

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 12.05.2023. године, на основу молбе ментора др Тамаре Ракић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Милијане Ж. Ковачевић**, асистента Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „**Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала**”, у саставу: др Гордана Андрејић, научни сарадник Института за примену нуклеарне енергије Универзитета у Београду, др Ксенија Јаковљевић, виши научни сарадник Биолошког факултета Универзитета у Београду; др Живко Јовановић, виши научни сарадник, „Pharm-Olam International”, Београд.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Милијане Ж. Ковачевић** (рођ. Прица) под насловом „**Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала**” написана је на укупно 127 страна и састоји се од следећих поглавља: **Увод** (стр. 1-18), **Циљеви рада** (стр. 19-20), **Материјал и методе** (стр. 21-29), **Резултати** (стр. 30-63), **Дискусија** (стр. 64-78), **Закључци** (стр. 79), **Литература** (стр. 80-102) и **Прилози** (стр. 103-112). Поред наведеног, докторска дисертација обухвата и биографију аутора, као и следеће целине: насловну страну на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, захвалницу, сажетак дисертације на српском и енглеском језику, листу скраћеница, садржај, изјаву о ауторству, изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и изјаву о коришћењу.

Докторска дисертација садржи укупно 14 слика (4 у поглављу Увод, 1 у поглављу Циљеви рада, 1 у поглављу Материјал и методе, 8 у поглављу Резултати), 16 графикона (16 у поглављу Резултати) и 20 табела (1 у поглављу Увод, 6 у поглављу Резултати и 13 у поглављу Прилози). Поглавље Литература садржи 414 библиографских јединица.

#### Анализа докторске дисертације

Ова докторска дисертација припада ужој научној области екологије, биогеографије и заштите животне средине.

Предмет истраживања докторске дисертације Милијане Ж. Ковачевић је проучавање адаптивних одговора *Phragmites australis* на ефекте стреса изазваног изузетно неповољним хемијским одликама јаловине рудника метала и процена

потенцијала ове биљне врсте за фитостабилизацију и пречишћавање отпадних вода које се из преливног система флотацијских језера рудника испуштају у животну средину

Поглавље **УВОД** је подељено у 5 целина. У оквиру прва два потпоглавља изложена је научна проблематика, подржана бројним литературним наводима, на основу које је дефинисан предмет истраживања ове докторске дисертације. Прво потпоглавље описује проблематику загађености животне средине металима, са посебним освртом на рударство и одлагалишта јаловине која представљају извор загађења металима до кога долази услед наношења финих честица флотационе јаловине ветром и водом у околне природне екосистеме (природна земљишта и површинске воде), као и услед процеђивања мобилне фракције метала кроз слојеве јаловине до подземних вода. Друго потпоглавље даје преглед досадашњих сазнања о биолошкој улози, изворима загађења и утицају повећаних концентрација одређених метала (Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Co, Cr) на физиолошке процесе и раст биљака. У оквиру трећег потпоглавља је дат детаљан опис досадашњих сазнања о металима индукованом оксидативном стресу у биљној ћелији и утицају реактивних форми кисеоника (ROS) на биомолекуле, као и улози различитих компоненти антиоксидативног система биљака у уклањању насталих ROS. Потпоглавље четири даје преглед техника фиторемедијације која представља „green clean“ технологију и користи одабране биљне врсте како би се полутанти уклонили из животне средине или учинили мање доступним и тиме мање токсичним. Посебно су описане географска дистрибуција, као и еколошке карактеристике обичне трске (*Phragmites australis*) која испољава изузетну адаптабилност на различите услове животне средине захваљујући широким еколошким валенцама у односу на бројне еколошке факторе. Такође су наведена и досадашња сазнања о способности ове биљне врсте да толерише повишене концентрације одређених метала, првенствено пореклом из канализационих отпадних вода.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ РАДА** дефинисани су циљеви истраживања докторске дисертације. Основни циљеви докторске дисертације усмерени су ка утврђивању хемијских карактеристика јаловине коју спонтано обраста *P. australis*, степена акумулације и транслокације метала у оквиру биљног организма, местима доминантне акумулације појединих метала, утврђивању фиторемедијационог потенцијала биљке и одређивању утицаја акумулираних метала на одабране биохемијске параметре корена и листова биљака са одлагалишта рудничке и флотационе јаловине, као и процена могућности примене *P. australis* за пречишћавање металима оптерећених отпадних вода из рудника метала.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи укупно четири потпоглавља која су подељена у неколико одељака. У оквиру првог потпоглавља дат је опис локалитета на којима су сакупљени биљни материјал и подлога. У другом потпоглављу су описани време и начин прикуљања седимента и јаловине и представљене су методе за одређивање њихових хемијских одлика (активне и супституционе киселости, садржаја органског С и органске материје, садржаја укупног N, лако приступачних облика Р и К, као и концентрација псеудототалних и приступачних метала - **Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Cr и Co**). У трећем потпоглављу описан је период и начин сакупљања биљног

