

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Gordana Z. Andrejić

**Ispitivanje fitoremedijacionog i adaptivnog
potencijala *Miscanthus × giganteus* (Poaceae)
gajenog na odlagalištu flotacione jalovine na
planini Rudnik**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Gordana Z. Andrejić

**Assessment of phytoremediation and adaptive
potential of *Miscanthus × giganteus* (Poaceae)
grown on the flotation tailings on the mountain
Rudnik**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentori: _____

dr Tamara Rakić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Željko Dželetović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije

Članovi komisije: _____

dr Jasmina Šinžar Sekulić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Dragana Robajac, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Istraživanja su realizovana na Institutu za primenu nuklearne energije na Odeljenju za radioekologiju i agrohemiju u okviru projekta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprave za poljoprivredno zemljište pod nazivom „Korišćenje marginalnih zemljišnih površina za gajenje višegodišnje bioenergetske trave *Miscanthus × giganteus*“ i projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. OI 173030.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Tamari Rakić za nesebičnu pomoć još od studentskih dana. Hvala joj na trudu, ukazanom poverenju i bezrezervnoj pomoći. Nije bilo teško izvesti tezu do kraja i napisati doktorat sa ovakvim mentorom, koji je uvek imao vremena i strpljenja za svaki moj problem, pitanje i nedoumicu.

Veliko hvala mom velikom šefu i drugom mentoru, dr Željku Dželetoviću za sve uočene male i velike greške u radu kao i na umeću da sve poteškoće i probleme sagleda sa vedrije strane.

Zahvalnost dugujem i dragoj profesorki dr Jasmini Šinžar Sekulić za svu pomoć oko statističkih analiza.

Dragoj dr Dragani Robajac veliko hvala za iskrene komentare, koje je u nekim trenucima bilo teško čuti, ali su svakako bili od neprocenjivog značaja za krajnju sadržinu disertacije.

Monumentalnu zahvalnost dugujem Rudniku i flotaciji „Rudnik“ d.o.o. na čelu sa direktorom Acom Ilićem, što su mi omogućili neometani pristup odlagalištu, a posebno se zahvaljujem Milovanu Nikoliću, Ljiljani Obrenović, Janić Saši i Neveni Nenadović što su nas uvek dočekivali otvorenog srca i raširenih ruku.

Nesuđenoj mentorki dr Neveni Mihailović veliko hvala što mi je prenela ljubav i strast prema nauci, kao i za strpljenje da me sasluša u trenucima najveće nesigurnosti i na iskrenim rečima: „Ne možeš da doktoriraš dok ne pustiš krv, znoj i suze“.

Najdražem laboratorijskom sapatniku, Milijani Kovačević veliko hvala za iskreno prijateljstvo i strpljenje prilikom mojih prvih pokušaja obučavanja nekoga.

Posebno hvala uvaženom gospodinu redovnom profesoru dr Aleksandru Simiću, nesebičnom i predusretljivom pomagaču i prijatelju, koji od samog početka prati moj rad i nesebično deli iskustva i savete.

Ova teza je uspešno privedena kraju zahvaljujući kolegama iz INEP-a, jer su svakodnevno pružali moralnu i stručnu podršku.

Mojim drugarima Joviću, Martinu, Damiru, Olji i Neli veliko hvala za silna kopanja, merenja, prekucavanja i ostale fizičke poslove. Ova avantura bi bila mnogo teža da nije bilo Vas.

Fantastične Ana, Slađa, Jela, Marija i Gaga su od početka studija odgovarale na moja (ponekad glupa) mala i velika pitanja.

Najdražoj kolegici Tijani Đenader se posebno zahvaljujem na trpeljivosti i večitom osmehu koji je uspevao da razvedri najpesimističnije trenutke završnih faza izrade disertacije.

I na kraju, kolosalnu zahvalnost dugujem najdražima, tati, mami, Jeleni, Peđi i Ogiju za bezgraničnu podršku uz reči: „Možeš ti to sine ljubi te majka“, kao i za безусловnu ljubav iskazanu buđenjem inata sa „Od toga nema ništa“.

Najmilijim Sebićima posvećujem ovu tezu.

Ispitivanje fitoremedijacionog i adaptivnog potencijala *Miscanthus × giganteus* (Poaceae) gajenog na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik

Sažetak

Rudarske aktivnosti proizvode velike količine jalovine kontaminirane teškim metalima, koja predstavlja izvor zagađenja okolnih ekosistema. Odlagalište flotacione jalovine rudnika Pb, Zn i Cu „Rudnik“ odlikuje potpuno odsustvo vegetacijskog pokrivača. Na odlagalištu je postavljen dvogodišnji ogled kako bi se procenio fitoremedijacioni potencijal *Miscanthus × giganteus*, efekti dodavanja mineralnog NPK đubriva ili zemljišta na fiziološke i parametre rasta. *M. × giganteus* je pokazao izuzetnu sposobnost da raste u ekstremno nepovoljnim uslovima koji vladaju na odlagalištu, kao i da formira samoodrživi biljni pokrivač bez posebnih meliorativnih mera. Biljke su zadržale najveći deo metala unutar korena i donekle sprečile njihov dalji transport, a time i njihov negativni uticaj na različite procese u listovima. Povećane koncentracije metala u listu su dovele do različitih negativnih promena na fiziološke parametre, što je izazvalo redukovanu fotosintetsku aktivnost i smanjen rast biljaka. Rezultati ove disertacije pokazuju da je ova biljka ekskluder za sve ispitivane elemente, izuzev Pb što ukazuje na moguću primenu u fitostabilizaciji. *M. × giganteus* je tolerantan na veoma visoke koncentracije metala u jalovini, ali dostiže relativno mali prinos biomase. Fertilizacijom sa NPK i/ili dodavanjem zemljišta proizvodi veće i stabilnije prinose. Dobijeni rezultati ukazuju da je *M. × giganteus* podesan za fitoremedijaciju odlagališta flotacione jalovine, kao i da gajenje na zemljišnim površinama opterećenim visokim koncentracijama metala u blizini aktivnih i napuštenih rudnika predstavlja značajnu i ekonomski izvodljivu opciju za postepeno uklanjanje metala i smanjenje njihove biodostupnosti, uz istovremenu proizvodnju biomase kao sirovine za različite namene.

Ključne reči: *M. × giganteus*, odlagalište flotacione jalovine, teški metali, akumulacija metala, fotosinteza, fluorescencija hlorofila *a*, pigmenti, fitostabilizacija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine

UDK broj: 582.542.11:546.3:622'17:502/504 (497.11-23.0 Rudnik)(043.3)

Assessment of phytoremediation and adaptive potential of *Miscanthus × giganteus* (Poaceae) grown on the flotation tailings on the mountain Rudnik

Abstract

Mining activities produce enormous amounts of heavy metal contaminated fine-particulate flotation tailings which represent pollution source of surrounding ecosystems. The flotation tailings of the Pb, Zn and Cu mine "Rudnik" is characterized by the complete vegetation cover absence. A two-year experiment was set up on the mine tailings to assess the phytoremediation potential of *Miscanthus × giganteus*, and the effects of adding mineral NPK fertilizer or soil on physiological and growth parameters. *M. × giganteus* has shown an exceptional ability to grow in extremely unfavorable conditions that prevail on the mine tailing, as well as to form a self-sustainable plant cover without special reclamation measures. The plants kept most of the metals in the roots and to some extent prevented their further transport, and thus their negative impact on various processes in the leaves. Increased metals concentrations in the leaves led to various negative changes in physiological parameters, which caused reduced photosynthetic activity and plant growth. The results of this dissertation show that this plant is an excluder for all examined elements, except Pb, which indicates a possible application in phytostabilization. *M. × giganteus* has shown very high tolerance on high metals concentrations in tailings, but forms a relatively low biomass yield. Fertilization with NPK and/or addition of soil produces higher and more stable yields. The obtained results indicate that *M. × giganteus* is suitable for phytoremediation of mine flotation tailings, and also that cultivation on land surfaces loaded with high heavy metal concentrations of near active and abandoned mines represents a significant and economically feasible option for gradual removal of metals and reduction of their bioavailability, while at the same time produces biomass as a raw material for various purposes.

Key words: *M. × giganteus*, mine flotation tailings, heavy metals, metal accumulation, metal tolerance, photosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, pigments, phytostabilization.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Ecology, biogeography and environmental protection

UDK number: 582.542.11:546.3:622'17:502/504 (497.11-23.0 Rudnik)(043.3)

Lista skraćenica:

A	Intenzitet fotosinteze
A0	Intenzitet disanja
AAS	Atomski apsorpcioni spektrofotometar
BCF	Biokoncentracioni faktor
BU	Tretman sa busenom kao sadnim materijalom
BU ₀	Tretman busen bez dodavanja NPK
BU _{NPK}	Tretman busen + NPK
C	Kontrolni tretman
Carot	Sadržaj ukupnih karotenoida
CEC	Katjonski izmenjivački kapacitet
Chl <i>a</i>	Hlorofil a
Chl <i>b</i>	Hlorofil b
E	Intenzitet transpiracije
EDTA	Etilendiamintetraacetatna kiselina
ETR	Nivo transporta elektrona
F _m	Maksimalna fluorescencija lista adaptiranog na mrak
F _o	Minimalna fluorescencija lista adaptiranog na mrak
F _v	Varijabilna fluorescencija lista adaptiranog na mrak (F _v =F _m -F _o)
F _v /F _m	Fotosintetička efikasnost fotohemije PSII, broj funkcionalno aktivnih centara PSII
G _s	Provodljivost stoma
MDA	Malondialdehid
NPQ	Odavanje energije u vidu toplote
pH _{H₂O}	Aktivna kiselost zemljišta
pH _{KC}	Supstitucionna kiselost zemljišta
PPFD	Photosynthetic Photon Flux Density
PSII	Fotosistem II
qP	Fotohemijsko gašenje fluorescencije
RI	Tretman sa rizomom kao sadnim materijalom
RI ₀	Tretman rizom bez dodavanja NPK
RI _{NPK}	Tretman rizom + NPK
ROS	Reaktivne kiseonične vrste
TAK	Ukupni antioksidativni potencijal
TF	Translokacioni faktor
TI	Indeks tolerantnosti
Φ _{PSII}	Radna efikasnost PSII na svetlosti

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Biološki značaj metala	1
1.1.1. Uticaj povećane koncentracije metala u zemljištu na fiziologiju biljaka	2
1.1.2. Usvajanje i translokacija metala kod metal-tolerantnih biljaka.....	3
1.1.3. Strategije tolerantnosti na visoke koncentracije metala.....	4
1.2. Tehnike remedijacije zemljišta.....	5
1.2.1. Fitoremedijacija.....	5
1.2.2. Tehnike fitoremedijacije.....	6
1.2.3. Fitoremedijacija odlagališta flotacione jalovine	8
1.2.4. Uloga bioenergetskih useva u fitoremedijaciji	8
1.3. <i>Miscanthus × giganteus</i> J. M. Greef & Deuter	9
1.3.1. Morfološke odlike biljke	9
1.3.2. Ekofiziološke osobine <i>M. × giganteus</i>	10
1.4. Opšte karakteristike ispitivanih hemijskih elemenata	10
1.4.1. Olovo.....	11
1.4.2. Cink.....	12
1.4.3. Bakar	12
1.4.4. Gvožđe.....	13
1.4.5. Mangan.....	14
1.4.6. Nikl	15
1.4.7. Kadmijum	15
1.4.8. Kobalt.....	16
1.4.9. Hrom	16
2. CILJEVI RADA.....	18
3. MATERIJAL I METODE	19
3.1. Opis lokaliteta.....	19
3.2. Sadni materijal.....	20
3.3. Postavka eksperimenta	20
3.4. Prikupljanje uzoraka i hemijske analize zemljišta i jalovine	21
3.4.1. Određivanje pH zemljišnog rastvora	21
3.4.2. Određivanje sadržaja organskog ugljenika i organske materije	22
3.4.3. Određivanje koncentracije ukupnog azota u podlozi.....	22
3.4.4. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika fosfora.....	22
3.4.5. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika kalijuma.....	23
3.4.6. Određivanje sadržaja ukupnih metala.....	23
3.4.7. Određivanje sadržaja pristupačnih metala.....	23
3.5. Analize biljnog materijala	23
3.5.1. Morfološke odlike biljaka	23
3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih metala u biljnom materijalu	24
3.5.3. Određivanje ukupne količine fosfora u biljnom materijalu	24
3.5.4. Određivanje ukupne količine azota u biljnom materijalu	24
3.5.5. Određivanje fitoremedijacionog potencijala <i>M. × giganteus</i>	25
3.5.6. Histohemijska detekcija metala.....	25
3.5.7. Merenje razmene gasova.....	26
3.5.8. Merenje fluorescencije hlorofila <i>a</i>	26
3.5.9. Određivanje količine fotosintetskih pigmenata u listu	27

3.5.10.	Određivanje stepena lipidne peroksidacije.....	27
3.5.11.	Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala listova.....	28
3.6.	Statistička obrada podataka	28
4.	REZULTATI.....	29
4.1.	Hemijske odlike ispitivanog supstrata.....	29
4.2.	Hemijski sastav biljnog materijala.....	34
4.2.1.	Sadržaj N u biljnom materijalu	34
4.2.2.	Sadržaj P u biljnom materijalu	34
4.2.3.	Sadržaj K u biljnom materijalu	37
4.2.4.	Sadržaj Pb u biljnom materijalu.....	37
4.2.5.	Sadržaj Zn u biljnom materijalu	39
4.2.6.	Sadržaj Cu u biljnom materijalu.....	39
4.2.7.	Sadržaj Fe u biljnom materijalu	39
4.2.8.	Sadržaj Mn u biljnom materijalu.....	43
4.2.9.	Sadržaj Ni u biljnom materijalu	46
4.2.10.	Sadržaj Cd u biljnom materijalu.....	46
4.2.11.	Sadržaj Co u biljnom materijalu.....	49
4.2.12.	Sadržaj Cr u biljnom materijalu	49
4.3.	Fitoremedijacioni potencijal <i>M. × giganteus</i>	52
4.4.	Histohemijska detekcija metala	57
4.5.	Fotosintetska aktivnost i razmena gasova	60
4.6.	Promene u parametrima fluorescencije hlorofila <i>a</i>	61
4.7.	Biohemijski parametri <i>M. × giganteus</i>	64
4.8.	Biometrijske odlike ispitivanih biljaka.....	67
5.	DISKUSIJA	75
5.1.	Hemijske odlike podloge.....	75
5.2.	Sadržaj ispitivanih elemenata u biljnom materijalu	77
5.3.	Fitoremedijacioni potencijal <i>M. × giganteus</i>	82
5.4.	Razmena gasova, fluorescencija hlorofila <i>a</i> i oksidativni stres	82
5.5.	Biometrijske odlike <i>M. × giganteus</i>	85
6.	ZAKLJUČCI.....	87
7.	LITERATURA.....	89
8.	PRILOZI	103

1. UVOD

Nakon druge industrijske revolucije, koncentracije metala u životnoj sredini (vodi, zemljištu i vazduhu) se značajno povećala, što se pripisuje brojnim ljudskim aktivnostima, najviše rudarstvu, neadekvatnom odlaganju industrijskog otpada i kanalizacije, primeni mineralnih i organskih đubriva, saobraćaju i vojnim aktivnostima (Kabata-Pendias & Pendias 2001; Kabata-Pendias 2011). Prema Science Communication Unit (2013), metali su najčešći zagađivači zemljišta odakle ih biljke usvajaju i prenose od korenova ka nadzemnim delovima (Gallego et al. 2012). Metali se dalje kroz mreže ishrane prenose i imaju negativan i često toksičan uticaj na brojne organizme (Islam et al. 2008; Nriagu 1979). Zbog široke rasprostranjenosti, metali spadaju u grupu važnih zagađivača i rešenje ovog problema je od velikog interesa u zaštiti životne sredine, dok je ključni korak pravilno upravljanje otpadom koji je kontaminiran metalima. Pravilno upravljanje otpadom koji je kontaminiran metalima je jedan od ključnih postupaka u zaštiti životne sredine kako bi se sprečilo širenje zagađenja.

