonika kod aerobnih organizama doslo je do stvaranja kompleksnih mehanizama zaštite od oksidativnih

oštećenja. Osnovna u-loga ovih mehanizama je da smanjuje količinu i nekontrolisano stvaranje reaktivnog oblika kiseonika (ROS) i njihovih prekursora u ćelijama. Zbog težnje ROS da spare nespren elektron ( $e^-$ ) u posljednjoj orbitali, oni se ponašaju kao snažni elektrofilni, odnosno jaki oksidansi.



**Slika 8.** Mehanizam reakcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (prema Djukić, M.: Oksidativni stres, Mono i Manjana, 2008)

U reakciji sa donatorom elektrona odnosno supstratom (biomolekul ili neko drugo jedinjenje), reaktivne kiseonične vrste se redukuju (primaju elektron) i time gube karakter ROS, a supstrat se oksidiše (gubi elektron) i postaje ROS druge generacije tzv. sekundarni ROS (Sl. 8.) i otpočinje lanac radikalnih reakcija. Tokom oksidativnih procesa u aerobnim uslovima u organizmima nastaju brojne ROS, ali najznačajniji su  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ,  $ROO^-$ ,  $HOO^-$  i drugi.

Antioksidanti sprečavaju inicijaciju ili prekidaju propagaciju lipidne peroksidacije. Proteini koji vezuju jone metala sprečavaju lipidnu peroksidaciju (LPx). Između dejstva različitih vrsta antioksidanata postoji sinergizam. Vjerovatno je da je za uravnoteženo antioksidantno dejstvo neophodno dejstvo i lipidnih i hidrofilnih antioksidantnih materija.

Antioksidativna zaštita kao fiziološki proces funkcioniše neprestano u zdravoj biljci (organizmu) i ima za cilj da spriječi štetno djelovanje prooksidativnih faktora. Antioksidansi su definisani kao supstance koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidativnim supstancama, dovode do odlaganja ili inhibicije oksidacije supstrata. Sistem

antioksidativne zaštite obuhvata enzimске i neenzimске antioksidante i djeluje na više nivoa (Aldini i sar. 2010).

- **uklanja kiseonik ili smanjuje njegovu koncentraciju**
- **uklanja jone metala koji su katalizatori u reakcijama oksidativnog stresa**
- **uklanja superoksidni anjon, vodonik peroksid i druga reaktivna kiseonikova jedinjenja**
- **vezuje slobodne radikale kao sto su hidroksil-,alkosil-,peroksil-radikali**

### **3.8.1. Mehanizmi antioksidativne zaštite**

Mehanizmi antioksidantne zaštite aerobnih organizama se razlikuju ali djeluju harmonično i sinhronizovano. Sistem zaštite od oksidativnih oštećenja obuhvata:

#### **a) primarnu antioksidantnu zaštitu**

- enzimski sistemi

Superoksid dismutaza(SOD), **Katalaza(CAT)** , **Gvajakol peroksidaza(GPx)**, Glutation peroksidaza(GSH-Px) Glutation reduktaza (GR) i dr.

- neenzimski sistemi

Askorbinska kiselina (vitaminC), L-tokoferol (vitaminE), **prolin**, vitaminA, karatenoidi, mokraćna kiselina, flavenoidi i druga fenolna jedinjenja.

#### **b) sekundarnu antioksidantnu zaštitu**

Proteni koji sadrže jone gvožđa ili bakra, transferrin ,albumin, ceruloplazmin i dr.

Uloga enzima antioksidativne zaštite je u biotransformaciji primarnih i sekundarnih reaktivnih vrsta u manje aktivna jedinjenja, kao i u obezbjeđivanju dovoljne količine redukcionih ekvivalenata u ćeliji, neophodnih za prevenciju razvoja oksidativnog stresa. Od enzima antioksidativne zaštite najznačajniji su: superoksidna dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza i glutacionreduktaza (Aldini i sar, 2010).