материјала на терену, његов транспорт до лабораторије и припрема за даље анализе, и детаљно су описане методе за анализу биљног материјала. Приказани су:

- анализа садржаја горе наведених метала у корену, ризому, стаблу и листовима биљака;
- формуле за израчунавање биоконцентрационог (BCF), биоакумулационог (BAF) и транслокационог фактора (TF) на основу концентрација метала у супстрату и деловима биљке;
- процедуре за детекцију метала акумулираних у повишеним концентрацијама у биљним ткивима корена, ризома, стабла и листа – хистохемијска детекција и детекција методом скенирајуће електронске микроскопије са енерго-дисперзивном спектрофотометријом (SEM-EDS);
- процедуре за одређивање концентрације фотосинтетских пигмената, хлорофила *a* и *b* и укупних каротеноида;
- процедуре за одређивање садржаја слободних и везаних фенола, укупног антиоксидативног капацитета и степена липидне пероксидације у листовима;
- протоколи за одређивање концентрације укупних протеина у корену и листовима, као и протоколи за одређивање активности ензима антиоксидативног система (супероксид дисмутазе, каталазе, аскорбат пероксидазе, гвајакол пероксидазе, глутатион редуктазе). У четвртном потпоглављу су наведене статистичке методе коришћене у обради података.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у 5 потпоглавља. У првом потпоглављу су описане хемијске одлике контролног седимента и узорак јаловине који су сакупљени у зони ризосфере трске са депонија јаловине више рудника. Добијени резултати показују да се узорци јаловине значајно разликују по рН вредности и количини органске материје. Узорци седимента са контролног станишта као и јаловине из Рудника и Бора 1 су биле неутралне реакције, док је јаловина из Бора 2 била ултракиселе реакције. Садржај органске материје је са прва три горе наведена локалитета био вишеструко већи у односу на јаловину из Бора 2. Узорци јаловине из Рудника и Бора 2 се одликују и вишеструко нижом концентрацијом укупног азота. Јаловина, посебно она из Рудника и Бора 2 се одликује и веома високим концентрацијама испитиваних метала. Тако су вишеструко више концентрације псеудоталног Mn, Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Co и Cr детектоване у флотационој јаловини из Рудника у односу на контролни седимент, у којој је садржај Mn, Zn, Pb, Co и Cr био значајно виши у односу на узорке јаловине из Бора (Бор 1 и Бор 2). Концентрације Zn, Pb и Cu у јаловини из Бора 1 и 2 су биле више у односу на контролни седимент, са посебно високим и уједно највишим забележеним концентрацијама псеудоталног Cu у јаловини из Бора 1. У складу са тим, највише концентрације приступачног Mn, Ni, Zn, Pb, Cd, Co и Cr детектоване су у јаловини из Рудника, док су највише концентрације приступачног Cu измерене у јаловини из Бора 1.

Друго потпоглавље даје детаљан приказ концентрација испитиваних метала у деловима биљке (корену, ризому, стаблу и листу) у два периода узорковања (јуну и септембру). Резултати показују да је садржај испитиваних метала у корену биљака са јаловишта у позитивној корелацији са њиховим садржајем у јаловини. Концентрације Zn, Pb, Cu, Cd и Co у корену су биле више у биљкама узоркованим на депонијама јаловине у односу на

контролни седимент. Такође, садржај Zn, Pb и Co код свих биљака са јаловине, као и садржај Cu у биљкама из Бора 1 је био виши у узорцима корена биљака узоркованих у септембру у односу на јун. У испитиваним биљкама са одлагалишта јаловине у оба периода узорковања, са изузетком Mn (јун, септембар) и Cr (септембар) у биљкама из Бора 1, установљене су значајно више концентрације испитиваних метала у кореновима у односу на остале делове биљке. Овде је дат и приказ стехиометријских односа метала у листу и корену између оних метала за које се сматра да могу имати утицаја на мерене биохемијске параметре и нормално функционисање биљке.

У потпоглављу три су дати односи концентрација метала у седименту и биљним деловима, а описани су биоконцентрационим, биоакумулационим и транслокационим фактором којима се процењује фиторемедијациони потенцијал биљке.