Rudarstvo obuhvata iskopavanje i ekstrakciju mineralnih sirovina koje se koriste u metalurgiji i drugim privrednim aktivnostima (poljoprivreda, hemijska industrija itd.). Važne rude koje se ekstrahuju sadrže jedan ili više metala i metaloida (npr. Zn, Pb, Cu, Cr, Ni, Fe, U, Au, Ag i Sn) koji su sastavni deo minerala stene, najčešće u obliku rudnih žila u matičnoj steni. Nusproizvodi rudarstva su ogromne količine otpada koji je u različitom stepenu uglavnom kontaminiran metalima i predstavlja lokalni izvor zagađenja.

Otpadni materijal (jalovina) i drenažne otpadne vode u rudarstvu se odlažu i/ili ispuštaju na okolno zemljište i u vodotokove, što dovodi do njihovog zagađenja (He et al. 2005). Zemljišne površine neposredno oko rudnika su mehanički, fizički i hemijski izmenjena, okarakterisana visokom nestabilnošću i ograničenom kohezijom, malom količinom nutrijenata i organske materije i visokim sadržajem potencijalno toksičnih teških metala, usled čega je i biološki oskudna (Crane et al. 2017; Touceda-González et al. 2017). Zemljišta u okolini rudnika i ona na koja se odlaže rudnička jalovina predstavljaju tzv. marginalna zemljišta, koja se usled zagađenja metalima odlikuju smanjenim do veoma niskim kvalitetom (Gibbs & Salmon 2015). Pored visokih koncentracija metala i neki sredinski faktori, karakteristični za dato područje, mogu delovati sinergistički sa negativnim osobinama rudničke jalovine i tako dodatno doprineti degradaciji životne sredine, zagađenju okolnih zemljišta i voda, i finalno dovesti do smanjenja biodiverziteta (Confalonieri et al. 2014).

1.1. Biološki značaj metala

Toksičnost koju neki metal ispoljava na živa bića zavisi od njegove koncentracije u podlozi, oblika u kom se nalazi, mobilnosti i dostupnosti za usvajanje. Biodostupni elementi predstavljaju frakciju ukupne količine elemenata, nalaze se u intersticijalnoj vodi i adsorbovani na površini zemljišnih čestica, i potencijalno mogu biti apsorbovani biljkama i drugim zemljišnim organizmima (Vig et al. 2003). Biodostupnost metala u podlozi zavisi od velikog broja faktora kao što su tip zemljišta, interakcije sa drugim elementima i jedinjenjima u zemljištu, tip klime i osobine biljke. Zemljišta bogata organskom materijom i finim česticama gline imaju i značajno veći kapacitet adsorpcije metalnih katjona na svojim površinama zbog naelektrisanja čestica, a time i velikog katjonskog izmenjivačkog kapaciteta (CEC) (Taiz & Zeiger 2002).

Rastvorljivost i mobilnost metala u podlozi zavise od hemijskih i biohemijskih procesa u zemljištu, poput taloženja i rastvorljivosti, adsorpcije i desorpcije, kompleksacije i disocijacije, oksidoredukcije, pH zemljišnog rastvora, prisustva organskih i neorganskih liganada (Violante et al. 2010). Na nižim pH vrednostima zemljišnog rastvora, biodostupnost metalnih katjona se uglavnom povećava usled njihove izmene sa jonima vodonika pristunih na površini zemljišnih čestica (Taiz & Zeiger 2002). Na biodostupnost jona utiču i redoks uslovi u zemljištu. Naime, većina zemljišta je dobro aerisana pa se elementi koji mogu da postoje u nekoliko oksidativnih stanja javljaju u oksidovanim oblicima (npr.

SeO_4^{2-} , AsO_4^{3-} , Cr(VI) , Fe^{3+}). Oksidaciono stanje elementa može uticati na njegovu rastvorljivost, biodostupnost, a time i toksičnost.

Pored toga, na dostupnost metala utiču i karakteristike klime. Više temperature uglavnom ubrzavaju fizičke, hemijske i biološke procese u zemljištu. Padavine povećavaju vlažnost zemljišta, a time i rastvorljivost jona metala i njihovo spiranje kroz zemljište.

Dodatno, i biološke aktivnosti u zemljištu utiču na biodostupnost metala, jer korenov sistem i zemljišni mikroorganizmi izlučuju u svoje neposredno okruženje jone vodonika i različita organska jedinjenja (eksudate) koji utiču na rastvorljivost soli metala (Adriano 2001; Adriano et al. 2004). U uslovima niskih koncentracija jona metala koji imaju ulogu mikroelemenata, biljke mogu izlučiti jone vodonika iz korena u rizosferu čime se stimuliše desorpcija katjona metala iz čvrstih kompleksa zemljišta, i tako povećava njegova biodostupnost (Crowley et al. 1991). Nasuprot tome, usvajanje povećane, a time i potencijalno toksične količine metala kroz koren može biti sprečeno izlučivanjem organskih jedinjenja (npr. organske kiseline i fenoli) sa kojima metali formiraju slabo rastvorne komplekse u rizosferi (Prasad 2006b).

Pojedini metali (npr. Fe, Cu, Mn, Zn, Ni, Co, Se) su neophodni biljkama u veoma niskim koncentracijama i predstavljaju mikroelemente (mikronutrijente). Ovi, biljkama esencijalni elementi, imaju ulogu kofaktora ili aktivatora enzimskih reakcija, ispoljavaju katalitička svojstva (npr. prostetička grupa metalotioneina), učestvuju u redoks reakcijama u ćeliji, transportu elektrona u mitohondrijama i hloroplastima, kao i metabolizmu nukleinskih kiselina. Za razliku od njih, neki drugi metali za sada nemaju poznatu ulogu u metabolizmu biljnih ćelija. Takvi su na primer Cd, Hg, Cr, Al, As i Pb koji, kada su prisutni i u najmanjim koncentracijama u biljnim ćelijama, ispoljavaju toksičan efekat na enzime, izazivaju različite probleme u metabolizmu ćelije, dovode do prevremenog starenja i smrti biljke (Prasad 1995).

1.1.1. Uticaj povećane koncentracije metala u zemljištu na fiziologiju biljaka

Povećano usvajanje metala od strane biljaka za posledicu ima smanjen rast i reproduktivnu sposobnost biljaka, koji nastaju kao rezultat brojnih oštećenja i poremećaja u ćeliji (Aggarwall et al. 2011; Arif et al. 2016; Pourrut et al. 2011; Küpper and Anderssen 2016). Povećane koncentracije jednog ili više metala dovode do:

- deficita pojedinih biljci neophodnih mikroelemenata,
- promene strukture pojedinih enzima i narušavanja metabolizma,
- disbalansa između sinteze i degradacije proteina, pigmenata i hormona,
- promena u nivou fotosinteze i disanja,
- disbalansa antioksidativnog sistema,
- oštećenja korenskih struktura, što može poremetiti usvajanje vode i nutrijenata.

Do deficijencije jednog ili više mikroelemenata dolazi zbog postojanja antagonizma između metala, a koji se zasniva na njihovom prenosu kroz biomembrane pomoću istih transmembranskih transportera koji ne prave razliku između jona istog naelektrisanja i sličnog radijusa. Tako je pokazano da više koncentracije Zn^{2+} dovode do deficijencije Fe^{2+} i hloroze mladih listova, kao i do deficijencije jona Mn i Cu u biljci (Marschner 1986). Kao rezultat promena u apsorpciji i transportu mikroelemenata u biljci dolazi do deficijencije i supstitucije pojedinih mikroelemenata drugim elementom u biomolekulima, kao što su metaloenzimi i hlorofil.

Negativno dejstvo povećane količine metala se ogleda u zameni mikroelementa (npr. Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo) koji predstavljaju optimalne metalne kofaktore nekim drugim metalom. Ovakvom supstitucijom se menja građa metaloproteina i izaziva inhibicija njihove aktivnosti, ometaju biohemijski i fiziološki procesi (od transkripcije gena do disanja i fotosinteze), umanjuje preživljavanje, rast i reproduktivna sposobnost biljke. Pored toga, Mg koji ulazi u sastav fotosintetskih pigmenata hlorofila

može biti zamenjen Cu, Zn ili Ni čime se onemogućava uloga pigmenata u prihvatanju i prenosu energije u antenama Fotosistema II (PSII) (Fraústro da Silva & Williams 2001).

Fotosintetski proces je veoma osetljiv na povećane koncentracije metala i veoma dobro oslikava kapacitet biljke da toleriše povišene koncentracije metala i stres koji je povezan sa njima (Lage-Pinto et al. 2008; Vernay et al. 2008). Povećane koncentracije metala izazivaju oštećenja u strukturi fotosistema, inhibiciju aktivnosti enzima koji su direktno ili indirektno uključeni u fotosintezu, smanjenje sadržaja hlorofila i karotenoida, kao i ograničavanje razmene gasova smanjenjem provodljivosti stoma i njihovog broja (Ammar et al. 2008; Gratao et al. 2015; Küpper & Andresen 2016; Rodrigues-Celma et al. 2010).

Povećane koncentracije metala u ćeliji dovode do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao što su superoksidni anjon radikal ($O^{\cdot-}_2$) i hidroksil radikal ($\cdot OH$), vodonik peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik (1O_2). Iako ROS nastaju u svim ćelijama u manjim količinama, gde imaju ulogu važnih signalnih molekula, povećane količine ROS dovode do veoma brzih i nekontrolisanih oksidativnih oštećenja lipida ćelijskih membrana, DNK molekula, slobodnih aminokiselina i proteina (Cuypers et al. 2016; Küpper & Andresen 2016; Opdenakker et al. 2012; Verma & Dubey 2003). Na ove procese oksidacije su posebno osetljive polinezasićene masne kiseline membrana, čime se narušava struktura membrane i procesi vezani za ćelijske membrane, kao što su svetla faza fotosinteze na tilakoidnim membranama hloroplasta ili ćelijsko disanje u mitohondrijama (Cuypers et al. 2016; Lösch & Köhl 1999; Prasad & Strzalka 1999).

1.1.2. Usvajanje i translokacija metala kod metal-tolerantnih biljaka

Usvajanje metala/metaloida zavisi od njegove dostupnosti, kompeticije sa drugim elementima i biljne vrste. Apsorbovani joni metala se kroz korenov sistem transportuju apoplastičnim i simplastičnim putem. Transport apoplastičnim putem uglavnom nije regulisan i do određene mere je ograničen usled vezivanja jona metala za ćelijske zidove parenhimskih ćelija korena (Raskin et al. 1997). Simplastični put podrazumeva transport jona kroz ćelijsku membranu pomoću više ili manje specifičnih transmembranskih transporterata, zahteva postojanje elektrohemijskog gradijenta i utrošak energije (Pilon-Smits 2005). Transmembranski transporteri često ne prave razliku između jona koji imaju isto naelektrisanje i sličan radijus atoma, pa se oni metali koji nisu potrebni biljakama (npr. Pb, Hg) prenose istim transporterima kojima se transportuju esencijalni elementi. Pojedinačni transportni proteini imaju jedinstvene osobine u odnosu na afinitet ka supstratu, pa transporteri malog afiniteta imaju tendenciju da budu manje selektivni i dovode do pojave antagonizma među elementima (Marschner 1995). Tako su Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} u kompeticiji za isti transmembranski nosač, pa višak jednog elementa u podlozi može izazvati smanjenu apsorpciju drugog elementa (Kabata-Pendias 2011). Posledica ovih antagonističkih odnosa među njima su smanjeno usvajanje pojedinih mikroelemenata, njihov slabiji transport u nadzemne delove biljke i mogući deficit, kao i povećano usvajanje metala koji nemaju nikakvu za sada poznatu ulogu u biljnom organizmu i ispoljavaju fitotoksične efekte (Abedin et al. 2002; Shibagaki et al. 2002).

Plazma membrana se može smatrati prvom živom strukturom koja ima funkciju barijere jer igra važnu ulogu u homeostazi metala, tako što redukuje ulazak metala u ćeliju, pa se transport jona metala kroz ćelijske membrane i njihova imobilizacija u ćeliji mogu smatrati ključnim za akumulaciju metala u biljkama (Clemens 2006; Hall 2002). Ustanovljeno je da adaptivni odgovor biljaka na visoke koncentracije metala uključuje promene u ekspresiji gena odgovornih za sintezu membranskih transporterata zaduženih za usvajanje i efluks elemenata u biljkama (Memon & Schröder 2006).

Kada se nađu u korenu, metali se mogu transportovati kroz endodermis korena do ksilema, a zatim u nadzemni deo biljke ili se mogu akumulirati u apoplastu ili vakuolama parenhimskih ćelija korteksa. Izuzetno važnu barijeru transportu metala iz korena u nadzemne delove biljke čini endodermis sa Kasparijevim zadebljanjima (Seregin et al. 2004). Zidovi ksilemskih elemenata se odlikuju velikom sposobnošću vezivanja metalnih katjona na svojoj površini, zbog čega se metali ksilemom prenose vezani za fitohelatine (npr. jabučna i limunska kiselina, histidin) (Jabeen et al. 2009).

Kada uđe u ćelije listova metal se transportuje kroz plazmalemu, zatim vezuje za određeno helatno jedinjenje koje učestvuje u njegovom transportu do vakuole, prolazi kroz tonoplast pomoću transmembranskih transportera, i na kraju inaktivira interakcijom sa fitohelatinima čime se obezbeđuje neaktivnost metala i zaštita ćelije. U određenim fazama života biljke, metali se mogu redistribuirati iz jednih u druge organe, iz mlađih u starije listove ili u podzemne organe transportom kroz floem. Mehanizmi koji kontrolišu jonsku homeostazu ćelije uključuju regulaciju influksa jona i aktivnost transportera koja je smanjena u uslovima povećane koncentracije jona, i omogućavaju transport jona iz ćelije u međućelijski prostor (apoplast), što se takođe postiže specifičnim membranskim transporterima (Jabeen et al. 2009).

1.1.3. Strategije tolerantnosti na visoke koncentracije metala

Nakon miliona godina evolucije, biljke koje žive na zemljištima koja su prirodno opterećena metalima su razvile biološke mehanizme zaštite od toksičnog dejstva povećane količine metala i to (a) sprečavanjem njihove apsorpcije ili (b) tolerisanjem povećane koncentracije ovih elemenata u ćelijama (Baker 1987; Whiting et al. 2002). U zavisnosti od vrste, metal-tolerantne biljke mogu izbegavati usvajanje metala ili ih akumulirati u podzemnim i/ili nadzemnim organima, i uvek imaju dobro razvijene mehanizme za smanjenje njihove toksičnosti. Adaptivni mehanizmi biljaka se prvenstveno odnose na regulisanje usvajanja i translokacije metala u akropetalnom i bazipetalnom pravcu, magacioniranje i detoksifikaciju u korenu i listovima. U odnosu na mehanizam koji poseduju, biljke koje prirodno nastanjuju podloge bogate teškim metalima možemo podeliti na: ekskludere, akumulatore/hiperakumulatore i indikatore povećane koncentracije metala/metaloida (Baker 1987).

Indikatori su biljke koje akumuliraju metal u nadzemnim delovima u koncentraciji koja uglavnom oslikava koncentraciju metala u spoljašnjoj sredini. Indikatori povećavaju sintezu helatora nakon apsorpcije teških metala kako bi se slobodni joni uklonili iz citosola i transportovali i imobilisali u manje osetljivim organelama, najčešće vakuoli (Seth 2012; Sheoran et al. 2011). Ukoliko biljka akumulira veće koncentracije metala, nakon određenog vremena će uginuti (Baker 1981).

Ekskluderi ograničavaju ulazak polutanta u visokim koncentracijama u tkiva biljke, izbegavanjem apsorpcije ili imobilizacijom polutanta na nivou korena. Ovo se postiže (i) produkcijom i izlučivanjem eksudata korena u rizosferu, čime se smanjuje mobilnost toksičnih metala u zemljištu i dostupnost biljkama, (ii) vezivanjem metala u ćelijskim zidovima korena u vidu helatno-metalnih kompleksa, (iii) sprečavanjem njihovog transporta kroz plazma membranu ćelija parenhima korena putem modifikacije jonskih kanala, i izbacivanjem metala iz ćelije putem aktivnih efluks pumpi i (iv) fizičkim barijerama korena (endoderm) kako bi se sprečio ulazak toksičnih metala u provodni sistem korena (Akhter et al. 2014; Lux et al. 2011; Tong et al. 2004; Zheng et al. 1998).