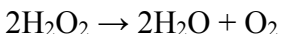


### 3.8.2. Enzimski antioksidansi

#### Katalaza (CAT)

Katalaza (EC 1.11.1.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oksidoreduktaza) je enzim pronađen u biljkama, životinjama i aerobnim mikroorganizmima gdje katalizira brzu razgradnju vodonik peroksida. Unutar ćelije katalaze ima dosta u peroksisomima i katalitički je vrlo aktivna. Biljne katalaze su tetramerni enzimi, molekulske mase od 54 do 59 kDa te sadrže hem kao prostetičku grupu. Ovaj enzim pokazuje dvojni katalitičku aktivnost, katalaznu i peroksidaznu.

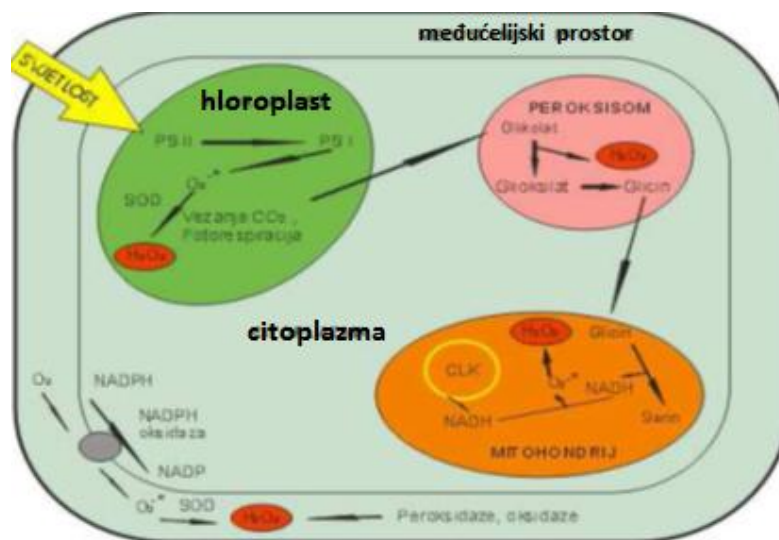
Pri katalaznoj aktivnosti enzim katalizira razgradnju vodonik peroksida na vodu i kiseonik:



dok pri peroksidaznoj aktivnosti enzim katalizira oksidaciju supstrata (metanol, etanol, formaldehid, nitrit ili elementarna živa) pri čemu nastaje voda:



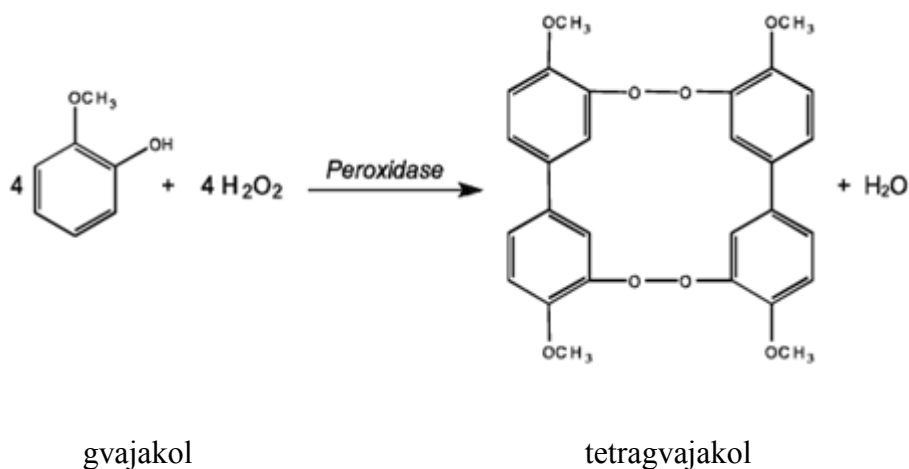
Katalaza je enzim vrlo velike aktivnosti. Jedan molekul katalaze može redukovati šest miliona molekula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do kiseonika i vode u jednoj minuti. Velika važnost brze katalize vodonik peroksida potrebna je jer je on snažan i jako reaktivan oksidans koji može oštetiti biološke molekule i time uzrokovati metaboličke poremećaje. Vodonik peroksid nastaje kao produkt u mnogim reakcijama procesa fotosinteze, ćelijskog disanja (Sl. 9), a javlja se i kao produkt djelovanja oksidaza kao što su: glukoza oksidaza, NADPH oksidaza i razne aminokiselinske oksidaze (Gill i Tuteja, 2010).