У четвртном потпоглављу су приказани резултати хистохемијске детекције метала у ткивима корена, ризома, стабла и листова, а на основу специфичне обојености комплекса реагенса са одређеним металом. Специфична обојеност појединих ткива представља додатак резултатима квантитативних анализа и олакшава разумевање акумулације и дистрибуције метала од интереса у оквиру биљног организма. Резултати показују да су у корену биљака Pb и Zn доминантно акумулирани у зидовима паренхимских ћелија сржи и ћелија егзодермиса, док је бакар доминантно акумулиран унутар ћелија ендодермиса, перицикла, као и унутар флоемских, склеренхимских, епидермалних и егзодермалних ћелија корена. У стаблу и ризому је образац акумулације испитиваних елемената готово идентичан: Pb и Zn су доминантно акумулирани у ћелијским зидовима склеренхимских ћелија позиционираним испод епидермиса и око проводних снопића, док је Cu акумулиран у зидовима епидермалних и склеренхимских ћелијама, ћелија паренхима примарне коре, као и унутар флоемских ћелија. У листу је Pb доминантно акумулирано у зидовима склеренхимских ћелија око проводних снопића, Zn је такође највећим делом акумулиран у ћелијским зидовима склеренхимских, али и флоемских ћелија, док је Cu доминантно акумулиран унутар ћелија паренхимске саре и флоема. Такође, не може се искључити значајније присуство испитиваних елемената у ћелијама хлоренхима листа. SEM-EDS метода омогућава визуализацију елемената присутних у повишеним концентрацијама и истовремено даје информацију о њиховом релативном масеном уделу у биљним ткивима. На основу микрографија пресека корена уочава се значајно присуство Fe, Zn, Cu и Pb у ћелијским зидовима епидермалних ћелија и ћелија егзодермиса, док је значајно присуство ових елемената потврђено и у зидовима паренхимских ћелија сржи. У епидермалним и егзодермалним ћелијама је детектован највећи релативни удео Pb, за којим следе Fe, Cu и Zn. У паренхимским ћелијама сржи је доминирало Pb, а потом следе Fe и Zn, док је релативни удео Cu у овим ћелијама био двоструко нижи у односу на епидермалне и егзодермалне ћелије. У паренхимским ћелијама коре стабла је детектовано значајније присуство Pb и Fe, док се у ћелијама хлоренхима листа уочава значајније присуство Pb и Zn.

У потпоглављу пет, подељеном у више сегмената, приказане су упоредне вредности биохемијских параметара биљака са различитих локалитета и време узорковања. Приказане су упоредне концентрације хлорофила (Chl) *a* и *b*, укупних каротеноида, укупних хлорофила и односа хлорофила *a* и *b* у листовима. Концентрације Chl *a*, укупних хлорофила и укупних каротеноида у јуну биле су сличне између биљака са различитих локалитета. У узорцима из септембра биљке из Рудника су показале значајно више концентрације Chl *a*, Chl *b* и

укупних хлорофила у односу на претходни период узорковања (јун), као и у односу на биљке са осталих локалитета. Што се тиче садржаја фенола у листовима, у биљкама из Бора 1 и Бора 2 детектоване су значајно више концентрације слободних и укупних фенола у септембру у односу на јуни, као и нешто више концентрације везаних фенола у листовима биљака из Бора 2 у односу на биљке са преосталих локалитета. Укупан антиоксидативни капацитет (ТАС) листова биљака са свих локалитета је био виши у односу на онај у кореновима и уједначен у оба периода узорковања. Укупан антиоксидативни капацитет коренова биљака из Бора 2 и Рудника у јуну је био статистички значајно виши у односу на биљке са преостала два локалитета (Бор 1 и контрола). У септембру је забележен значајан пад ТАС коренова код свих биљака са јаловишта (посебно изражен код биљака из Бора 2 и Рудника), па су његове вредности биле ниже у односу на ТАС контролних биљака. За разлику од коренова узоркованих у јуну код којих је степен липидне пероксидације (LP) био сличан између биљака са различитих супстрата, у кореновима биљака из Бора 2 и Рудника узоркованих у септембру степен пероксидације мембранских липида је био значајно виши у односу на претходни период и у односу на биљке са преостала два локалитета. У листовима је LP у јуну био највиши код контролних биљака и оних из Бора 2, док су у септембру њихове вредности биле вишеструко ниже у односу на јуни и сличне онима измереним код биљака са остала два локалитета. Садржај укупних протеина је у листовима свих биљака био сличан и увек виши у односу на садржај у кореновима. Концентрација укупних протеина у кореновима свих биљака са јаловишта, у оба периода узорковања, била значајно виша у односу на онај код контролних биљака. У наредном сегменту је описана активност ензима антиоксидативне заштите у корену и листовима биљака. Активност супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), аскорбат пероксидазе (APX) и гвајакол пероксидазе (POD) у корену биљака са депонија јаловине је била нижа у односу на контролне биљке. Иако коренови биљака са јаловине показују такође нижу активност и глутатион редуктазе (GR) у односу на контролне биљке, те разлике нису биле статистички значајне. У листовима биљака из Бора 1 и Рудника се уочава повишена активност CAT и APX, а код биљака из Рудника и повишена активност POD, у оба периода узорковања, као и повишена активност GR у септембру у листовима биљака из Рудника.