Akumulatori su biljke koje akumuliraju metale/metaloide u povećanim koncentracijama u nadzemnim organima, dok su, prema Baker & Brooks (1989), hiperakumulatori sposobni da akumuliraju elemente u količinama koje značajno prevazilaze granice toksičnosti za većinu biljaka. Baker et al. (1994) i Krämer (2010) su predložili granične koncentracije metala za kategorisanje biljne vrste kao hiperakumulatora, pa primera radi, biljka koja se smatra hiperakumulatorom Cd u svojoj masi nadzemnih organa ima više od 0,01% Cd; za Co, Cu, Ni i Pb količina je >0,1%, a za Mn i Zn >1% suve mase. Detoksifikacija jona metala i metaloida u nadzemnim organima ovih biljaka se odvija njihovom inaktivacijom, formiranjem kompleksa sa fitohelatinima i skladištenjem u vakuoli.

Pokazalo se da metal-tolerantne biljke poseduju mehanizme kojima održavaju niske koncentracije toksičnih jona metala u citoplazmi (Baker 1987; Clemens 2006). Ovo se postiže vezivanjem za fitohelatna jedinjenja i formiranjem inaktivnih metal-helatnih kompleksa, odlaganjem najčešće u vakuolama ali i drugim organelama (hloroplasti, mitohondrije, endoplazmatični retikulum, Goldžijev aparat) i vezivanjem metala pomoću šaperona (proteina uključenih u intracelularni transport metala) (Küpper et al. 1999; Tong et al. 2004).

1.2. Tehnike remedijacije zemljišta

Metali i metaloidi ne mogu da se razlože, pa njihove povećane koncentracije u podlozi predstavljaju ozbiljan rizik za kontaminaciju vode i organizama ulaskom u mreže ishrane. Problem zagađenosti zemljišta metalima se može u potpunosti ili delimično rešiti primenom određenih tehnoloških metoda (Wuana & Okieimen 2011). Prema Yao et al. (2012) fizičke metode rekultivacije zemljišta kontaminiranog teškim metalima su: zagrevanje (favorizuje isparavanje određenih elemenata) ili uklanjanje zagađenog zemljišta nanošenjem novog sloja nekontaminiranog zemljišta (efekat razblaživanja ukupnog zagađenja). Hemijske metode mogu biti bazirane na: upotrebi helatora (vezivanjem polutanta za helator dobijaju se nerastvorljivi kompleksi), elektrokinetici (stvaranje električnog polja dovodi do kretanja jona i njihovog akumuliranja na određenom mestu), vitrifikaciji (zagrevanjem zemljišta na temperaturi od 1400-2000°C organska materija se raspada ili isparava, dok se nakon hlađenja formira staklasto kamenje u kojem su zarobljeni teški metali). Najčešće se koristi kombinacija fizičkih i hemijskih tretmana kojima se postiže brzo i efikasno uklanjanje metala, što je izuzetno bitno pri havarijama. Međutim, ove metode su skupe, a odlikuje ih i veliki utrošak energije neophodne za iskopavanje i transport površinskog sloja zemljišta, što zbog upotrebe goriva za posledicu ima i dodatno zagađenje.

Tokom poslednje decenije sve više pažnje se pridaje biološkim metodama remedijacije koje koriste biomasu metal-tolerantnih algi/mikroorganizama i vegetacijskog pokrivača viših biljaka za ekstrakciju metala iz zemljišta/vode ili smanjenje njihove mobilnosti u podlozi. Procenjeno je da su troškovi fizičkih i hemijskih metoda čišćenja zemljišta u poređenju sa biološkim 4-8 puta skuplji, pa nije stran ni kombinovani tehnološko-biološki pristup (Barbosa & Fernando 2018; Salt et al. 1995). Ipak, upotreba slabo razgrađivih hemikalija koje se koriste kao helatna jedinjenja (npr. EDTA) predstavlja dodatno zagađivanje zemljišta, dok tretiranjem visokim temperaturama dolazi do narušavanja prirodnih osobina zemljišta, uništavanja zemljišnih organizama i organske materije (Glass 1999; Yao et al. 2012). Stoga je neophodno tražiti tehnike koje imaju manji negativni uticaj na životnu sredinu, poput fitoremedijacije (Souza et al. 2018).

1.2.1. Fitoremedijacija

Fitoremedijacija (gr. *phyto* – biljka, lat. *remedium* – obnova) se bazira na upotrebi biljaka kako bi se polutanti uklonili iz životne sredine ili učinili manje opasnim (Raskin et al. 1994). Postupak je definisan kao „green clean” tehnologija jer predstavlja strategiju sa najmanjim uticajem na životnu sredinu, zahteva minimalne materijalne troškove i stoga je društveno najprihvatljivija u poređenju sa najčešće korišćenim fizičkim i hemijskim strategijama remedijacije (Gratão et al. 2005; Pilon-Smits 2005). Ova tehnika predstavlja *in situ* tretman zemljišta u kom se koriste biljke koje rastom na zagađenoj površini svojim prisustvom i aktivnostima ostvaruju pozitivan uticaj na nju.

Pored brojnih prednosti, fitoremedijacija ima i nedostatke, a jedan od njih je veoma sporo uklanjanje metala iz zagađene podloge, za koje je često potrebno i po nekoliko decenija (Suresh & Ravishankar 2004). Razlog ovome je relativno mala količina metala po jedinici površine zemljišta koja se akumulira u nadzemnim delovima biljaka, bilo zbog malog prinosa nadzemne biomase biljke ili zbog slabe sposobnosti biljke da ekstrahuje metale iz podloge (Pilon-Smits 2005). Za prevazilaženje ovog problema, u poslednjih nekoliko godina, sve intenzivnije se radi na istraživanju fizioloških mehanizama uključenih u proces apsorpcije, translokacije i akumulacije metala u nadzemnim delovima biljke, a koriste i tehnike ukrštanja i genetičkog inženjeringa, sa ciljem na razvoju sorti biljaka efikasnih u remedijaciji zemljišta.

Efikasnost fitoremedijacije je ograničena dubinom korenova biljaka – kod zeljastih biljaka do 50 cm, a kod drvenastih vrsta do 3 m (Negri et al. 2003). Biodostupnost polutanata takođe može biti ograničavajući faktor. Naime, ako je samo deo polutanta dostupan biljakama, a standardi nalažu da se sva količina polutanta ukloni, sama fitoremedijacija nije dovoljno efikasna (Flechas & Latady 2003). Zbog toga se biodostupnost polutanata može povećati tretiranjem zemljišta suplementima, poput

limunske, sirćetne ili malatne kiseline, ili odgovarajućim metal-tolerantnim rizosfernim bakterijama kojima se povećava rastvorljivost i biodostupnost metala (tzv. indukovana fitoekstrakcija).

Fitoremedijacija je u praksi relativno lako primenjiva na zemljištima koja su umereno zagađena metalima, jer je na visoko zagađenim zemljištima ili nekim tehnosolima rast većine biljaka jako smanjen ili čak nemoguć (Padmavathiamma & Li 2007). Biljke koje se koriste u fitoremedijaciji bi trebalo da:

- budu tolerantne su na visoke koncentracije teških metala,
- akumuliraju velike količine jednog ili više metala u nadzemnom delu,
- brzo rastu,
- imaju dobru produkciju nadzemne biomase,
- imaju dobro razvijen i granat korenov sistem kojim efikasno apsorbuju metale iz podloge (Pilon-Smits 2005).

Poželjno bi bilo i da su ovakve biljke tolerantne na neki od stresnih faktora sredine, kao što su nepovoljan vodni ili temperaturni režim, deficit nutrijenata ili višak soli, da su otporne na parazite, kao i da nisu primamljive herbivorima, čime se smanjuje mogućnost ulaska metala u lance ishrane.

U uslovima visoke zagađenosti podloge jednim ili više metala, kao što su zemljišta oko rudnika i veoma duboke naslage rudničke i flotacione jalovine, najčešće se gaje biljke koje svojim biološkim aktivnostima smanjuju mobilnost i biodostupnost metala, a prisustvom značajno ograničavaju mobilnost gornjih slojeva jalovine pod uticajem vetra i vode (erozije). Iz svega navedenog, zaključuje se da bi izbor i primena fitoremedijacione metode trebalo da uzme u obzir ekologiju biljne vrste, tip polutanata kao i fizičke i hemijske osobine podloge u kojoj se nalazi.

1.2.2. Tehnike fitoremedijacije

Glavne tehnike fitoremedijacije su: fitoekstrakcija, fitostabilizacija, fitodegradacija, fitovolatilizacija, fitofiltracija, i fitotransformacija (Pilon-Smits 2005; Prasad 2006a,b). U fitoremedijaciji se koriste različite vrste zeljastih biljaka i drveća koje pokazuju otpornost na kontaminante. Osim metala i metaloida, fitoremedijacionim tehnikama mogu se uklanjati i radionuklidi, nemetali i organski kontaminanti u zemljištu, sedimentima, muljevitom medijumu i vodi.

Fitoekstrakcija je najčešće korišćen proces fitoremedijacije u kome se upotrebljavaju biljne vrste koje su sposobne da u nadzemnim delovima apsorbuju i akumuliraju metale i metaloide u visokim koncentracijama. Biljke se seju ili se sade, a nakon određenog perioda akumulacije metala vrši se žetva nazemnih delova biljaka, zatim transport sakupljenog biljnog materijala, njegovo odlaganje i dalja obrada koja podrazumeva spaljivanje biljnog materijala i ekstrakciju metala iz pepela. Na ovaj način se metali, kao što su Pb, Cd, Zn, Ni, Cu, Cr, trajno uklanjaju iz zemljišta.

Fitoekstrakcija je u početku bila zasnovana na korišćenju hiperakumulatorskih biljaka. Uprkos dokazanoj efikasnosti u akumulaciji metala u nadzemnom delu, gotovo sve hiperakumulatorske biljke su veoma male, a njihova mala produkcija biomase značajno ograničava efikasnost remedijacije na velikim površinama, dok se ujedno javlja i problem sa nepostojanjem odgovarajuće mehanizacije za sadnju i žetvu ovako malih biljaka. Zbog toga su hiperakumulatori, iako veoma korisni kao eksperimentalni modeli za određivanje mehanizama tolerantnosti na visoke koncentracije metala, u praksi nepovoljni za fitoremedijaciju velikih površina. Nasuprot njima, metal-tolerantni nehiperakumulatori su posebno interesantni jer, iako ne akumuliraju metale u visokim koncentracijama kao hiperakumulatori, njihova produkcija biomase prelazi nekoliko redova veličine produkciju biomase tipičnih akumulatora, pa je samim tim i količina metala iznetog iz podloge u nadzemni deo biljke značajna (Andrade et al. 2010; Peuke & Rennenberg 2005; Souza et al. 2011). Dakle, velika produkcija biomase kod određenih biljaka može nadomestiti malu akumulaciju metala po gramu suve mase biljke i tako omogućiti efikasniju fitoekstrakciju kod metal-tolerantnih nehiperakumulatora u odnosu na hiperakumulatore (Liang et al. 2009).

U cilju što efikasnije ekstrakcije metala iz podloge, često se u podlogu dodaju helatni agensi koji povećavaju rastvorljivost, biodostupnost i efikasnost fitoekstrakcije (indukovana fitoekstrakcija). Prirodni helatni agensi kao što su limunska, sukcininska i jabučna kiselina su se pokazali kao najefikasniji i sa najmanjim štetnim dejstvom na biljke, ali se koriste i sintetički helatori poput etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA), dietilentriaminpentasirćetne kiseline (DPTA) i etilenglikol-bis(2-aminoetil etar) N,N,N',N'-tetrasirćetne kiseline (EGTA) (Andrade et al. 2014; Baren 2012; Duo et al. 2005). Dodatno se podloge siromašne makroelementima obogaćuju azotom, fosfatima i/ili sulfatima koji ublažavaju oštećenja izazvana teškim metalima i povećavaju produkciju biomase, čime se takođe poboljšava efikasnost fitoekstrakcije metala (Manikandan et al. 2016; Rabêlo et al. 2017).

Fitostabilizacija je remedijaciona tehnika u kojoj se metali ne iznose iz podloge, već ih biljke aktivnošću korenovog sistema prevode u manje toksičan oblik. Ovo se postiže smanjenjem rastvorljivosti i mobilnosti metala u zemljištu, čime se umanjuju njihovo kretanje u zemljištu i spiranje u podzemne vode, kao i biodostupnost i ulazak u mreže ishrane (Nwoko 2010; Raskin et al. 1997). Fitostabilizatori su biljke koje vrše imobilizaciju elementa u supstratu, na površini korena ili unutar njega, i pri tome metale ne transportuju u značajnijoj količini u nadzemne delove biljke. Fitostabilizacija se postiže kroz procese:

- stvaranja teško rastvornih kompleksa metala i organskog jedinjenja (eksudati korena) i njihove precipitacije u zoni rizosfere,
- adsorpcije metala na površini korena i stvaranja taloga u vidu plaka,
- adsorpcije i akumulacije metala u korteksu korena vezivanjem za ćelijske zidove ili sekvestracijom polutanata u vakuolama biljnih ćelija (Barcelo & Poschenrieder 2003; Hill et al. 2002).

Dobri fitostabilizatori su biljke ekskluderi koje mogu da imobilišu polutante u supstratu ili u korenovima (Prasad 2006b) i koji imaju dobro razvijenu podzemnu biomasu. Upotreba nehiperakumulatorskih vrsta sa potencijalom za stabilizaciju metala se može smatrati efikasnim rešenjem za remedijaciju velikih površina zagađenih većim brojem metala, kakva su odlagališta pepela ili jalovine. Fitostabilizacija vremenom poboljšava fizičko-hemijske i biološke karakteristike kontaminiranog supstrata. Biljke svojim dugoročnim prisustvom povećavaju sadržaj organske materije, podržavaju razvoj mikroorganizama u rizosferi, izlučuju eksudate u zemljište (organske kiseline, aminokiseline, lipide, ugljene hidrate, flavonoide, proteine, enzime, alifatična i aromatična jedinjenja), poboljšavaju strukturu i vodni režim podloge, sprečavaju raznošenje površinskih slojeva vetrom i vodom, i privlače posete životinja (Bolan et al. 2011; Souza et al. 2018).

Fitodegradacija je fitoremedijaciona tehnika koja se zasniva na sposobnosti biljke da u svojim metaboličkim procesima razgradi organske zagađivače i nije pogodna za uklanjanje metala (Newman & Reynolds 2004).

Fitovolatilizacija je fitoremedijaciona tehnika u kojoj biljke apsorbuju zagađivače (As, Hg, Se), prevode ih u manje toksične oblike, koji se potom putem transpiracije dovode do stoma odakle isparavaju. Ovo je najmanje efikasan metod remedijacije jer isparavanje vodi do transfera zagađivača iz zemljišta u atmosferu (Pilon-Smits 2005). Ova tehnika se može koristiti u zatvorenim sistemima koji zagađen vazduh tretiraju pre ispuštanja, s obzirom da je filtracija vazduha jednostavnija od tretmana zemljišta.

Studije ekofizioloških adaptivnih odgovora biljnih vrsta koje mogu da rastu i preživljavaju u ekstremnim uslovima koji vladaju na degradiranim staništima su neophodne za bolje poznavanje funkcionalnog stanja biljaka (Adolph 1956; Cooke & Suski 2008; Gajić & Pavlović 2018; Ricklefs & Wikelski 2002). Uspešnost ekorestauracije zavisi od integracije fiziologije i restauracione ekologije, odnosno od fizičkih osobina staništa i definisanja stresnih uslova koji utiču na biljku i njen odgovor na stres, tj. sposobnost biljke da održi homeostazu.

1.2.3. Fitoremedijacija odlagališta flotacione jalovine

Odlagališta flotacione jalovine predstavljaju više desetina metara duboke nanose fino granulisanog otpadnog materijala koji nastaje nakon fizičke i hemijske obrade rudnih stena, i koji se po fizičkim (granulacija, struktura, vododržljivost) i hemijskim osobinama (pH, količina organske materije, dostupnost makro-, mikro- i toksičnih elemenata) bitno razlikuje od zemljišta. Zbog toga flotaciona jalovina predstavlja supstrat koji je izuzetno nepovoljan za prirodan razvoj biljaka i sukcesije, pa dugo vremena ostaje bez razvijenog vegetacijskog pokrivača i povoljnog uticaja biljaka. Metali koji su prisutni u visokim koncentracijama u flotacionoj jalovini vremenom se spiraju i odlaze u podzemne vodotokove. Površina jalovišta je izuzetno podložna eolskoj i fluvijalnoj eroziji zbog čega flotaciona jalovišta predstavljaju ozbiljan izvor zagađenja životne sredine, i dovode do smanjenja biodiverziteta. Razvoj spontane pionirske vegetacije je idealno rešenje, jer te biljke predstavljaju ključne genetičke resurse tolerantne na stres, i mogu biti korišćene u remedijaciji napuštenih odlagališta jalovine (Ginocchio et al. 2017). Razvoj biljnog pokrivača doprinosi smanjenju zagađenja, pomaže stabilizaciji metala taloženjem, kompleksacijom, adsorpcijom ili akumulacijom u tkivima korena (Mendez & Maier 2008; Mirza et al. 2011).