Slika 9. Glavni izvori vodonik peroksida tokom fotosinteze u C3 biljkama. (prema Šlesak i sar.,2007)

### Gvajakol-peroksidaza (GPx)

Peroksidaze su glikoproteini koji u aktivnom centru sadrže Fe, a katalizuju oksido-redukcione reakcije između  $H_2O_2$  i različitih reduktanata. Gvajakol-peroksidaza pripada biljnim peroksidazama skupine III (GPx, EC 1.11. 1.7.) koje su uključene u regulaciji različitih fizioloških procesa kao i u antioksidacionom odgovoru u stresnim uslovima (Mathe i sar., 2010). Gvajakol je najčešće korišten supstrat za određivanje aktivnosti enzima. Njegovom oksidacijom u prisustvu  $H_2O_2$  i GPx nastaje produkt žuto-smeđe boje- tetragvajakol (Sl.10)



Slika 10. Oksidacija gvajakola u terta-gvajakol (prema <http://nationchemistry.com/peroxidase/>)

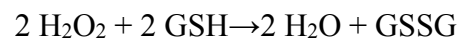
Od svih postojećih peroksidaza u eukariotskim i prokariotskim organizmima samo su ove biljne peroksidaze grupe III prisutne u toliko velikom broju izoenzimskih formi, pa se pretpostavlja da je to razlog njihove uključenosti u različite metaboličke procese tokom čitavog životnog ciklusa (Almargo i sar., 2009).

Pored učešća u peroksidacijskom ciklusu u kojim se uklanja  $H_2O_2$ , biljne peroksidaze grupe III učestvuju i u hidroksilnom ciklusu pri kome se oslobađa ROS.

### **Glutation peroksidaza(GSH-Px)**

Glutation peroksidaza je tetramerni enzim za čiju je aktivnost neophodan selen. Ovaj seleno protein u svom aktivnom centru umjesto normalnog cisteina, sadrži selenocistein. Selen koji je zamijenio sumpor u cisteinu, povećava nukleofilna svojstva i jonizuje brže da oslobodi proton, čime se postiže veća efikasnost enzima kao katalizatora.

Glutation peroksidaza zajedno sa katalazom učestvuje u otklanjanju  $H_2O_2$ . U reakciji sa  $H_2O_2$  redukovani oblik glutaciona (GSH) prelazi u oksidovani oblik (GSSG) i nastaje voda:



Peroksidaze koje sadrže selen sačinjavaju familiju kojoj pripadaju najmanje četiri tipa enzima. Aktivnost selen zavisnih glutacion peroksidaza determinišu sledeći faktori:

1. Raspoloživost selena za sintezu enzima
2. Odgovarajuća koncentracija glutaciona
3. Aktivnost glutacion reduktaze
4. Količina stvorenog NADPH u pentozofosfatnom putu

“Klasicna” glutacion peroksidaza (cGHx) djeluje na  $2H_2O$  i hidroperokside masnih kiselina, ali ne i na esterifikovane lipide kao što su oni prisutni u lipoproteinima.

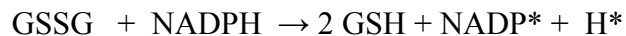
Fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza (PHGPx) je jedini enzim za koji se zna da redukuje lipidne hidroperoksidge iz lipoproteina. Ova izoforma je vezana za membranu i kao cGHx se ne nalazi u extracelularnim tecnosti.