Поглавље **ДИСКУСИЈА** се састоји из четири потпоглавља. У првом потпоглављу кандидаткиња дискутује резултате анализе контролног седимента и узорака јаловине. Контролни седимент припада типу слабо развијеног алувијалног земљишта са неутралном рН реакцијом, а на основу садржаја органске материје припада групи доста хумозних земљишта и одликује се повољним минералним саставом. За разлику од њега, испитивани узорци јаловине се одликују високим садржајем већег броја потенцијално токсичних метала, често и недостатком органске материје што су главни отежавајући фактори за развој биљака карактеристични за овај тип станишта. Седимент из Бора 1 се сврстава у подлоге са неутралном рН реакцијом, док се висок садржај органске материје објашњава се присуством земљишта развијеног на ободном делу језера испод одлагалишта рудничке јаловине, одакле су биљке прикупљене. Одликује се умереним садржајем азота, што је повезано са високим садржајем органске материје у земљишту, добро је снабдевен приступачним калијумом, али је сиромашан у погледу садржаја лако приступачног фосфора. За разлику од претходног, активна и супституциона киселост јаловине пореклом из Бора 2 је ултракиселе реакције.

Ова флотациона јаловина се одликује веома ниским садржајем органске материје, а у складу са тим и изузетно ниским садржајем укупног азота и приступачног фосфора, што је чини веома неповољним супстратом за развој биљака. Овај седимент је такође умерено снабдевен лако приступачним калијумом. Јаловина пореклом из Рудника одликује се неутралном рН реакцијом. Иако се одликује високим садржајем органске материје, може се сматрати да је готово сав органски угљеник пореклом од ксантата који се користе као колектори метала у процесу флотирања сулфидних минерала у хидрометалуршком процесу, као и продуката њихове деградације. Због тога се ова флотациона јаловина одликује ниским садржајем азота, приступачног фосфора и калијума. Када је реч о псеудототалном садржају испитиваних метала у подлози, уочава се да је у јаловини пореклом из Рудника садржај готово свих испитиваних елемената (Mn, Ni, Zn, Pb, Cd, Cr, Co) значајно виши у односу на узорке са осталих локалитета, док је највиши садржај Cu детектован у јаловини из Бора 1. Када посматрамо доступност метала у односу на њихове псеудототалне концентрације, уочава се значајна позитивна корелација. Ипак, показано је и да фактори као што су рН реакција и количина органске материје могу значајно утицати на приступачност одређених метала биљкама. Према различитим изворима, концентрације биодоступних облика појединих метала су више од фитотоксичних концентрација. Тако је на пример концентрација приступачног Pb у јаловини из Рудника 25 пута виша од граничне концентрације за токсичност овог метала, док је концентрација Cu у седименту из Бора 1 38 пута виша од граничне концентрације за фитотоксичност.

У другом и трећем потпоглављу је дискутован садржај метала у биљкама у односу на подлогу на којој расту и упоређене су концентрације сваког од метала у различитим деловима биљке и између два периода узорковања. Када је реч о концентрацијама метала у биљкама, вредности у су по правилу значајно више у биљкама са рудничке и флотационе јаловине у односу на контролне биљке. Иако је садржај анализираних метала у корену биљака са јаловишта углавном у оквиру вредности које су токсичне за већину биљака, постављене граничне вредности концентрација су установљене првенствено за надземне делове биљака и стога нису нужно применљиве за корен. Такође, концентрације метала више су у септембру у односу на јуни, осим за Zn, што се може објаснити њиховом постепеном акумулацијом током времена и значајном имобилизацијом у оквиру кореновог система биљке. У биљкама са одлагалишта јаловине су, у оба периода узорковања, установљене значајно више концентрације испитиваних метала у кореновима у односу на остале делове биљке (са изузетком Mn у јуну и септембру и Cr у септембру код биљака из Бора 1). Обична трска акумулира и задржава испитиване метале доминантно на нивоу кореновог система и редукује њихову транслокацију у надземне делове биљке, што се уочава на основу велике разлике у концентрацијама метала између корена, стабла и листа, али и на основу добијених фактора (BCF, VAC, TF) који указују на избегавање као доминантну одбрамбену стратегију биљке. За све испитиване метале је установљен висок BCF који је за већину елемената далеко виши од 1, са изузетком Pb у биљкама са Рудника. Поређењем вредности BCF између биљака узоркованих у два периода, јуну и септембру исте године, уочава се да су BCF вредности више код биљака у септембру, што указује на акумулацију, имобилизацију а тиме и постепено концентровање метала у корену биљака током времена. Другачији тренд показује Zn који је биљка усвајала интензивније током периода раста (јун), па су у јуну вредности BCF вишеструко веће у односу на оне из