Fitoremedijacija ovako nepovoljnih podloga zahteva upotrebu biljnih vrsta koje su tolerantne na višestruki abiotički stres, ekskluderi su metala, poseduju ekstenzivan korenov sistem i proizvode dovoljnu količinu nadzemne biomase kako bi se formirao stabilan vegetacijski pokrivač koji ne akumulira metale u nadzemnim tkivima (Mendez & Maier 2008). Ovako potpomognuta fitostabilizacija ima za cilj progresivno promovisanje *in situ* inaktivacije metala revegetacijom pomoću metal-tolerantnih biljnih vrsta, uz eventualnu dodatnu primenu adekvatnih suplemenata (Bolan et al. 2011; Touceda-González et al. 2017).

Važno je istaći da jedna biljna vrsta može ispoljavati različite nivoe tolerantnosti i potencijal ekstrakcije za isti polutant, u zavisnosti od fiziološkog stanja biljke i tipa podloge na kojoj raste. Tako, na primer, biljke gajene u dobro kontrolisanim laboratorijskim uslovima mogu ispoljiti drugačiji nivo ovih parametara u odnosu na biljke koje su gajene u prirodnom okruženju i koje su izložene različitim, potencijalno stresnim faktorima u stalno varijabilnoj životnoj sredini, poput herbivora i parazita, i koji mogu uticati na fitoremedijacioni potencijal svake vrste (Souza et al. 2018). U svim slučajevima kada se potencijalno toksični polutanti akumuliraju u biljnim tkivima, fitoremedijacija bi trebalo da uključi i studiju procene rizika jer biljni materijal opterećen višim koncentracijama metala može predstavljati izvor hrane za herbivore, čime se otvara put ulaska metala u mrežu ishrane.

1.2.4. Uloga bioenergetskih useva u fitoremedijaciji

Fitostabilizacija biljakama koje se istovremeno odlikuju visokim prinosom biomase i tolerantnošću na metale može biti višestruko značajna, imajući u vidu da se njihova nadzemna biomasa može iskoristiti kao biogorivo i izvor vlakana (Barbosa et al. 2015b; Dale et al. 2016). Neke višegodišnje biljke koje se gaje kao bioenergetski usevi su se pokazale kao odgovarajuće za fitostabilizaciju nekoliko metala i metaloida, zahvaljujući dubokim i ekstenzivnim korenovim sistemima, tolerantnosti na potencijalno toksične teške metale, niskom nivou translokacije metala u nadzemne organe i otpornosti na druge ograničavajuće faktore sredine (Barbosa et al. 2015a,b; Costa et al. 2016; Fernando et al. 2015; Fernando et al. 2018). Prema Jiang et al. (2015) dobijanje energije iz ovakvog procesa, kao i ciljanih metala iz biomase značajno povećavaju finansijsku održivost projekta fitoremedijacije i smanjuju uticaje kontaminirane biomase na životnu sredinu. Kod onih vrsta koje iznose nešto veću količinu metala u nadzemne delove, nakon spaljivanja biomase metali/metaloidi se mogu reciklirati (Chaney et al. 2000). Zbog toga je potencijalna upotreba biljaka sa velikom produkcijom biomase u fokusu istraživača (Evangelou et al. 2012). Kako su ovakve studije relativno nove, još uvek su nepotpune informacije o o karakterizaciji rasta i potencijala akumulacije metala u ovoj grupi biljaka. Naime, glavni interes za gajenje biljaka sa velikom biomasom je zamena fosilnih izvora energije kako bi se redukovala emisija gasova staklene bašte, prvenstveno CO₂ poreklom iz fosilnih goriva (Barbosa et al. 2015b).

I drvenaste i zeljaste metal-tolerantne vrste se mogu koristiti kao biogorivo. Glavne drvenaste vrste koje se gaje zbog svoje biomase su pojedine vrste rodova *Populus* i *Salix*. Zeljaste vrste biljaka su *Panicum virgatum* i *Miscanthus × giganteus* (Dželetović i sar. 2015), obe sa C₄ tipom metabolizma fiksacije CO₂, i koje proizvode 10-15, odnosno 20-25 tona nadzemne suve mase po hektaru. Biljni ostaci imaju različit energetske potencijal i njihove karakteristike zavise od sastava ćelijskog zida date vrste. Vlaknasti materijali sa većim sadržajem lignina mogu imati mnogo veći kalorični potencijal od materijala sa velikom količinom celuloze i hemiceluloze, s obzirom da lignin generiše 22-24 KJ/g, što je 30-50% više od energetske vrednosti drugih komponenta ćelijskog zida (Frei 2013).

Glavna prednost gajenja bioenergetskih biljaka na kontaminiranim zemljišnim površinama je očuvanje obradivih površina za proizvodnju hrane, jer se trenutno, veliki deo obradivih površina koristi za proizvodnju bioenergetskih biljaka. Uz to, gajenje bioenergetskih biljaka na kontaminiranim površinama podrazumeva da je transfer polutanata u nadzemne delove minimalan.

1.3. *Miscanthus × giganteus* J. M. Greef & Deuter

Rod *Miscanthus* obuhvata 14-20 vrsta višegodišnjih trava koje taksonomski pripadaju porodici Poaceae i koje potiču iz istočne Azije, severne Indije i Afrike, od kojih je najveći broj endemičan za istočnu i jugoistočnu Aziju (Clayton et al. 2006; Hodkinson et al. 2002a; Scally et al. 2001). Visoki travnjaci roda *Miscanthus* se rasprostiru od tropskih do subtropskih regiona na ostrvima u Tihom okeanu, preko umerenih do subarktičkih regiona (Greef & Deuter 1993).

Prema Stewart et al. (2009), *Miscanthus* spp. su se dugo koristile za ispašu i građevinski materijal u Kini i Japanu, a tek su nedavno postale značajne kao energetske biljke. Vrste roda *Miscanthus* su uvedene u Severnoj i Južnoj Americi, kao i u Evropi, Africi i Aziji (Clayton et al. 2006; Hodkinson et al. 2002a,b; Scally et al. 2001). Citogenetičke i analize DNK pokazuju da je *M. × giganteus* (3n=57) alotriploidni sterilni hibrid nastao prirodnim ukrštanjem diploidnog *Miscanthus sinensis* (2n=38) i tetraploidnog *Miscanthus sacchariflorus* (4n=76) (Lafferty & Lelley 1994; Rayburn et al. 2009) do kojeg je došlo u Japanu. Genom *M. × giganteus* sastoji od dva genoma *M. sacchariflorus* i jednog genoma *M. sinensis* (Rayburn et al. 2009). *M. × giganteus* ne proizvodi vijabilno seme što smanjuje invazivni potencijal ove biljke (Hodkinson et al. 2002a).

1.3.1. Morfološke odlike biljke

Miskantus je višegodišnja biljka, visine od 80 do preko 300 cm, koja obrazuje krupne, prilično rastresite travnjake (Slika 1). Procenjeni životni vek plantaža miskantusa je 20–25 godina. *M. × giganteus* ima ekstenzivnu, ali relativno plitak korenov sistem, sa skoro 90% ukupne biomase skoncentrisane u površinskih 0–35 cm zemljišta (Monti & Zatta 2009). Međutim, pojedini delovi korena idu u dubinu i preko 2 metra, što mu omogućava da efikasno koristi vlagu sa većih dubina radi održavanja povoljnog vodnog statusa tokom leta (Neukirchen et al. 1999; Riche & Christian 2001). Stablo miskantusa je uspravno stojeće, prosečnog prečnika 10 mm (Slika 1), bez grananja, ispunjeno parenhimom. Krajem septembra stabla dostižu visinu od 2,0–3,5 metra, i dok su zelena, stabla odlikuje visok sadržaj celuloze, šećera i lignina (Lange 1992).

List se sastoji iz lisnog rukavca i lisne ploče koja je ligulom odvojena od stabla. Na mestima obrazovanja listova na stablu se nalaze nodusi. Mladi listovi su meki i savitljivi, a starenjem postaju kruti i hrapavi. Prvi i najniži list je ujedno najkraći i najuži list na stablu biljke, dok se najduži listovi, po redosledu obrazovanja, pojavljuju posle 8.–10. lista (Dželetović 2010; Dželetović et al. 2011). Metlice su manje ili više lepezaste, sa bočnim granama dužine 10–30 cm i jako skraćenim osjem, klasovima dužine 0,3–0,7 cm, jednim potpuno razvijenim cvetom, okruženim svilenkastim dugačkim vlasima, koje polaze iz njegovih osnova i sa naslonima klasovih ljski; vlataste ljske su jednake vlatima i tanko-kožaste, a niže cvetne ljske su kraće, opnaste, bez osja ili sa osjem.



Slika 1. Šestomesečna biljka *M. × giganteus* (levo) i izgled zasada pred žetvu u martu na oglednom polju INEP-a.

1.3.2. Ekofiziološke osobine *M. × giganteus*

M. × giganteus je jedna od najproduktivnijih terestričnih biljaka na prostorima od 35° do 60° SGŠ (Heaton et al. 2010), čemu prvenstveno doprinosi C₄ tip fotosinteze. Iako poreklom iz supstropskih i tropskih oblasti, *M. × giganteus* zadržava visok nivo produktivnosti biomase i na nižim temperaturama karakterističnim za umerenu klimu (Long 1999; Wang et al. 2008a,b). Velika produktivnost u hladnijim uslovima nije samo rezultat kapaciteta za održavanje visoke fotosintetske efikasnosti listova na niskim temperaturama (Dohleman 2009b; Wang et al. 2008a,b), već i sposobnosti rizoma da preživi zimske temperature ispod 0°C. Jedna od najvažnijih prednosti ove vrste je remobilizacija esencijalnih elemenata u višegodišnje rizome, koja se odvija krajem vegetacijske sezone, što biljci omogućava njihovu efikasnu reciklažu (Beale & Long 1997; Clifton-Brown et al. 2007; Dohleman 2009a). Efikasna redistribucija elemenata ne samo da obezbeđuje adekvatnu zalihu nutrijenata za početni rast naredne godine, što redukuje potrebu za dodatnom fertilizacijom (Himken et al. 1997; Lewandowski & Kicherer 1997), već takođe minimizira količinu elemenata koji mogu predstavljati polutante u gorivu (Jenkins et al. 1998).

M. × giganteus ima veliku efikasnost iskorišćavanja vode i obično zahteva 100-300 l vode za produkciju 1 kg suve biomase (Beale et al. 1999; Lewandowski et al. 2000; Mantineo et al. 2009). *M. × giganteus* dobro uspeva na različitim tipovima zemljišta – od peskuša do zemljišta sa visokim sadržajem organske materije (Heaton et al. 2010). Takođe je tolerantan na širok raspon pH vrednosti zemljišta, sa optimumom na 5,5–7,5.

1.4. Opšte karakteristike ispitivanih hemijskih elemenata

Elementi u tragovima su poreklom iz matične stene, a njihova distribucija u zemljišnim profilima i particionisanje između zemljišnih komponenata oslikava različite pedološke procese i uticaj ekoloških faktora (posebno antropogenih – poljoprivreda i industrija) (Kabata-Pendias 2011). U kvantitativnom smislu, ovi elementi su prisutni u vrlo niskim koncentracijama u zemljištu, a neki od njih su esencijalni mikronutrijenti za biljke (Tabela 1).

Glavni parametri zemljišta koji utiču na procese apsorpcije i desorpcije elemenata u tragovima su: pH vrednost, katjonski izmenjivački kapacitet (CEC), granulometrijski sastav (naročito čestice veličine <0,02 mm), sadržaj organske materije, prisustvo oksida i hidroksida (u najvećoj meri Fe, Mn i Al), kao i aktivnost mikroorganizama (Kabata-Pendias 2011). Metaboličku sudbinu i ulogu svakog od elemenata u tragovima u biljkama odlikuju osnovni procesi poput: usvajanja (apsorpcije) i transporta unutar biljke, enzimskih procesa, koncentracije i oblika u kome je element, interakcije između jona različitih elemenata.

Tabela 1. Prosečna koncentracija metala (mg/kg) u Zemljinoj kori, zemljištima u svetu, granične maksimalne i remedijacione vrednosti teških metala prema Uredbi o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu RS.

	Zemljina kora ^a	Zemljište u svetu ^a	Granična maksimalna vrednost ^b	Remedijaciona vrednost ^b
Pb	15	27	85	530
Zn	70	70	140	720
Cu	55	14-109	36	190
Mn	488	411-550	/	/
Ni	20	29	35	210
Cd	0,1	0,41	0,8	12
Co	/	10	9	240
Cr	100	60	100	380

^a Kabata-Pendias 2011

^b Sl. glasnik RS 30/18

Reakcije biljaka na hemijski stres koji izazivaju i nedostatak i višak mikroelemenata je najčešće teško jasno definisati, jer su se biljke tokom evolucije adaptirale na nove i hemijski neuravnotežene sredine. Mehanizmi adaptacije biljaka na višak mikroelemenata u supstratu mogu biti u vezi sa nekoliko procesa kao što su kompleksacija i helatiranje jona, vezivanje jona za ćelijske zidove, selektivno usvajanje jona, imobilizacija u različitim organima u vidu nerastvorljivih jedinjenja, ograničen transport kroz plazma membranu, volatilizacija toksičnih jedinjenja i uklanjanje elemenata odbacivanjem lišća. Hemijski sastav biljaka generalno oslikava hemijski sastav supstrata i njihov odnos je veoma varijabilan, a u kojoj razmeri postoji zavisi od različitih faktora.

1.4.1. Olovo

Oko 240 minerala u svom sastavu sadrži Pb, a galenit (PbS), ceruzit (PbCO₃) i anglezit (PbSO₄) su ekonomski najvažniji. Pb je korišćeno još u antičkom dobu i stoga je kontaminacija Pb verovatno stara koliko i civilizacija (Shotyk & Le Roux 2005). Pb(II) je najčešće oksidaciono stanje ovog metala, koji se u različitim oblicima koristi u brojnim industrijskim oblastima: metalni Pb (komponente akumulatora, varovi (PbSn)); PbO (baterije, peći za spaljivanje); kao komponenta boja, benzina, pesticida itd. (Ruby et al. 1999), pa je kontaminacija zemljišta olovom prvenstveno poreklom od atmosferskog taloženja. Upravo zbog njegove izuzetne toksičnosti, upotreba olova u proizvodnji boja, benzina, vodovodnih cevi itd. je zabranjena ili je u procesu zabranjivanja u različitim zemljama.

Iako se Pb prirodno nalazi u svim biljkama, njegova esencijalna uloga u metabolizmu nije dokazana. Svega 0,005-0,13% Pb u zemljišnom rastvoru je dostupno biljkama (Davies 1995). Usvajanje Pb je pasivno (Hughes et al. 1980), apsorpcijom korenskim dlakama, dok je skladištenje uglavnom u ćelijskim zidovima. Kada je Pb prisutno u rastvorljivim formama u rizosferi, korenovi biljaka mogu da usvoje veliku količinu ovog metala, a stopa usvajanja se povećava sa povećanjem koncentracije u rastvoru, kao i tokom vremena. Translokacija Pb od korena ka nadzemnom delu je ograničena i u proseku samo 3% Pb se iz korenova translocira u nadzemni deo biljke (Zimdahl 1975).

Pb koje je prisutno u vazduhu takođe predstavlja veliki izvor zagađenja, jer ga biljke usvajaju i preko listova. Smatra se da je oko 95% ukupnog sadržaja Pb u nadzemnom delu biljke poreklom od

atmosferske depozicije (Dalenberg & van Driel 1990). Veliki broj radova opisuje toksične efekte i veoma niskih koncentracija Pb na veći broj fizioloških procesa u ćelijama biljaka, kao što su inhibicija respiracije i fotosinteze usled poremećenog transfera elektrona, narušeno usvajanje vode i proces mitoze. Ipak ovi simptomi toksičnosti kod biljaka nisu specifični samo za pomenuti metal.