### **Superoksid dismutaza(SOD)**

Superoksid dismutaza katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala u vodonik peroksid i molekulski kiseonik, pri čemu se jedan molekul  $O_2\bullet$  oksidiše u  $O_2$ , a drugi redukuje u  $H_2O_2$ . Dalje se vodonik peroksid pod dejstvom katalaze i glutation peroksidaze razlaže do vode i molekularnog kiseonika. Ovim mehanizmima zaštite sprečavaju se oksidativna oštećenja ćelije (Domitrović i sar., 2006)

### **Glutation reduktaza(GR)**

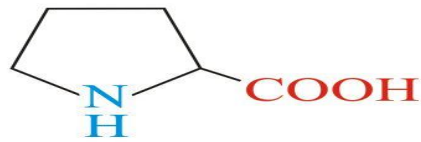
Glutation reduktaza ima ulogu u održavanju rezervi redukovanog glutaciona u ćeliji, tako što koristi redukovanu energiju iz pentozno fosfatnog puta (NADPH). Čak i kada su prisutne velike kolicine  $H_2O_2$  ovaj enzim je veoma efikasan u održavanju celiskih rezervi glutaciona



Intracelularni odnos oksidativnog i redukovanog glutaciona (GSSG/GSH) je dokaz oksidovanog stanja ćelije i pokazatelj detoksikacionih kapaciteta ćelije.

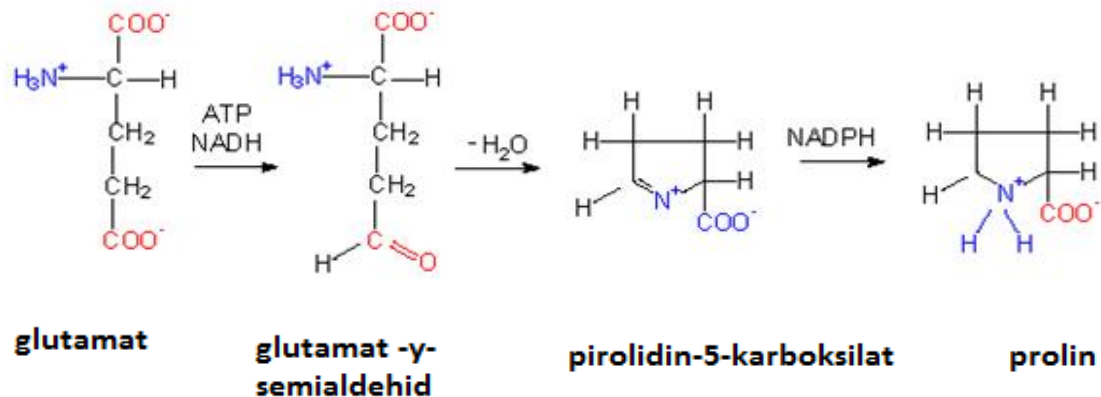
#### **3.7.3. Prolin kao indikator stresa izazvanog teškim metalima**

Akumulacija aminokiseline prolina u pojedinim djelovima biljke najčešće se vezuje za osmoregulaciju biljnih tkiva u uslovima vodenog stresa, te se ovo jedinjenje svrstava u grupu tzv. kompatibilnih osmolita. Kako teški metali dovode do poremećaja u vodnom režimu biljaka, nakupljanje prolina u biljkama često se uzima kao biomarker i za stres izazvan teškim metalima (Singh i sar., 1973b; Bassi i Sharma, 1993). Prolin učestvuje u antioksidacijskom odgovoru kao jedan od neenzimskih antioksidanata (Sl.11)



a.

b.