септембарског узорковања. Иако вредности BCF указују на одбрамбену стратегију биљке, не говоре много о количини метала коју биљка уклања из загађене, а посебно из екстремно загађене подлоге, као што је јаловина. Па тако, иако су најниже вредности BCF (Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cd, Cr) забележене код биљака из Рудника оне већину наведених елемената (Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Cr) акумулирају у највишим концентрацијама у корену. Једине вредности TF нешто веће од 1 су детектоване за Mn, Ni, Cd и Cr код биљака из ултракиселог супстрата Бора 2 (септембар). Добијени резултати показују да обична трска поседује висок потенцијал за фитостабилизацију готово свих испитиваних метала, будући да су вредности BCF > 1, а TF < 1. Као резултат имобилизације метала у корену и ограниченог трансфера у надземне делове биљке, концентрације метала у листовима су далеко ниже него у корену и остају испод горњих граничних концентрација на којима се могу јавити токсични ефекти на биљке. Иако у надземним деловима биљке концентрације метала нису високе, трска због великог годишњег приноса надземне биомасе може бити погодна и за фитоекстракцију метала од интереса.

У четвртом потпоглављу су дискутовани испитивани биохемијски параметри биљака који представљају одговор врсте *Phragmites australis* на повећан садржај метала у подлози. Један од анализираних параметара је садржај растворљивих протеина чије промене представљају индикатор метаболичких промена изазваних различитим типовима стреса. Иако су бројна ранија истраживања показала да повишене концентрације метала у корену најчешће изазивају смањење садржаја укупних солубилних протеина услед нарушавања њихове биосинтезе, у корену испитиваних биљака трске се јавља повећан садржај укупних солубилних протеина. То показује да су механизми укључени у имобилизацију метала у апопласту и симпласту ћелија корена трске довољно ефикасни да смање ниво слободних јона метала у ћелији и омогуће повећану синтезу протеина неопходних за одржавање функционалности ћелија корена, а која се код биљака јавља као типичан одговор сложеног адаптивног механизма ћелије на умерено повишене концентрације метала са циљем смањења металима индукованог стреса. Овај стимулаторни ефекат повишених концентрација метала се огледа у повећаној биосинтези специфичних група протеина, као што су протеини топлотног шока, протеолитички и антиоксидативни ензими који су укључени у хомеостазу протеина и редокс стања ћелије. Једна од последица повишених концентрација метала је повећано стварање реактивних форми кисеоника (ROS). Главну улогу у погледу заштите ћелије од ROS имају антиоксидативни ензими. Активности свих испитиваних ензима (SOD, CAT, APX, POD, GR) у корену у оба узорковања су генерално значајно ниже у односу на контролу, што указује на одређени степен инхибиције повезане са повишеним концентрацијама метала и њиховим директним и индиректним дејствима у ћелији. Анализа коефицијената корелације и стехиометријских односа метала у корену трске указује на то да је пад у укупној активности SOD последица интерференције метала у вишку (Zn, Cu, Cr) и металних кофактора за SOD.

Иако биљке са редукованом (Бор 2, Рудник) и оне са очуваном активношћу SOD (Бор 1) у септембру имају веома сличне активности CAT, APX и GR, као и сличан укупан антиоксидативни капацитет корена, оне се ипак значајно разликују по способности за уклањање слободних радикала. Биљке са очуваном активношћу SOD (Бор 1) имају низак степен липидне пероксидације мембрана, сличан ономе код контролних биљака, док биљке са редукованом активношћу SOD имају значајно виши степен оксидативних оштећења