Stimulišući efekat Pb na usvajanje Cd u korenovima može biti sekundarni efekat poremećaja transmembranskog transporta jona. Antagonizam Zn-Pb nepovoljno utiče na translokaciju ovih elemenata od korenova ka vrhovima (Kabata-Pendias 2011).

1.4.2. Cink

Zn se koristi za zaštitu čelika od korozije, važna je komponenta mnogih legura i upotrebljava se kao katalizator u različitoj hemijskoj industriji. Najčešći i najmobilniji oblici Zn u zemljištu se nalaze u formi slobodnih i kompleksnih jona u zemljišnom rastvoru, kao različite jonske vrste koje se javljaju kao nespecifično i specifično adsorbovani katjoni koji takođe mogu biti lako mobilisani u zemljištu (Tabela 1) (Kabata-Pendias & Sadurski 2004). Prema Smolders & Degryse (2006) fiksacija Zn je relativno spora i jako zavisi od zemljišne pH. Iako je Zn veoma mobilan u većini zemljišta, frakcije gline i zemljišne organske materije mogu da vezuju Zn, posebno u uslovima neutralne i alkalne pH (Peganova & Eder 2004), pa glina i fosfor kontrolišu imobilizaciju Zn u zemljištu (Kumpiene et al. 2008).

Rastvorljive forme Zn su dostupne biljkama i usvajanje Zn je proporcionalno koncentraciji datog metala u hranljivom rastvoru/zemljištu. Zn se akumulira u hloroplastima (npr. spanać), ali i u vakuolarnim tečnostima i ćelijskim membranama (Tinker 1981). Frakcije Zn vezane za laka organska jedinjenja u ksilemskim tečnostima i ekstraktima drugih biljnih tkiva ukazuju na veliku mobilnost Zn u biljkama (van Goor & Wiersma 1976). Prema Tinker (1981), udeo Zn vezanog u negativno naelektrisanim kompleksima predstavlja više od polovine ukupne količine Zn u biljkama. Kada imaju veliku količinu Zn na raspolaganju, neke biljne vrste mobilišu značajne količine ovog metala iz starijih listova u generativne organe, ali kada su u uslovima nedovoljne količine Zn, iste vrste mobilišu malo, ili nimalo Zn iz starijih listova, pa se zaključuje da se Zn verovatno akumulira u starijim listovima (Kabata-Pendias 2011).

Cink ima esencijalnu ulogu u biljkama, od kojih je najznačajnija što je komponenta različitih enzima, kao što su proteinaze, peptidaze i fosfohidrolaze. Osnovna uloga Zn u biljkama vezana je za metabolizam ugljenih hidrata, proteina i fosfata, kao i formiranje auksina, RNK i ribozoma (Lindsay 1972; Shkolnik 1974). Smatra se da Zn stimuliše otpornost biljaka na suve i tople vremenske uslove, kao i na oboljenja izazvana bakterijama i gljivama. Većina biljnih vrsta i genotipova ima veliku tolerantnost na povećane koncentracije Zn. Hloroze, posebno kod mladih listova i zakržljali rast biljke su uobičajeni simptomi previsoke koncentracije Zn. Fiziologija i biohemija toksičnih efekata Zn kod biljaka je slična onima kao i za elemente u tragovima, međutim Zn se ne smatra veoma fitotoksičnim. Granice toksičnosti za Zn uslovljene su biljnom vrstom i genotipom, kao i fazom rasta.

Sadržaj Zn u biljkama značajno varira i oslikava različite faktore raznih ekosistema i genotipova. U ekosistemima gde je Zn polutant iz vazduha, vršni delovi biljaka će verovatno akumulirati povećane koncentracije Zn, do oko 0,1%, dok će do akumulacije veće količine Zn u korenovima doći u uslovima povećane kontaminacije zemljišta (Kabata-Pendias 2011).

1.4.3. Bakar

Cu ima veliki afinitet prema sumporu i stoga su osnovni minerali: halkopirit (CuFeS_2), bornit (Cu_5FeS_4), halkocit (Cu_2S) i kovelit (CuS). Koristi se u proizvodnji različitih provodljivih materijala, đubriva, pesticida, a zahvaljujući svom baktericidnom dejstvu dodaje se krmivima (Kabata-Pendias 2011).

Cu se uobičajeno akumulira u površinskom horizontu zemljišta, međutim, usled tendencije da bude apsorbovan za zemljišnu organsku materiju, karbonate, minerale gline i oksihidrokside Mn i Fe, može se akumulirati i u dubljim slojevima zemljišta (Tabela 1). Prema Ponizovsky et al. (2006), glavni faktori koji utiču na mobilnost Cu su zemljišna organska materija, rastvorena organska materija, pH i sadržaj Cu u zemljištu. Ukupna rastvorljivost katjonskih i kompleksnih anjonskih formi Cu se smanjuje sa povećanjem pH. Ponašanje, fitodostupnost i toksičnost Cu zavise od njegovih oblika i nisu u funkciji ukupne koncentracije (Allen 1993).

Nekoliko značajnih izvora Cu (veštačka i stajska đubriva, kanalizacioni mulj, nusproizvodi industrijske proizvodnje) su doveli do povećanja njegove koncentracije u poljoprivrednim zemljištima. Naročito povećane koncentracije Cu su detektovane u zemljištima u blizini rudnika i odlagališta jalovina, a kako je Cu slabo pokretljiv u većini zemljišta, povećane koncentracije Cu se mogu zadržati u zemljištu tokom dužeg vremenskog perioda (Hutchinson 1979).

Smatra se da je apsorpcija Cu pasivan proces, posebno kada je u zemljišnom rastvoru prisutan u visokim koncentracijama. Bakar se odlikuje slabom pokretljivošću u biljci u poređenju sa drugim elementima. Najveći deo ovog metala ostaje u korenovima pri čemu se relativno male količine transportuju u mlade organe zbog čega se na njima uočavaju prvi simptomi nedostatka Cu. Cu kao esencijalni element u biljkama, konstituent je nekoliko ključnih enzima i ima važne funkcije u fiziološkim procesima, kao što su fotosinteza i respiracija, metabolizam nitrata i ugljenih hidrata, redukcija i fiksacija N, metabolizam proteina i ćelijskih zidova, reprodukcija i otpornost na bolesti. Sa nedostatkom Cu biljka može normalno da raste jedno kraće vreme, ali će zbog slabe redistribucije Cu iz starijih listova i korenova u mlade delove biljke doći do pojave oštećenja na mladim listovima u vidu hloroza i vršnih nekroza. Bakar utiče na propustljivost ksilema za vodu i tako utiče na vodni režim biljke. Cu kontroliše produkciju DNK i RNK, a njegov nedostatak izaziva sterilitet polena i smanjenu produkciju semena. Uprkos generalnoj tolerantnosti biljnih vrsta i genotipova na povećane koncentracije Cu u životnoj sredini, ovaj metal se smatra veoma toksičnim. Najučestaliji simptomi toksičnosti Cu su hloroze i malformacije korena (Kabata-Pendias 2011).

1.4.4. Gvožđe

Gvožđe je jedan od glavnih konstituenata litosfere (Tabela 1), veoma je reaktivan, ima posebnu ulogu u ponašanju nekoliko elemenata u tragovima i po ulozi se nalazi između makro- i mikronutrijenata kod biljaka, životinja i ljudi.

Opšteno pravilo koje se tiče mobilizacije i fiksacije Fe u zemljištu je da oksidujući uslovi (bazna pH) pospešuju taloženje gvožđa, dok redukujući uslovi (kisela pH) pospešuju rastvaranje jedinjenja gvožđa. Smatra se da se u zemljištima Fe nalazi uglavnom u obliku oksida. U horizontima bogatim organskom materijom Fe je uglavnom u helatnim oblicima. Distribucija minerala i jedinjenja Fe u zemljišnim profilima je veoma varijabilna (Kabata-Pendias 2011). Mnoge reakcije su uključene u rastvorljivost Fe u zemljištu, ali su hidroliza i formiranje kompleksa među najvažnijim. Formiranje drugih jedinjenja Fe, poput fosfata, sulfida i karbonata takođe modifikuje rastvorljivost Fe. Sadržaj lako rastvorljive (0,01% do 0,1%) i izmenljive frakcije Fe (0,05% do 0,21%) je veoma nizak u poređenju sa ukupnim sadržajem ovog metala (Kabala & Wilk 2004).

Skoro svi slučajevi nedostatka Fe u biljkama su izazvani zemljišnim faktorima koji utiču na mobilnost Fe u zemljištu. Glavne odlike usvajanja Fe od strane biljaka i transport između biljnih organa su: (i) različiti oblici Fe mogu biti apsorbovani, najčešće kao Fe^{2+} , ali takođe i kao Fe^{3+} i helati Fe; (ii) korenovi biljaka mogu redukovati Fe^{3+} u Fe^{2+} , što je osnova usvajanja Fe kod mnogih biljnih vrsta; (iii) u uslovima nedostatka Fe, korenovi (posebno žitarica i drugih vrsta porodice *Poaceae*) oslobađaju muginenske kiseline koje efikasno mobilizuju Fe; (iv) u ksilemskim eksudatima, Fe se javlja uglavnom u nehelatiranim oblicima.

Metaboličke funkcije Fe u zelenim delovima biljaka su relativno dobro proučene, i Fe se smatra ključnim metalom u transformaciji energije koja je neophodna za brojne životne procese ćelija (Boardman 1975). Esencijalne uloge u koje je uključen ovaj metal su: (i) formiranje hloroplasta; (ii) fotosintetski mehanizmi transfera elektrona (Fe u formi organskih kompleksa); (iii) metabolizam nukleinskih kiselina; (iv) katalitička uloga oba katjona (Fe^{2+} i Fe^{3+}) u različitim reakcijama. Simptomi toksičnosti Fe nisu specifični i obično se razlikuju među biljnim vrstama i stadijumima rasta. Oštećeni listovi ili nekrotične tačke na listovima ukazuju na akumulaciju Fe iznad 1000 mg/kg (što je 3-6 puta veća koncentracija u odnosu na zdrave listove).

1.4.5. Mangan

Mangan je jedan od najčešćih elemenata u tragovima u litosferi (Tabela 1) (Kabata-Pendias 2011). Najuobičajeniji mineral koji sadrži samo Mn je piroluzit ($\beta\text{-MnO}_2$). Redoks stanje Mn varira od +2 do +7 i određuju ga geohemijski i biološki procesi. Mangan se koristi uglavnom u metalurgiji, u proizvodnji čelika i drugih legura, kako bi im obezbedio tvrdoću i čvrstoću, i kao antioksidant. Upotrebljava se za proizvodnju pigmenta, keramike i stakla. Najveći antropogeni izvori Mn su komunalne otpadne vode, kanalizacioni mulj i procesi topljenja rude.

Najviše Mn ima u ilovastim i krečnjačkim zemljištima. Relativno je mobilan u zemljišnom medijumu i verovatno se u zemljištima nalazi u obliku oksida i hidrokksida u vidu prevlaka na drugim zemljišnim česticama ili u obliku nodula različite veličine (Bartlett 1986). Rastvorljivost zemljišnog Mn je od velikog značaja jer snabdevanje biljaka manganom najviše zavisi od količine rastvorenog Mn u zemljištu. U rizosferi, redukcija MnO_2 i kompleksacija sa korenskim eksudatima je značajan faktor koji kontroliše mobilnost Mn (Godo & Reisenauer 1980).

Sva dosadašnja ispitivanja ukazuju na to da je usvajanje mangana kod biljaka metabolički kontrolisano. Prema Skinner et al. (2005), transport Mn u sistemu „zemljište-koren“ je u redukovanom tj. Mn^{2+} obliku, i verovatno je sličan onome koji se sreće kod drugih dvovalentnih jona, kakvi su Mg^{2+} i Ca^{2+} . Pored toga, odvija se i pasivna apsorpcija posebno u uslovima visokih koncentracija u zemljišnom rastvoru. Poznato je da se Mn brzo usvaja i translocira unutar biljke, stoga je verovatno da se Mn ne vezuje za nerastvorljive organske ligande, bilo u tkivima korena, bilo u ksilemskom soku. Mangan u biljnim sokovima i ekstraktima je uglavnom detektovan u slobodnim jonskim oblicima (Tinker 1981). Preferencijalno se transportuje u meristemska tkiva, usled čega su njegove koncentracije najveće u mladim tkivima. Mn izgleda ima slabu mobilnost kada je snabdevanje u biljku ograničeno. Koncentracije Mn veoma fluktuiraju unutar biljnih delova i tokom vegetacionog perioda, i negativno su korelisane sa povećanjem zemljišnog pH a pozitivno sa zemljišnom organskom materijom (Kabata-Pendias 2011).

Mangan igra važnu ulogu u fotosintetskom sistemu transporta elektrona. Stoga su hloroplasti ćelijska komponenta koja je najosetljivija na nedostatak Mn koji se ispoljava u vidu njihovih strukturnih oštećenja. Simptomi nedostatka Mn se prvo javljaju u mlađim listovima kao hloroze između nervature. U daljnim stadijumima se pojavljuju nekrotične, crvenkaste i braonkaste tačke na listovima i dolazi do tamnjenja korenova. Kod ovih biljaka uočeno je povećano usvajanje Fe (Bussler 1981; Isermann 1977). Antagonizam između Mn i Fe je dobro poznat i uočava se uglavnom na kiselim zemljištima koja sadrže velike količine dostupnog Mn. Generalno, Fe i Mn su međusobno povezani u svojim metaboličkim funkcijama, a njihov optimalan odnos ($1,5 < \text{Fe}:\text{Mn} < 2,5$) je neophodan za zdravu biljku. Interakcije Mn i drugih elemenata u tragovima nisu potvrđene, iako postoje dokazi o smanjenju usvajanja Mn izazvanim Zn (Loneragan et al. 1982).

Svetski prosek koncentracije Mn u travama je u opsegu od 17 do 334 mg/kg. Sadržaj Mn pokazuje izuzetnu varijabilnost u odnosu na biljnu vrstu, stadijum rasta, različite organe, i različite ekosisteme. Kritični nivo nedostatka Mn za većinu biljaka iznosi 15-25 mg/kg, dok toksične koncentracije Mn variraju u zavisnosti od biljne vrste i zemljišnih faktora.

1.4.6. Nikl

Osnovne metalne rude sa Ni su sastavljene uglavnom od pentlandita ((Fe,Ni)₉S₈) i pirotita (gvožđe sulfid sa različitim sadržajem Fe). Organska materija pokazuje veliku sposobnost apsorpcije Ni, pa ga stoga ima veoma mnogo u uglju i nafti. Oko 68% ovog elementa se koristi u legurama nerđajućeg čelika (Reck et al. 2008).

Koncentracija Ni u zemljištima zavisi od njegovog sadržaja u matičnoj steni (Tabela 1). Ni je u zemljištu slabo pokretljiv i obično se javlja u rezidualnim frakcijama. Međutim, u površinskim horizontima zemljišta Ni se javlja uglavnom u vezanim organskim formama, od kojih su relativno lako rastvorljivi helati. Kao polutant se oslobađa iz pogona za preradu metala, kao i sagorevanjem uglja i nafte.

Ni je esencijalni mikroelement za biljke, ali u tako malim koncentracijama da je to otkriveno relativno kasno (Eskew et al. 1983), pa putevi njegovog unosa i transporta još uvek nisu u potpunosti poznati. Male količine ovog elementa su potrebne za normalan rast biljaka jer je Ni komponenta ureaze (Andresen et al. 2018). Zakržljali rast i oštećenja biljaka izazvane viškom Ni se uočavaju već dugi niz godina kod većeg broja biljaka (Kabata-Pendias 2011).

Katjonski oblik, Ni²⁺, se lakše apsorbuje i više je toksičan od kompleksnijih oblika. Sadržaj Ni u biljkama je umnogome kontrolisan od strane karakteristika i tipa zemljišta, ali sposobnost biljke da usvaja Ni (npr. akumulatori i hiperakumulatori) takođe ima veliki uticaj. Biljke obično lako usvajaju Ni, pa njegov sadržaj u biljnim organima oslikava sadržaj u zemljištu. Pedološki faktori, posebno zemljišni pH, i biljke svojim aktivnostima na nivou rizosfere utiču na stepen dostupnosti Ni i njegovog usvajanja. Ni je mikroelement i, kao i drugi dvovalentni katjoni (npr. Co²⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺), ulazi u sastav organskih jedinjenja. Smatra se da su transport i skladištenje Ni metabolički kontrolisani. Ni je mobilan u biljkama i istraživanja ukazuju da se akumulira u semenu i listovima (Diez & Rosopulo 1976; Halstead et al. 1969; Welch & Cary 1975).