**Slika 11. a.** struktura prolina **b.** šema biosinteze prolina (prema [http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/aa/glutamate.html](http://www.biology.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/aa/glutamate.html))

Prolin štiti membrane i proteine od štetnog djelovanja visokih koncentracija neorganskih jona, kao i temperaturnih ekstrema. On se u stresnim uslovima akumulira u puno većoj količini u odnosu na druge aminokiseline (Valliyodan i Nguyen, 2006). Prolin se akumulira u citoplazmi gdje u stresnim uslovima može činiti i više od 80% slobodnih aminokiselina, s koncentracijom i do 200 mM, čime značajno doprinosi osmotskoj regulaciji citoplazme. Otpornost različitih genotipova prema stresnim uslovima može se ocjeniti prema sposobnosti akumulacije slobodnog prolina. Takođe se smatra da prolin obezbjeđuje energiju, potrebnu za metaboličke procese vezane za rast i razvoj biljka. Pošto je oksidacija jednog molekula prolina ekvivalent 30 molekula ATP-a, on se čini kao dobro pogodna aminokiselina u pogledu snadbjevanja energijom za ćelijske metaboličke procese (Szabados i Savoure, 2009)

Mnoga istraživanja utvrdila su povećanu akumulaciju prolina u biljnom tkivu pod uticajem Cd, Ni Pb. (Handique i Handique, 2009; Dinakar i sar., 2009). Prihvaćeno je

mišljenje da je akumulacija prolina pod uticajem stresa, genetski regulisan proces, pri kom dolazi do intenzivne ekspresije gena koji regulišu njegovu sintezu i depresije gena koji utiču na njegovu degradaciju. Takođe utvrđeno je da se inhibira sinteza proteina koji u svom sastavu sadrže prolin, a stimuliše razlaganje već sintetisanih proteina (Alia i Saradahi, 1991).

## **Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT)**

Aktivnost katalaze određivana je spektrofotometrijskom metodom po Luck (1974).

Uzorke listova i korijena težine 1g isjeckati makazama, staviti u avan i macerirati tučkom. Maceriranje obaviti brzo uz dodatak male količine fosfatnog pufera (10 ml), sve dok se smjesa ne homogenizuje a zatim sadržaj iz avana kvantitativno prenijeti u plastičnu epruvetu i centrifugirati 10 min na temperaturi od 1-4°C.

Nakon ekstrakcije u fosfatnom puferu ekstrakt treba razblažiti kako bi se pristupilo očitavanju vrijednosti katalaze u spektrofotometru koji je predhodno podešen na talasnu duzinu  $\lambda = 240\text{nm}$ . U kivetu spektrofotometra se dodaje 3ml vodonik peroksid-fosf.pufer + 0,01-0,04ml ekstrakta gde se očitavanje vrši nakon 3min.

Izračunavanje aktivnosti enzima katalaze vršeno je po formuli:

$$\text{Aktivnost u ekstraktu (U/ml)} = (\Delta A_{\text{min}} \times V_{\text{rs}}) / (0,0436 \times V_{\text{uz}})$$

U- količina enzima koju troši 1  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  u minuti na 25 stepeni, pH= 7

$\Delta A_{\text{min}}$ - promjena apsorbance po minuti na početku reakcije

$V_{\text{rs}}$  - zapremina reakcione smješe u kivetu

$V_{\text{uz}}$ - zapremina uzorka u reakcionoj smješi

0,0436- milimolarni ekstinkcioni koeficijent za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240nm

### **Priprema fosfatnog pufera (0,067M)**

Rastvoriti 0,352 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 0,72g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  u 100ml destilovane vode  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  fosfatni pufer 0,16ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  rastvorimo u 100ml pripremljenog fosfatnog pufera

## Vježba br 5. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja aminokiseline prolina

Sadržaj prolina određivana je spektrofotometrijskom metodom ( Bates at al.,1973.)

0,5g biljnog materijala se homogenizira sa 10ml sulfosalicilne kiseline. Zatim se vrši centrifugiranje na 12000g 10min.