мембранских липида. Ово указује на изузетну улогу SOD у одржавању редокс хомеостазе у металима оптерећеној ћелији, као и на повећано стварање супероксидног радикала у присуству наведених метала. Активности CAT и APX су значајно инхибиране код свих биљака са јаловишта, посебно код биљака узоркованих у септембру, и негативно су корелисане са концентрацијама Pb, Zn, Cu и Cr у корену, те се може закључити да је инхибиција активности последица не само високих концентрација сваког од наведених метала, већ и њиховог синергистичког дејства у корену. Ова инхибиција активности CAT може бити резултат смањене синтезе ензима или промене у организацији субјединица овог ензима. Активност POD је значајно нижа код биљака са јаловишта у односу на контролу, при чему је са порастом концентрација метала, посебно Pb, Zn и Cd, тај пад све израженији. Истовремено, биљке са најнижом POD активношћу уједно испољавају и најниже активности CAT и APX, што за резултат има повишено генерисање H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Овако настали H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се у присуству транзиционих метала редукује до хидроксилних радикала који директно изазивају оксидацију мембранских липида на шта указује и овде забележено повећање LP. Активност GR је од свих испитиваних ензима најмање погођена повишеним концентрацијама метала у корену. На сличан начин је инхибирана код свих биљака са јаловишта у септембарском узорковању и под највећим је утицајем повишених концентрација Cd, Cr, Cu и Zn. Може се претпоставити да је пад активности GR последица ирверзибилне инактивације активног места ензима металним коњугатима глутатиона. До снижене укупне активности GR чија је улога у регенерацији редукованог глутатиона (GSH) из оксидоване форме (GSSG) може доћи и услед искоришћавања GSH у биосинтези фитохелатина чиме се смањује укупни садржај глутатиона који је доступан у антиоксидативној заштити ћелије. У јуну, виши укупан антиоксидативни капацитет корена биљака са јаловишта у односу на контролу указује на активацију неензимске компоненте антиоксидативног система умерено повишеним концентрацијама метала, као и на то да је при генерално нижим концентрацијама метала у корену овај вид заштите довољан да неутралише негативне ефекте ROS, на шта указују и мале разлике у LP између контролних и биљака са јаловишта. Значајан пад укупног антиоксидативног капацитета коренова биљака са јаловишта у септембру у односу на претходни период, када је нижи и у односу на контролу, указује на знатну потрошњу неензимских антиоксиданата директно укључених у редукацију слободних радикала. Резултат изразито смањеног TAC као и најнижих активности SOD, CAT и APX код биљака из Бора 2 и Рудника је значајно повећање оксидативних оштећења мембранских липида. Иако биљке из Бора 2 у корену садрже нешто ниже концентрације метала у односу на биљке са других јаловишта, највиши ниво пероксидације мембранских липида и концентрације слободних фенола се могу повезати са додатним стресом – ултракиселом реакцијом средине у којој се корен налази. Наиме, висока концентрација H<sup>+</sup> јона у корену доводи до повећаног стварања ROS, као што су супероксидни радикал и водоник пероксид и изазива додатни оксидативни стрес. За разлику од корена, у листу се јавља различит биохемијски одговор на повишене концентрације метала који првенствено произилази из значајно нижих концентрација и другачијих комбинација метала акумулираних у овим деловима биљке. Повећана концентрација хлорофила (Chl *a*, Chl *b*) у листовима биљака из Рудника указује на стимулаторни ефекат умерено повишених концентрација метала (Pb) на биосинтезу хлорофила код трске. Листови свих биљака са јаловишта имају висок укупни антиоксидативни капацитет у оба



узорковања, сличан ономе код контролних биљака. Ово указује на релативно низак ниво стварања ROS услед мало повишених концентрација појединих метала у листовима, као и на добру заштиту од оксидативних оштећења базирану на неензимској компоненти коју у ћелији чине различите групе једињења. Изражен скок у концентрацији слободних фенола забележен у септембру у листовима биљака из Бора 1 и Бора 2, који садрже повишене концентрације неколико метала без познате биолошке улоге (Cd, Pb, Cr) указује на њихову важну улогу у уклањању насталих ROS, а посебно водоник пероксида. Садржај протеина у листовима биљака са јаловишта је веома сличан ономе код контролних биљака што се може повезати са генерално ниским концентрацијама метала које у листовима и у јуну и у септембру (са изузетком Pb и Cr) нису изнад фитотоксичних нивоа. Ипак, нешто виши садржај протеина код свих биљака са јаловишта у септембру у односу јуни би се могао објаснити индукцијом синтезе протеина са улогом у одржавању протеинске и редокс хомеостазе у ћелији. Највиша активност SOD у јуну код биљака из Бора 2 и потом значајно смањење активности у септембру указује на повишене концентрације и одређене стехиометријске односе појединих метала, као што су Mn, Cu, Zn, Fe, Pb и Cd, као факторе који би могли да имају утицај на активност овог металоензима. Активности CAT и APX су високо позитивно корелисане. Благи пад активности оба ензима детектован је само у биљкама из Бора 2 и индукован је повишеним концентрацијама Pb, Zn, Cu и Cd које су негативно корелисане са активношћу ова два ензима и које су у оквиру вредности које су токсичне за већину биљака. Може се сматрати да овако повишена концентрација има негативно дејство на биосинтезу ових ензима, као и на структуру CAT као металоензима. Истовремено повишена активност гвајакол пероксидазе (POD), која као супстрат користи феноле, указује на повећану продукцију водоник пероксида и значај овог ензима и повећане количине фенолних једињења у његовом уклањању. Свеукупна ефикасност у уклањању вишка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се огледа и у стабилном нивоу липидне пероксидације која је у листовима биљака из Бора 2 у септембру остала слична оној у јуну, као и оној код контролних биљака. При благом повећању концентрације Pb детектован је пораст активности ензима који уклањају H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: CAT, APX (Бор 1, Рудник) и POD (Рудник). Ови резултати још једном потврђују супротне ефекте ниских и високих доза метала на активности ензима антиоксидативног система. Ензим GR који је укључен у регенерацију редукованог глутатиона није испољио статистички значајне разлике у активности између биљака са различитих локалитета у јуну. Док је активност GR код контролних биљака и биљака из Бора 1 била видно нижа у септембру у односу на јун, у листовима биљака из Бора 2 и Рудника је задржана на претходном нивоу указујући на већу потребу ових биљака за уклањањем H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> кроз аскорбат-глутатион циклус.