Kod biljaka koje su izložene suviše visokim koncentracijama Ni apsorpcija nutrijenata, razvoj korenovog sistema i metabolizam su u velikoj meri poremećeni. Pre nego što se pojave simptomi akutne toksičnosti, povećane koncentracije ovog metala u biljnim tkivima dovode do inhibicije transpiracije i fotosinteze (Bazzaz 1974). Fitotoksične koncentracije Ni su veoma različite i zavise od biljne vrste, a variraju u opsegu 40-246 mg/kg (Gough 1979). Smatra se da višak Ni izaziva nedostatak Fe inhibicijom translokacije Fe od korenova ka vršnim delovima biljaka. Pored toga, uočeni su i antagonistički i sinergistički odnosi Ni i nekoliko drugih elemenata u tragovima (npr. Cu, Zn, Cd) (Kabata-Pendias 2011).

1.4.7. Kadmijum

Kadmijum se smatra jednim od najtoksičnijih metala koji ispoljava različite efekte na biološke procese kod ljudi, životinja i biljaka. Produkuje se uglavnom kao nusproizvod prilikom ekstrakcije i prerade rude Zn i stoga proizvodnja kadmijuma više zavisi od proizvodnje Zn nego od tržišne potražnje za Cd. Povećani nivoi Cd mogu biti geološkog porekla (Tabela 1), dok se u antropogenim uslovima Cd koncentruje u površinskim slojevima zemljišta i to naročito u blizini rudnika Pb i Zn, a posebno topionica metala (Čurlik & Forgač 1996).

Biljke veoma efikasno apsorbuju Cd, iako se smatra neesencijalnim elementom za metaboličke procese. Glavni faktor koji utiče na usvajanje Cd je blago kisela pH zemljišta. Ostale karakteristike zemljišta mogu takođe izazvati razlike u apsorpciji Cd korenovima, stoga se može reći da su rastvorljivi oblici Cd u zemljištu uvek lako dostupni biljkama. Najvažnija biohemijska karakteristika jona Cd je njihov jak afinitet ka vezivanju za sulfhidrilne (-SH) grupe nekoliko jedinjenja (npr. Cd kompleksi sa proteinima nalik na metalotioneine) (Kabata-Pendias 2011).

Cd se smatra toksičnim elementom za biljke, a osnova ove toksičnosti je u njegovom remećenju aktivnosti enzima. Kloke et al. (1984) su procenili da su fitotoksične koncentracije Cd 5-10 mg/kg kod osetljivih biljnih vrsta, dok su Manicol & Beckett (1985) dali opseg 10-20 mg/kg kao kritični nivo. Vidljivi simptomi koji su indukovani povišenim koncentracijama Cd u biljkama su zakržljali rast i oštećenje korenova, hloroze listova i crveno-smeđa obojenost oboda i nervature listova. Cd vrši supstituciju nekih mikronutrijenata, a njegova fitotoksičnost se ogleda u promenjenoj permeabilnosti ćelijskih membrana i poremećenom funkcionisanju transportnog sistema elektrona (Prasad 1995). Višak Cd ima kompleksni inhibitorski uticaj na Kalvinov ciklus i posebno remeti funkcije ključnih enzima - ribuloze i bifosfataza (Kabata-Pendias 2011). Najveće koncentracije Cd u zagađenim biljkama su uvek detektovane u korenovima i listovima (Kabata-Pendias 2011). Kao rezultat povišene koncentracije Cd, dolazi do promena u stomatarnoj provodljivosti i transpiraciji, i do inhibicije fotosinteze.

Interakcije Cd i Zn su dosta proučavane i sva dosadašnja otkrića ukazuju na to da u većini slučajeva Zn redukuje usvajanje Cd na nivou korena i lista. Apsorpciju Cd inhibira i Cu. Interakcije Cd-Fe su povezane sa poremećajima u fotosintetičkom aparatu i verovatno su indirektno (Siedlecka & Krupa 1996).

1.4.8. Kobalt

Uobičajeni minerali koji sadrže Co su kobaltit (CoAsS) i smaltit (CoAs_{2-3}). Geohemijski ciklus Co veoma podseća na kruženje Fe i Mn i izgleda da je u vezi sa nekoliko minerala ovih metala. Najveći deo proizvedenog Co se koristi za izradu specijalnih legura koje se dalje koriste za različite industrijske proizvode. Sadržaj Co u zemljištima potiče od matične stene na kojoj je obrazovano zemljište (Tabela 1), a sadržaj i distribucija Co u zemljišnim profilima zavise od procesa formiranja zemljišta.

U hranljivom ili zemljišnom rastvoru Co je lako dostupan biljkama, a njegova biodostupnost kontrolisana je kompleksiranjem sa organskim jedinjenjima zemljišta. Kod viših biljaka, apsorpcija Co^{2+} korenovima uključuje aktivni transport, dok se u ksilemu uglavnom transportuje transpiracionim tokom (Wiersma 1979). Slaba pokretljivost Co^{2+} u biljkama ograničava njegov transport od stabala do listova, pa se u listovima može usvajati preko kutikule.

Niske koncentracije Co stimulišu rast algi i viših biljaka, dok su povišene koncentracije toksične. Kada korenovi biljaka usvoje Co u višku, Co ulazi u transpiracioni tok što rezultuje povećanjem koncentracija Co na vrhovima i obodima listova i stoga su uobičajeni simptomi toksičnosti beli, mrtvi obodni i vršni delovi lista. Višak Co izaziva inhibiciju mitoze i oštećenja hromozoma, kao i oštećenje endoplazmatičnog retikuluma u ćelijama na vrhovima korenova (Rauser 1981). Simptomi toksičnosti se retko ispoljavaju. Međutim, kada je prisutan visok nivo dostupnog Co, posebno u zagađenim zemljištima, uticaj na rast i metaboličke funkcije može biti veoma izražen.

Co interaguje sa svim metalima koji su biogeohemijski u vezi sa Fe. Međutim, najznačajnija veza je uočena između Co i Mn ili Fe u biljkama. Geohemijski i biohemijski antagonizam između ovih metala je proistekao iz njihovog afiniteta da zauzimaju ista mesta u kristalnim strukturama i formiraju slična organo-mineralna jedinjenja.

1.4.9. Hrom

Cr se najčešće nalazi u piroksenima i amfibolitima. Relativno čest mineral je hromit (FeCr_2O_4). Glavna upotreba Cr je u metalurškoj i hemijskoj industriji, međutim, u početku se koristio i kao pigment zbog svoje žute boje. Najveći deo Cr se koristi u proizvodnji nerđajućeg čelika i za hromiranje. Postrojenja za preradu kanizacionog otpada iz industrijskih i komunalnih izvora ispuštaju velike količine Cr.

Redukovani oblik (Cr^{3+}) je slabo mobilan u veoma kiselim medijumima, pa već na pH 5,5 dolazi od njegovog potpunog taloženja. Sa druge strane, Cr^{6+} je veoma nestabilan i lako je pokretljiv i u

kiselim i u baznim zemljištima. Međutim, Cr se uglavnom (>80% ukupnog sadržaja) javlja u nepokretnim rezidualnim frakcijama, pa se njegova jedinjenja smatraju veoma stabilnim u zemljištu. Organska materija ima najveći uticaj na ponašanje Cr i njegove oblike. Aktivnost enzima zemljišnih mikroorganizama se smanjuje u uslovima povećanih koncentracija Cr u zemljištu, pri čemu su posebno osetljivi dehidrogenazna aktivnost heterotrofnih bakterija i procesi nitrifikacije (Rüdel et al. 2001). Sadržaj Cr u površinskim slojevima zemljišta se povećava usled zagađenja iz različitih izvora, pa je jedan od glavnih zadataka remedijacije zemljišta zagađenih Cr redukcija pokretljivog Cr⁶⁺ u Cr³⁺.

Do danas ne postoji dokaz o esencijalnoj ulozi Cr u metabolizmu biljaka (Kabata-Pendias 2011). Hrom je slabo dostupan biljkama i ne translocira se lako unutar njih, pri čemu se najviše Cr³⁺ imobilizuje u ćelijskim zidovima (Zayed et al. 1998). Najdostupniji oblik biljkama je Cr⁶⁺ koji je veoma nestabilan u zemljištu, a njegova dostupnost zavisi od karakteristika zemljišta, posebno od njegove strukture i pH.

Mehanizmi apsorpcije i translokacije Cr u biljkama su naizgled poput mehanizama za apsorpciju i translokaciju Fe, i stoga je ključni proces u apsorpciji sposobnost korenova da konvertuju Cr³⁺ u CrO₄²⁻. Sadržaj u biljkama je u poslednje vreme izazvao veliku pažnju zbog važnosti Cr kao esencijalnog mikronutrijenta u ljudskim metaboličkim procesima, ali i zbog mogućeg karcinogenog efekta. Tipične karakteristike simptoma toksičnosti Cr kod biljaka se uočavaju kao uvenuće vrhova i oštećenja korenova, hloroze mladih listova i pojava smeđe-crvenih listova (Kabata-Pendias 2011).

2. CILJEVI RADA

U ovom istraživanju se krenulo od činjenice da su na odlagalištima rudničkih jalovina biljke izložene višestrukim faktorima stresa, poput nepovoljnih fizičkih i hemijskih karakteristika supstrata, poremećenog snabdevanja vodom, kao i nepovoljnih mikroklimatskih uslova (visoke temperature, intenzivna insolacija i suša). Pretpostavka je da će visoke koncentracije teških metala u supstratu uzrokovati određeno povećanje koncentracije tih elemenata u biljnim organima *M. × giganteus*. Visoke koncentracije teških metala u listovima mogu negativno uticati na količinu pigmenata, razmenu gasova i fotosintetsku aktivnost.

Osnovni ciljevi istraživanja ove disertacije obuhvataju:

- Određivanje stepena akumulacije i translokacije metala u okviru biljnog organizma,
- Utvrđivanje fitoremedijacionog potencijala *M. × giganteus*,
- Analizu uticaja nepovoljnog mineralnog sastava podloge na eko-fiziološke osobine i rast biljaka na odlagalištu flotacione jalovine.
- Ispitivanje uticaja fertilizacije i dodavanja zemljišta na akumulaciju metala u biljnim organima, fiziološke parametre i rast biljaka.

U cilju definisanja fitoremedijacionog i adaptivnog potencijala miskantusa, istraživanja su bila fokusirana na sledeća merenja i analize:

- Određivanje klimatskih uslova na staništu,
- Utvrđivanje hemijskih odlika kontrolnog zemljišta i jalovine,
- Određivanje koncentracija elemenata u korenu, rizomu, stablu i listu miskantusa, kao i određivanje biokoncentracionog (BCF) i translokacionog (TF) faktora radi procene efikasnosti uklanjanja elemenata iz jalovine i zemljišta,
- Histochemijska detekcija određenih metala u biljnim tkivima,
- Procena efekata različitih koncentracija teških metala u listovima na fiziološke i biohemijske parametre listova i parametre rasta biljaka.

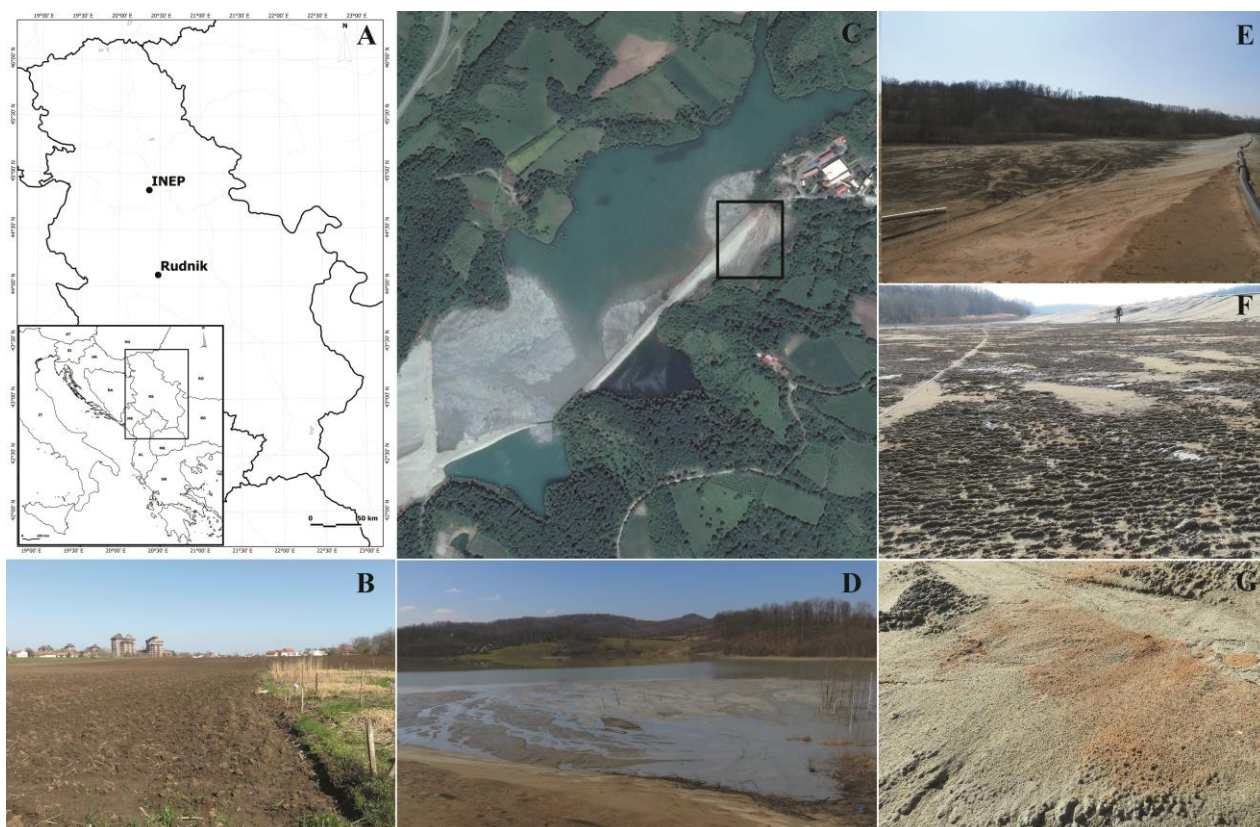
3. MATERIJAL I METODE

3.1. Opis lokaliteta

Eksperiment je postavljen u martu 2016. godine na dva ogledna polja (Slika 2A):

- na nezagađenom prirodnom zemljištu na oglednom polju Instituta za primenu nuklearne energije (INEP), Zemun, Srbija (44°51'N; 20°22'E, 82 mnv),
- na odlagalištu flotacione jalovine rudnika "Rudnik" na planini Rudnik, centralna Srbija (44°06'N; 20°29'E, 500 mnv).

Kontrolne biljke su gajene na nezagađenom zemljištu tipa luvični černozem (FAO 1983) u INEP-u, koje tokom proteklih deset godina nije tretirano đubrivima, pesticidima i herbicidima (Slika 2B).



Slika 2. Lokacija eksperimentalnih polja na karti Srbije (A); kontrolno eksperimentalno polje na nezagađenom černozemu (B); satelitska slika flotacionog jezera i flotacione jalovine, sa površinom na kojoj je postavljen eksperiment - uokvireno (C); flotaciono jezero (D); površina flotacionog jalovišta (E, F) i flotaciona jalovina (G).