U plastičnu epruvetu otpipetira se 2ml filtrata, i doda 2ml ninhidrin reagensa i 2ml ledene sirćetne kiseline. Inkubacija se vrši na 100°C 1h, te se nakon inkubacije reakcija prekida prenošenjem epruveta na led. Ekstrahirati prolin dodavanjem po 4ml toluena , uz vorteksiranje 15-20s. Nakon što se epruvete zagriju i odvoji toluenski sloj , automatskom pipetom se pipetira toluenski sloj s ekstrahiranim prolinom u kivetu za spektrofotometar. Mjeri se transmisija na 520nm uz podešavanje 0 čistim toluenom a 100% transmisije sa standardom 0. Koncentracija prolina očitava se konstuisanjem standardne krive prolina.

$$\text{Sadržaj prolina } (\mu\text{g/g SvT}) = \frac{5 * X}{\text{masa uzorka (g)}}$$

X ( $\mu\text{g}$ prolina /2ml) – conc. prolina s kalibracijskog dijagrama

5-razredjenje pri ekstrakciji ( 1g uzorka u 10ml sulfosalicilne kiseline, od toga 2ml uzeto za određivanje)

Preračunavanje dobijenog sadržaja prolina iz  $\mu\text{g/g}$  u  $\mu\text{mol/g}$  korišćenjem sledeće formule:

$$\mu\text{mol/g} = \frac{\mu\text{gprolina /2ml} * \text{ml toluena}}{115,5} \times \frac{5}{\text{g(uzorka)}}$$

gdje je

## Vježba br.6. **Određivanje deficita difuznog pritiska**

Određivanje sile usvajanja vode (DDP) tkiva ili čitavih organa biljke obavlja se pronalaženjem rastvora čiji osmotski pritisak odgovara ispitivanom uzorku te u njemu ne dolazi do usvajanja odnosno izdvajanja vode.

Praktično mjerenje DDP vrši se prema promjeni težine ili volumena biljnog tkiva kao i promjene koncentracije rastvora u kojem je tkivo potopljeno, uz pomoć **refraktometra**.

### Opis metode:

Priredi se niz rastvora saharoze od 0.2-1.0 mol dm<sup>-3</sup> i prenese po 10 cm<sup>3</sup> u dva niza epruveta. U jedan niz otopina se potope komadići ispitivanog biljnog tkiva (podjednakog broja i veličine). U rastvorima bez biljnog tkiva se odredi refraktometrom refrakcijski indeks ili % suhe tvari. Nakon 30 minuta utvrđuje se koncentracija rastvora saharoze u kojima je bilo tkivo. Rastvor u kojem nema promjene koncentracije (% suve materije) ima osmotsku vrijednost jednaku osmotskoj vrijednosti biljnog tkiva. U slučaju da se ta vrijednost nalazi između koncentracija se izračuna interpolacijom uz pomoć kalibracijskog dijagrama. Na apscisu koordinatnog sistema se nanosi koncentracija saharoze (0.2-1.0 M) a na ordinatu % suhe materije rastvora. Unošenjem podataka za otopine bez biljnog tkiva i povezivanjem dobijenih točaka dobije se pravac br. 1, a podaci za otopine s biljnim tkivom daju pravac br. 2. Iz presjeka ovih pravaca se spuštanjem normale na apscisu očitava koncentracija (c) **izotoničnog rastvora saharoze** čija je osmotska vrijednost, odnosno koncentracija jednaka onoj u biljnom tkivu. Rastvor s manjom koncentracijom je **hipotoničan** i u njima dolazi do povećanja koncentracije uslijed prelaska vode u ispitivano tkivo koje povećava svoj volumen. Rastvor s većom početnom koncentracijom zbog svoje veće osmotske vrijednosti "izvlači" vodu iz tkiva, pri tome se razređuje (sadržaj suve materije se smanjuje) i naziva se **hipertoničan**.

**DDP se računa prema izrazu:**

$$\text{DDP} = - R T C i$$

gdje je :

*R*- univerzalna gasna konstanta (8,314kPa mol<sup>-1</sup>dm<sup>-3</sup>K<sup>-1</sup>)

*T*- apsolutna temperatura u K

*c*- koncentracija izotoničnog rastvora saharoze (mol dm<sup>-3</sup>)

*i* – Van t Hoff-ov koeficijent ( za neelektrolite = 1, za elektrolite =1,5)