У оквиру поглавља **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња је истакла да *Phragmites australis* показује изузетну способност да расте у екстремно неповољним условима који владају на одлагалиштима рудничке и флотационе јаловине, уз релативно низак трансфер метала у надземне органе. Биљке су акумулирале метале у високим концентрацијама у корену, али су задржале највећи део акумулираних метала унутар корена и спречиле њихов даљи транспорт у надземне делове што одређује ову биљку као ексклудера за све испитиване елементе, и указује на њену потенцијалну примену у фитостабилизацији. Ограничен транспорт метала у надземне делове је од великог значаја због мањег негативног утицаја

на биохемијске и физиолошке процесе у листовима, као и релативно мале вероватноће уласка метала у мрежу исхране. То омогућава неометано одвијање физиолошких и биохемијских процеса и обезбеђује биљкама трске значајну еколошку предност и успешан раст и преживљавање у екстремно неповољним едафским условима. Акумулација метала у различитим биљним ткивима трске зависи од врсте метала и заснива се на имобилизацији у ћелијском зиду/вакуоли биљних ћелија. Различите концентрације и стехиометријски односи метала доводе до различитих ефеката на биохемијски одговор и антиоксидативне механизме заштите код биљака трске са различитих подлога. Тако је показано да ниске концентрације метала стимулишу, док високе концентрације инхибирају активност ензима антиоксидативног система код трске. Међутим, стопа инхибиције активности ензима зависи од конкретног ензима, врсте и концентрације метала, њихових односа и међусобних интеракција. У случају високих концентрација оптимални стехиометријски односи метала могу да ублаже негативне ефекте на активност ензима антиоксидативног система. Код биљака изложених повишеним концентрацијама метала SOD има јединствену и немерљиву улогу у одржавању редокс хомеостазе у ћелији. Значајна инхибиција активности ензима, пад укупног антиоксидативног капацитета и повећан степен липидне пероксидације мембрана сугеришу да при веома високим концентрацијама метала какве су детектоване у корену трске, механизми укључени у њихову детоксификацију и имобилизацију не могу у потпуности да ограниче њихову токсичност. Сви добијени резултати показују да се *Phragmites australis* може дугорочно гајити у циљу фитостабилизације јаловине и других металима оптерећених супстрата богатих водом, као и за ризофилтрацију отпадних вода загађених високим концентрацијама више метала, као што су оне из флотационих јаловишта, пре њиховог испуштања у природне акватичне екосистеме.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 414 библиографских јединица из међународних и домаћих извора. Наведени извори покривају све области овог истраживања и на адекватан начин су наведени у тексту докторске дисертације.

Поглавље **ПРИЛОЗИ** садржи 13 табела са додатним резултатима добијеним током истраживања у оквиру израде докторске дисертације.