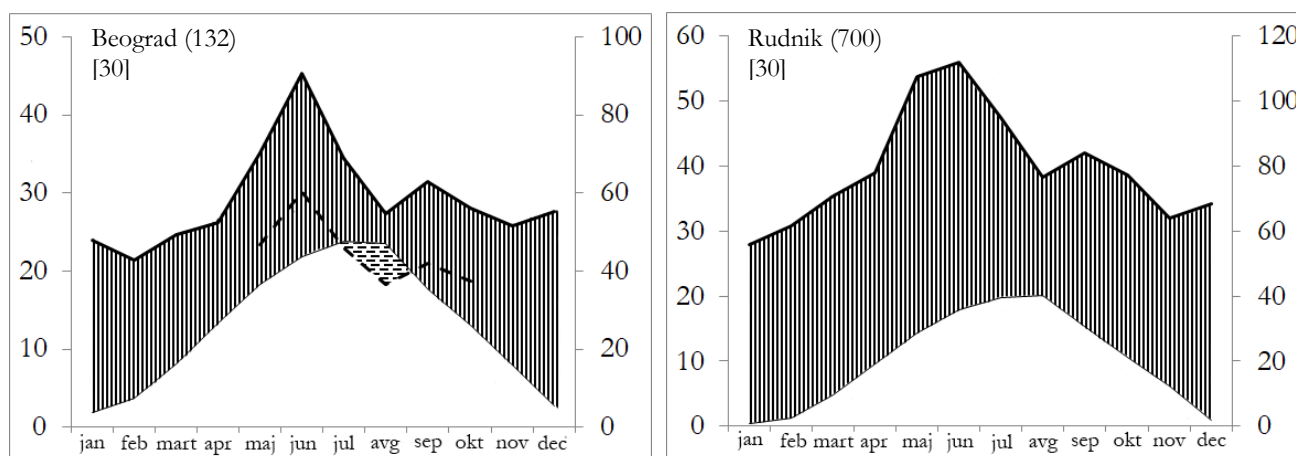
Smatra se da je u rudniku „Rudnik“ u periodu od početka rada 1958. godine do danas preko 70% od ukupne procenjene količine rude već iskopano, što iznosi više od deset miliona tona. Nakon mehaničkog drobljenja i usitnjavanja rude do veoma finih čestica ($\varnothing=75 \mu\text{m}$) vrši se ekstrakcija nekoliko metala (Pb, Zn i Cu) iz polimetalne rude. Nakon ekstrakcije metala, ostatak predstavlja otpadni materijal koji se istače sa vodom u vidu pulpe u flotaciono jezero koje je ograničeno konstruisanim glinovitim branama i prirodnim livadama (Slika 2C, D). Ogledne parcele su postavljene na ravnom delu odlagališta flotacione jalovine na koje tokom proteklih nekoliko godina nije odlagana nova flotaciona jalovina (Slika 2C, uokvireni deo). Prirodna sukcesija ovog dela odlagališta flotacione jalovine se javlja samo po obodu, neposredno u blizini kontakta sa prirodnom okolnom vegetacijom i obuhvata mali broj vrsta i to *Phragmites australis*, *Typha* sp., *Equisetum arvense* i *E. telmateia* (Slika 2D, E).

Mikroklimatski uslovi na oba lokaliteta tokom eksperimentalnog perioda mart 2016 - mart 2018 su predstavljani u Tabeli 2 (Meteorološki godišnjak 1 2016, 2017).

Tabela 2. Srednje mesečne temperature sa minimalnim i maksimalnim dnevnim vrednostima i mesečnom sumom padavina na kontrolnom lokalitetu (Beograd) i Rudniku

		min–srednja–maks T (°C)		Suma mesečnih padavina (mm)	
		Beograd	Rudnik	Beograd	Rudnik
2016	Mart	4,8–6,0–12,9	2,7–6,0–9,7	101,0	211,4
	April	9,1–15,0–20,9	8,1–13,3–18,6	61	74,2
	Maj	12,1–17,2–22,6	9,9–14,0–19,0	58	172,6
	Jun	17,3–22,4–27,5	15,1–19,7–24,6	110,9	126,3
	Jul	18,3–24,1–29,5	9,2–21,4–26,1	41,7	66,5
2017	Mart	6,9–11,5–16,5	–	27,0	83,5
	April	8,0–12,7–18,2	5,1–9,3–14,6	57,8	123,2
	Maj	12,6–18,1–23,8	11,6–15,7–19,8	65,6	95,0
	Jun	17,3–23,8–30,0	16,1–21,0–25,4	69,3	117,8
	Jul	18,2–25,0–31,2	–	31,3	52,0

Prosečna ukupna količina padavina na Rudniku iznosi 951 mm (Rudnik planina, obična klimatološka stanica, br. 2764), a u Beogradu 704 mm (Beograd – opservatorija, glavna klimatološka stanica, br. 2712). Prosečna godišnja temperatura vazduha na Rudniku iznosi 10,1°C, a u Beogradu 13,0°C (RHMZ 2019). Klima je na oba lokaliteta umereno kontinentalna (Slika 3).



Slika 3. Klimadijagram za Beograd (levo) i Rudnik (desno)

3.2. Sadni materijal

Rizomi *M. × giganteus* koji su korišćeni u eksperimentu predstavljaju klonalni materijal dobijen deljenjem rizoma gajenih na eksperimentalnom polju INEP-a. Originalni rizomi su prilikom zasnivanja oglednog polja nabavljeni od distributera Walter Kellner (Austrija) 2007. godine i od tada se *M. × giganteus* kontinuirano gaji i umnožava u INEP-u.

Početak marta 2016. godine na Rudniku je izvršena sadnja dva tipa sadnog materijala:

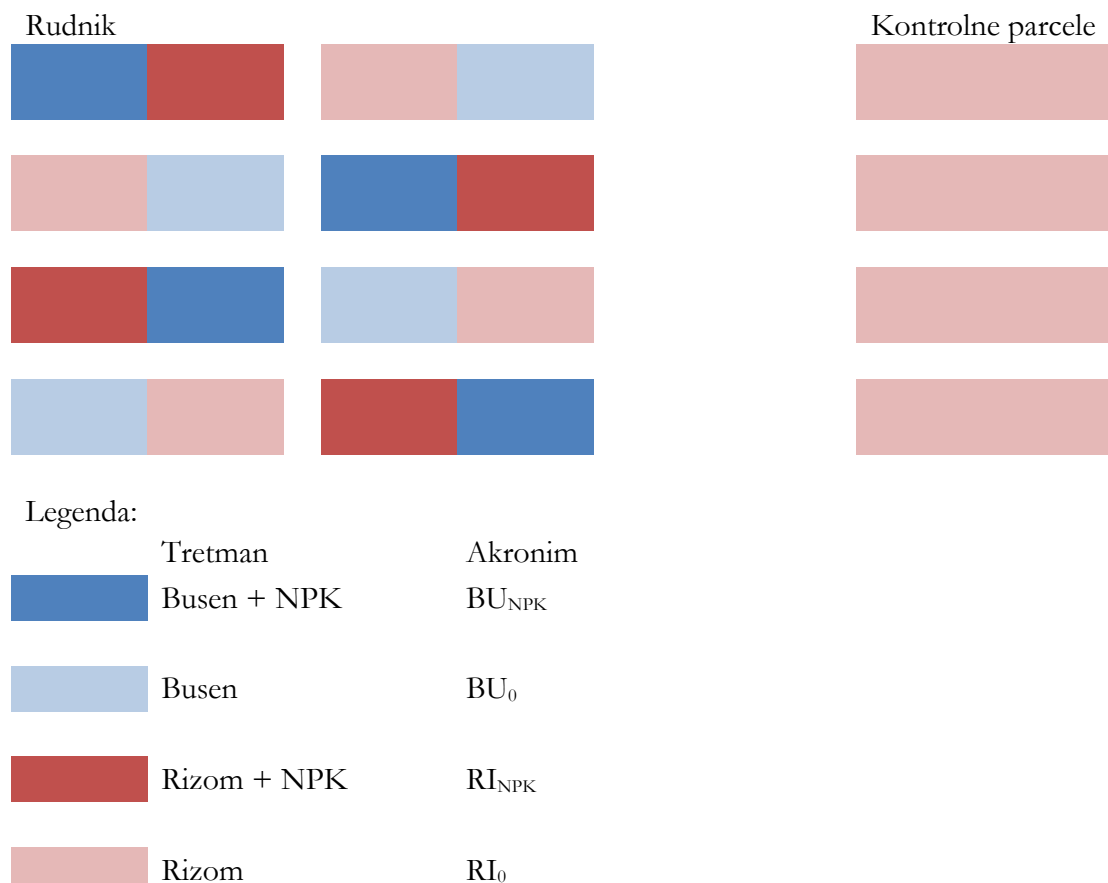
- rizomi dužine 7-10 cm i sa nekoliko pupoljaka su posađeni na dubinu od 10 cm;
- busenovi (razvijeni jednogodišnji rizomi sa 4-6 kg zemlje) su posađeni na dubinu od 15-20 cm.

U istom periodu, na oglednom polju INEP-a je izvršena sadnja rizoma (7-10 cm) na dubini od 10 cm. Gustina sadnje je bila 2 rizoma ili 2 busena po m² (ekvivalent 20.000 biljaka ha⁻¹) na oba lokaliteta.

3.3. Postavka eksperimenta

Ogledno polje na Rudniku je postavljeno na 16 oglednih parcela dimenzije 2,5 x 2 m (5m²). Na 8 oglednih parcela su posađeni rizomi, a na preostalih 8 busenovi, dok je na oglednom polju INEP-a

postavljeno 4 ogledne parcele 5 x 2 m (10 m²) na kojima su posađeni rizomi. Nakon sadnje, kao i sledeće (2017.) godine u martu, nakon obavljene žetve, polovina parcela na Rudniku je tretirana komercijalnim složenim čvrstim mineralnim đubrivom NPK (15:15:15) sa dozom od 667 kg ha⁻¹ (Slika 4), a na kontrolnim parcelama nije vršena fertilizacija. Navodnjavanje nije vršeno ni u godini zasnivanja ogleda kao ni kasnije. Na oglednom polju INEP-a, korovi su uklanjani ručno, po potrebi. Pojava korova nije zabeležena na oglednom polju Rudnika.



Slika 4. Šema ogleda postavljenog na flotacionoj jalovini na Rudniku i na kontrolnom zemljištu u INEP-u.

3.4. Prikupljanje uzoraka i hemijske analize zemljišta i jalovine

Prikupljanje uzoraka supstrata je izvršeno dva puta tokom eksperimentalnog perioda, u junu 2016. i na kraju ogleda u martu 2018. Zemljište i jalovina su uzorkovani na dubini od 0-20 cm (zona rizosfere).

Uzorci zemljišta i jalovine osušeni na vazduhu (u daljem tekstu označeno kao suvo zemljište) su usitnjeni u avanu pomoću tučka i prosejani kroz sito sa prečnikom pora 0,5 mm. Analize zemljišta/jalovine su obuhvatile određivanje:

- aktivne i supstitucione kiselosti,
- sadržaja organskog ugljenika i organske mase,
- sadržaja ukupnog azota,
- koncentracije lakopristupačnih oblika fosfora i kalijuma (P₂O₅ i K₂O), i
- biodostupne i ukupne koncentracije Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn.

3.4.1. Određivanje pH zemljišnog rastvora

Aktivna (pH vrednost izmerena u H₂O) i supstituciona kiselost (pH vrednost izmerena u 1M KCl) zemljišta/jalovine su određene potenciometrijskom metodom prema ISO 10390:1994. Uzorci suvog zemljišta/jalovine mase 10 g su pomešani sa 25 ml bidestilovane vode ili 25 ml 1M KCl. Nakon

30 minuta mešanja na magnetnoj mešalici, pH vrednost je izmerena direktno u suspenziji (pH-metar Iskra MA 5730). Vrednost ΔpH je određena iz razlike pH vrednosti izmerenih za aktivnu i supstitucionu kiselost.

3.4.2. Određivanje sadržaja organskog ugljenika i organske materije

„Organski ugljenik” je izraz koji se koristi za ugljenik u zemljištu koji je drugačiji od ugljenika u karbonatima (Baize, 1993). Suvom zemljištu mase 0,05-0,5 g je dodato 10 ml 0,07M rastvora $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ u 48% H_2SO_4 . Ova smesa je u prisustvu Ag_2SO_4 kao katalizatora zagrevana do ključanja, pa ostavljena da blago ključa tokom 5 minuta. Potom je u mlak rastvor dodato 30 ml bidestilovane vode, a nakon potpunog hlađenja, rastvor je titrovao 0,1M rastvorom $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (Morova so), u prisustvu par kapi fenilantranilne kiseline kao indikatora (Tyrim 1965). Sadržaj organskog ugljenika u zemljištu je izračunat prema sledećoj formuli:

$$C_{\text{org}}(\%) = \frac{(A - B) * F * 0,0003 * 100}{m}$$

u kojoj je: A – zapremina rastvora Morove soli utrošenih za titraciju slepe probe (ml); B - zapremina rastvora Morove soli utrošenih za titraciju uzorka (ml); F – faktor normaliteta Morove soli određen titracijom 0,02M KMnO_4 ; m – masa uzorka zemljišta (g); 0,0003 – 1 ml 0,1N $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ je ekvivalentan sa 0,0003 g organskog C.

Sadržaj organske materije u zemljištu je izračunat množenjem sadržaja organskog ugljenika sa Van Bemelinovim koeficijentom (1,724) (Pansu & Gautheyrou 2006):

$$\text{Organska materija} (\%) = C_{\text{org}}(\%) * 1,724$$

3.4.3. Određivanje koncentracije ukupnog azota u podlozi

Količina ukupnog azota je određena semimikro-Kjeldalovom metodom (Bremner 1996). Za analizu je upotrebljen 1 g suvog zemljišta kome je dodato 2 ml bidestilovane vode kako bi se izazvalo širenje slojeva kristalne rešetke minerala gline radi lakšeg oslobađanja vezanog amonijačnog jona. Mineralizacija se radi u 3 ml cH_2SO_4 uz dodatak katalizatora ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{CuSO}_4 + \text{Se}$, 100:10:1, w/w/w) na temperaturi od 330°C. Posle 3 sata digestije, sav azot iz uzorka prevedu se u amonijačni jon, koji se oslobađa parnom destilacijom u prisustvu viška NaOH . Nakon hlađenja uzorak je kvantitativno prenešen u reakcioni sud koji je povezan za aparaturu. Destilat je sakupljan u 5 ml rastvora 0,3M H_3BO_3 (pH 5,0) sa mešavinom metil crveno – bromokrezol zeleno, a nagrađeni amonijum borat se direktno titruje 0,01 M H_2SO_4 . Količina ukupnog azota u rastvoru je određena na osnovu količine sumporne kiseline utrošene za titraciju, i izračunata po formuli:

$$N(\%) = \frac{(A - B) * 0,28}{m} * 100$$

u kojoj je: A – zapremina 0,01M H_2SO_4 utrošena za titraciju uzorka (izražena u ml); B - zapremina 0,01M H_2SO_4 utrošena za titraciju blanko probe (izražena u ml); 0,28 – faktor konverzije (1 ml 0,01M H_2SO_4 utrošenog za titraciju vezuje 0,28 mg amonijačnog azota); m – masa uzorka zemljišta (izražena u mg).

3.4.4. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika fosfora

Koncentracija fosfora u oblicima pristupačnim biljkama je određena spektrofotometrijski, metodom po Egner-Reihm-u (Egner et al. 1960). 5 g suvog zemljišta je preliveno sa 10 ml rastvora za

ekstrakciju¹ i 90 ml destilovane vode, pa smeša mučkana na rotacionoj mućkalici tokom 2 sata (temperatura $20\pm 2^\circ\text{C}$, brzina rotacije 30 obrtaja/min). Nakon ekstrakcije, uzorci su filtrirani (filter papir Munktel, no 391). Za razvijanje boje je pomešano 5 ml ekstrakta sa 7,5 ml molibdenovog reagensa² i 0,5 ml rastvora 1% SnCl_2 u 1% askorbinskoj kiselini. Apsorbanca rastvora merena je na 580 nm (Ultrospec 2000), a koncentracija fosfora u uzorcima je određena prema kalibracionoj krivi dobijenoj na osnovu apsorbanca standardnih rastvora poznate koncentracije.

3.4.5. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika kalijuma

Za određivanje biljkama pristupačnog kalijuma u zemljištu i jalovini, korišćeni su uzorci pripremljeni prema metodi za određivanje koncentracije pristupačnog fosfora. Nakon filtriranja uzorka, koncentracija K u uzorku je određena emisijom na 766,5 nm na atomskom apsorpcionom spektrofotometru (AAS, Shimadzu AA-7000), prema kalibracionoj krivi dobijenoj nakon merenja standarda poznate koncentracije.