## **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације**

### Б1. Радови у часописима међународног значаја

**Kovačević M**, Jovanović Ž, Andrejić G, Dželetović Ž, Rakić T (2020) Effects of high metal concentrations on antioxidative system in *Phragmites australis* grown in mine and flotation tailings ponds. *Plant and Soil*, 453: 297-312. M21  
<https://doi.org/10.1007/s11104-020-04598-x>

**Prica M**, Andrejić G, Šinžar-Sekulić J, Rakić T, Dželetović Ž (2019) M23  
Bioaccumulation of heavy metals in common reed (*Phragmites australis*) growing spontaneously on highly contaminated mine tailing ponds in Serbia and potential use of this species in phytoremediation. *Botanica Serbica*, 43(1): 85-95.  
<https://doi.org/10.2298/BOTSERB1901085P>

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

**Kovačević M**, Grdović I, Andrejić G, Vukašinić I, Dželetović Ž, Rakić T (2022) M34  
Histochemical detection of Cu, Zn, and Pb in *Phragmites australis* growing in flotation tailings ponds. In: Milutinović, M. (ed.): 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Biology and 23<sup>rd</sup> SPPS Meeting, Book of Abstracts, 6-8 October 2022, Belgrade, Serbia, Serbian Plant Physiology Society and Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade and Faculty of Biology, University of Belgrade, p. 51.

**Prica M**, Jovanović Ž, Andrejić G, Rakić T, Dželetović Ž (2019) M34  
Biochemical response of *Phragmites australis* grown on highly contaminated mine tailing pond in Bor, Serbia. In: Ranđelović, V., Stojanović-Radić, Z., Nikolić, D. (eds.): 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Book of Abstracts, Stara planina Mt., Serbia, p 62.

**Prica M**, Andrejić, G., Rakić, T., Dželetović, Ž. (2018). M34  
Accumulation of heavy metals by wetland plant species *Phragmites australis* growing on mine tailings ponds. In: Uzelac, B. (ed.): 3<sup>rd</sup> International Conference on Plant Biology and 22<sup>nd</sup> SPPS Meeting, Book of Abstracts, 9-12 June 2018, Belgrade, Serbia, Serbian Plant Physiology Society and Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade and Faculty of Biology, University of Belgrade, p. 46.

## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Милијане Ж. Ковачевић Е3002/2016 послата је дана 19.04.2023. на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментор је добио дана 19.04.2023.

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала” аутора Милијане Ж. Ковачевић, констатујем да **индекс подударности износи 14%**. Детаљним увидом у Извештај утврђено је да је највећи број подударња у опсегу мањем од 1%, подударња са 2 извора је у опсегу од 1%, и подударња од 2% и 5% је са по једним извором. Степен подударности од 5% последица је назива звања и афилијација чланова комисије, насловне стране тезе, научне и уже научне области на српском и енглеском језику, назива метода за анализу земљишта и биљног материјала, пуних назива ензима, делова протокола аналитичких метода, као и одређених делова текста код којих утврђено подударње није смислено повезано. Подударње од 2% је уочено у називима појединачних референци наведеним у тексту тезе, кратким фразама уобичајеним у српском језику и области истраживања, називима појединих ензима, називима аналитичких метода, и врло кратким сегментима текста код којих утврђено подударње није смислено повезано. Преостале уочене подударности текста (1%, <1%) се највећим делом односе на називе поглавља тезе, називе пигмената, називе појединих коришћених апарата, кратке фразе уобичајене у српском језику и области истраживања, латинске називе биолошких врста, ознаке испитиваних минералних елемената, јединице СИ система, референце радова наведене у тексту тезе. Додатно, одређени делови текста код којих је утврђено подударње нису смислено повезани.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

## Мишљење и предлог Комисије

На основу изложене анализе докторске дисертације кандидата **Милијане Ж. Ковачевић** Комисија закључује да ова дисертација представља оригиналан научни рад који је у сагласности са постављеним циљевима истраживања наведеним у пријави теме и да испуњава све критеријуме прописане стандардима Универзитета у Београду. Кандидаткиња је добијене резултате адекватно приказала и критички дискутовала применом и анализом релевантних литературних података. Резултати ове докторске дисертације дају важан допринос бољем познавању екологије и капацитета *Phragmites australis* да толерише минерални стрес изазван високим концентрацијама метала у подлози. Добијени резултати имају значај не само у фундаменталном, већ и у апликативном погледу указујући да се ова биљна врста може дугорочно гајити у циљу фитостабилизације јаловине и других металима оптерећених супстрата богатих водом, као и за ризофилтрацију отпадних вода загађених високим концентрацијама више метала, као што су оне из флотационих јаловишта, пре њиховог испуштања у природне акватичне екосистеме. На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату **Милијани Ж. Ковачевић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала”.

У Београду, 12.05.2023.

### КОМИСИЈА:

---

др Гордана Андрејић,  
научни сарадник,  
Универзитет у Београду,  
Институт за примену нуклеарне енергије

---

др Ксенија Јаковљевић,  
виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду,  
Биолошки факултет

---

др Живко Јовановић,  
виши научни сарадник,  
Pharm-Olam International, Београд