3.4.6. Određivanje sadržaja ukupnih metala

Sadržaj ukupnih Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn u zemljištu i jalovini je određen nakon digestije 5 g suvog zemljišta u ccHNO_3 na temperaturi od 150°C (Jones & Case 1990). Nakon hlađenja, uzorci su prebačeni u normalne sudove, dopunjeni bidestilovanom vodom do zapremine od 50 ml, a zatim filtrirani (filter papir Sartorius, no 391). Apsorbance za svaki element u uzorku su dobijene merenjem na AAS (Shimadzu AA-7000), a koncentracije u uzorku su određene nakon poređenja sa apsorbanca standardnih rastvora poznate koncentracije.

3.4.7. Određivanje sadržaja pristupačnih metala

Prema postupku za Standard NF X 31-120 (1992) koji su opisali Pansu & Gautheyrou (2006), 2,5 g suvog zemljišta i jalovine je preliveno sa 50 ml rastvora 1 M amonijum-acetata i 0,01 M EDTA ($\text{pH} = 7,0$). Uzorci zemljišta i jalovine su mučkani na rotacionoj mućkalici tokom 2 sata (temperatura $20\pm 2^\circ\text{C}$, brzina rotacije 30 obrtaja/min), a zatim filtrirani (filter papir Sartorius, no 391). Koncentracija elemenata (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb i Zn) u uzorcima je određena pomoću AAS (Shimadzu AA-7000), poređenjem apsorbanca uzoraka sa apsorbanca standardnih rastvora poznate koncentracije.

3.5. Analize biljnog materijala

Prikupljanje uzoraka biljnog materijala je rađeno četiri puta tokom svake od dve sukcesivne godine (jun 2016- mart 2018): u periodu intenzivnog rasta i razvoja biljke (jun, avgust), tokom perioda remobilizacije nutrijenata (novembar) i u fazi potpune senescencije nadzemnih delova biljke (mart).

3.5.1. Morfološke odlike biljaka

Tokom sezone rasta biljaka (jun, avgust) je praćeno nekoliko morfoloških karaktera biljaka navedenih u Tabeli 3. Na kraju svake sezone, u martu, je izvršena žetva i na osnovu suve mase nadzemnog dela biljaka izračunat prinos biomase izražen kao kg ha^{-1} .

¹ Rastvor za ekstrakciju se sastoji od 100 g mlečne kiseline pomešane sa 200 ml destilovane vode i hidrolizirane na 95°C tokom 48 sati. Normalitet rastvora je određen titracijom sa 3 M NaOH u prisustvu fenolftaleina kao indikatora. Masa hidrolizovane mlečne kiseline određuje se tako što se 1000 podeli sa normalitetom mlečne kiseline. Ovako određenoj količini hidrolizovane mlečne kiseline se dodaje 178,5 ml 96% sirćetne kiseline i 77 g amonijum acetata. Zatim se rastvor dopuni destilovanom vodom do zapremine od 1 litar.

² Molibdenov reagens: 3 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se rastvori u 40 ml H_2O uz zagrevanje do 50°C , po hlađenju se dodaje 40 ml 10M H_2SO_4 , nakon čega se rastvor dopunjava do zapremine od 1 litar.

3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih metala u biljnom materijalu

Prikupljeni biljni materijal je razdvojen na koren, rizom, stablo i listove. Uzorci su veoma pažljivo i detaljno ispirani česmenskom, a zatim destilovanom vodom. Biljni materijal osušen na vazduhu je usitnjen u avanu, a potom sušen u sušnici na 60°C do konstantne mase (u daljem tekstu označen kao biljni materijal).

1 g biljnog materijala je mineralizovano u 10 ml cHNO₃ na 150°C (Jones & Case 1990). Nakon hlađenja, sadržaj je prebačen u normalne sudove i dopunjen destilovanom vodom do finalne zapremine od 50 ml i filtriran (filter papir Sartorius, no 391). ApSORBANCA uzorka za svaki od metala (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn) je izmerena AAS, dok je K određen plamenom emisionom spektrometrijom (Shimadzu AA-7000). Koncentracije ispitivanih metala određene su na osnovu standardnih krivi, dobijenih nakon očitavanja rastvora poznate koncentracije.

Tabela 3. Ispitivani morfometrijski karakteri biljaka

Stablo	List
Procenat nicanja	Broj zelenih listova
Broj izdanaka po rizomu	Broj suvih listova
Visina stabla	Udeo zelenih u ukupnom broju listova
Prečnik stabla na 10 cm visine od tla	Dužina podvršnih listova
	Širina podvršnih listova

3.5.3. Određivanje ukupne količine fosfora u biljnom materijalu

Fosfor je određen iz istih ekstrakata pripremljenih za određivanje sadržaja ukupnih metala, u vidu redukovano fosfo-molibdatnog kompleksa spektrofotometrijskim merenjima optičkih gustina prema modifikovanoj metodi Gee et al. (1954). Od pripremljenih ekstrakata alikvoti od 10 ml preneti su u normalne sudove zapremine 100 ml. Neutralizacija ekstrakata je urađena pomoću 1M NaOH i 0,1M HCl u prisustvu fenolftaleina kao indikatora. Nakon izvršene neutralizacije dodato je 1 ml molibdenovog reagensa³ i 0,5 ml rastvora stano-hlorida⁴. Nakon 30 minuta su merene apsorbance na kolorimetru (Iskra MA 9507). Koncentracija fosfora u uzorcima je određena prema kalibracionoj krivi dobijenoj na osnovu apsorbaneci standardnih rastvora poznate koncentracije.

3.5.4. Određivanje ukupne količine azota u biljnom materijalu

Koncentracije N u biljnom materijalu su određene Kjeldalovom metodom (Bremner, 1996). Biljni materijal (0,2 g) je mineralizovan u 3 ml cH₂SO₄, na temperaturi od 220°C. Nakon hlađenja, mineralizovanom uzorku je dodato 20 ml bidestilovane vode.

Naime, uzorak je prenet u balon za destilaciju na Kjeldal aparaturi, dodato je 20 ml 40% rastvora NaOH, pri čemu se oslobođeni amonijačni jon vezuje za bornu kiselinu (5 ml 0,3M rastvora H₃BO₃ (pH 5,0) u prisustvu indikatora (0,066 g metil crvenog i 0,099 g bromokrezol zelenog u 100 ml 96% etanola). Nadgrađeni amonijum borat je titrovao 0,01 M sumpornom kiselinom, a udeo N u biljnom materijalu izračunat prema formuli:

$$(\%) = \frac{(A - B) * 0,28}{m}$$

³ 25 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O se rastvara u 250 ml H₂O uz zagrevanje do 60°C; po hlađenju se dodaje 250 ml razblažene H₂SO₄ (1:1 v/v) nakon čega se rastvor dopuni do zapremine od 1 litra.

⁴ 0,5 g SnCl₂ · 2H₂O se rastvara u 15 ml 5M HCl uz zagrevanje. Nakon hlađenja se dopuni bidestilovanom do zapremine od 100 ml.

u kojoj je: A – zapremina 0,01M H₂SO₄ utrošena za titraciju uzorka (ml); B - zapremina 0,01M H₂SO₄ utrošena za titraciju blanko probe (ml); 0,028 – 1 ml 0,01M H₂SO₄ utrošenog za titraciju vezuje 0,28 mg amonijačnog azota; m – masa uzorka (g).

3.5.5. Određivanje fitoremedijacionog potencijala *M. × giganteus*

Fitoremedijacioni potencijal biljke je određen na osnovu biokoncentracionog (BCF) i translokacionog faktora (TF) (Yoon et al. 2006). Biokoncentracioni faktor (BCF) predstavlja odnos koncentracije metala u korenu i u podlozi, i daje informaciju o akumulaciji elementa u korenu i efikasnosti njegovog uklanjanja iz datog supstrata (Baker 1981). Određuje se prema formuli:

$$BCF = \frac{C_{\text{metala}_{\text{koren}}}}{C_{\text{metala}_{\text{supstrat}}}}$$

Translokacioni faktor (TF) predstavlja odnos koncentracije metala u nadzemnim biljnim organima i korenu, i daje informaciju o efikasnosti biljke da transportuje metale/metaloidne iz korena u nadzemne delove (Baker 1981). Određuje se prema formuli:

$$TF = \frac{C_{\text{metala}_{\text{list}}}}{C_{\text{metala}_{\text{koren}}}}$$

Pored koncentracije metala u biljnim organima, za efikasnost fitoremedijacije je važna i biomasa biljke koja direktno zavisi od biljne vrste i njenog stepena tolerancije polutanata. Indeks tolerantnosti (TI) ukazuje na promene u postignutoj suvoj biomasi biljke (sm) koja je izložena polutantima u odnosu na kontrolne biljke (Yang et al. 2015):

$$TI = \frac{\text{biomasa tretmana}}{\text{biomasa kontrolnih biljaka}}$$

3.5.6. Histoheмијска detekcija metala

Histoheмијска detekcija metala omogućava ispitivanje distribucije i akumulacije metala u biljnim tkivima. Za histoheмијску detekciju odabranih metala (Zn, Pb, Cu i Ni) korišćen je isključivo svež biljni materijal (koren, rizom, stablo i list) biljaka koje su rasle na flotacionoj jalovini. Isečci biljnog materijala napravljeni rukom su stavljeni na predmetno staklo u rastvor boje, a zatim su pokriveni pokrovnim staklom. Nakon nekoliko minuta, isečci su posmatrani na mikroskopu *Leica DMLS* i fotografisani digitalnom kamerom *DFC 295* u programu *Leica Q Win*.

Histoheмијска detekcija Pb i Cu u biljnom materijalu je rađena potapanjem isečaka u rastvor ditizona. Rastvor ditizona (0,05%) je pripremljen u mešavini acetona i destilovane vode (3 : 1, v/v) uz dodatak 1 kapi glacijalne sirćetne kiseline, kako bi se povećala osetljivost histoheмијске reakcije. Kompleks ditizona sa Pb i Cu je crven. Dodatno, ditizon formira komplekse i sa Fe i Cd (Seregin et al. 2004).

Histoheмијска detekcija Zn u biljnim tkivima je rađena pomoću rastvora cinkona (Zincon, Sigma Aldrich Cat No. 96440-1G). Cinkon (0,0065 g) je rastvoren u 0,2 ml 1M NaOH u boraksu (Na₂B₄O₇ • 10 H₂O) (Sigma Aldrich Cat No. S9640-25G), a zatim je dodata voda do 10 ml tako da je finalna koncentracija boraksa u rastvoru bila 0,05M. Dobijeni rastvor je zagrevan na temperaturi od 80°C tokom 10 minuta. Rastvor je ohlađen na sobnu temperaturu. Kompleks cinkona sa Zn je plave boje (Seregin et al. 2011).

Za histoheмијску detekciju Ni je korišćen 1% rastvor dimetilglioksima (C₄H₈N₂O₂) u 1,5% rastvoru NaOH u 0,05M boraksu. Kompleks dimetilglioksima sa Ni je crveno-narandžaste boje. Postoji interferencija sa Cu (Severne 1974, Seregin et al. 2003).

3.5.7. Merenje razmene gasova

Razmena gasova je merena tokom juna i avgusta obe sezone na poslednjem potpuno razvijenom listu na intaktnim biljkama. Za merenje je korišćen prenosivi gasni analizator CIRAS 2 (PP Systems, USA). Jedinica za osvetljavanje biljke je modifikovana LED lampa prilagođena za merenje fluorescencije lista, koja zadržava sve karakteristike aktinske svetlosti (fotosintetski aktivno zračenje, PAR) i obezbeđuje pulseve zasićujuće svetlosti i osvetljavanje crvenom svetlošću veće talasne dužine (735 nm).

Svetlosna kriva ($A/PPFD$) opisuje promenu intenziteta fotosinteze pri različitim intenzitetima svetlosti (PPFD, Photosynthetic Photon Flux Density). Intenzitet neto asimilacije CO_2 je meren pri opadajućem intenzitetu svetlosti od 2000 do 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, koncentraciji CO_2 od 370 ppm, temperaturi lista 25°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 60%. Parametri koji su pri tome mereni su:

- neto asimilacija CO_2 ili intenzitet fotosinteze (A) ($\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$),
- intenzitet transpiracije (E), ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
- provodljivost stoma (G_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

3.5.8. Merenje fluorescencije hlorofila a

U Tabeli 4 je prikazan pregled parametara fluorescencije a , fotosinteze i razmene gasova. Fluorescencija hlorofila a , fotohemijsko gašenje fluorescencije (qP), nivo transporta elektrona (ETR) i nefotohemijsko gašenje fluorescencije (NPQ) su mereni na poslednjem potpuno razvijenom listu na intaktnim biljkama tokom juna i avgusta obe sezone. Merenje je rađeno pomoću aparata CIRAS 2 sa integrisanim modulom za fluorescenciju hlorofila (CFM), koji omogućava merenje fluorescencije hlorofila zahvaljujući PAM tehnici (Pulse Amplitude Modulation).

Pre izlaganja zasićujućoj svetlosti, listovi su bili u mraku 30 minuta. Pred kraj tog perioda, kada su svi reakcioni centri PSII i akseptori elektrona potpuno oksidovani, izmerena je minimalna fluorescencija hlorofila u mraku (F_o). Nakon toga, list je osvetljen pulsom zasićujuće svetlosti (5100 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, trajanja 0,7 s) kako bi se dobila maksimalna fluorescencija (F_m). U ovom stanju, svi akseptori elektrona PSII su u potpunosti redukovani. Na osnovu ove dve vrednosti određena je varijabilna fluorescencija prema formuli:

$$F_v = F_m - F_o$$

a zatim i F_v/F_m koji daje dobru informaciju o fotosintetskoj efikasnosti biljke. Nadalje je list bio izložen svetlosti 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a zatim i pulsevima zasićujuće svetlosti u pravilnim intervalima (nakon 1, 5, 10, 30 i 45 minuta) kako bi se dobila stabilna vrednost maksimalne fluorescencije hlorofila na svetlosti (F'_m). Kvantni prinos fotohemije PSII (Φ_{PSII}) je određen prema formuli:

$$\Phi_{PSII} = \frac{F'_m - F_t}{F'_m}$$

u kojoj F_t predstavlja stabilnu fluorescenciju hlorofila na svetlosti neposredno pre primene zasićujućeg pulsa svetlosti. Φ_{PSII} daje prikaz proporcije svetlosti apsorbovane na antenama PSII koja se koristi za fotohemiju, pa može ujedno dati meru nivoa transporta elektrona (ETR) i ukazuje na sveukupni fotosintetski kapacitet *in vivo* (Genty et al. 1989).

CIRAS 2 određuje i fotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila (qP) prema formuli:

$$qP = \frac{F'_m - F_t}{F'_m - F'_o}$$

u kojoj F'_0 predstavlja minimalnu fluorescenciju lista adaptiranog na svetlost (kada su svi reakcioni centri PSII i akceptori elektrona reoksidovani primenom crvene svetlosti veće talasne dužine, 735 nm). qP ukazuje na udeo reakcionih centara PSII koji su otvoreni (Guidi & Degl'Innocenti 2011; Maxwell & Johnson 2000). Nefotohemijsko gašenje fluorescencije hlorofila (NPQ) ukazuje na stepen odavanja energije u vidu toplote sa antena PSII, i dobija se na osnovu formule:

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$$

Tabela 4. Mereni parametri fluorescencije hlorofila *a*, fotosinteze i razmene gasova.

Akronim	Naziv
F_0	Minimalna fluorescencija lista adaptiranog na mrak
F_m	Maksimalna fluorescencija lista adaptiranog na mrak
F_v	Varijabilna fluorescencija lista adaptiranog na mrak ($F_v = F_m - F_0$)
F_v/F_m	Fotosintetička efikasnost fotohemije PSII, broj funkcionalno aktivnih centara PSII
Φ_{PSII}	Radna efikasnost PSII na svetlosti
qP	Fotohemijsko gašenje fluorescencije
ETR	Nivo transporta elektrona
NPQ	Odavanje energije u vidu toplote

3.5.9. Određivanje količine fotosintetskih pigmenta u listu

Sadržaj hlorofila (Chl *a*, Chl *b*, Chl *a+b*), odnos Chl *a/b*, kao i sadržaj ukupnih karotenoida (Carot) u listovima uzorkovanih u junu i avgustu obe vegetacione sezone, su određeni metodama koje su opisali Arnon (1949) i Wellburn (1994). Odsecci svežih listova su preliveni 1 ml dimetil-sulfoksida (DMSO) i zagrevani na 65°C do obezbojavanja odsečaka. Nakon toga su merene apsorbance uzoraka na talasnim dužinama od 663 nm, 645 nm i 480 nm (Ultraspec 2000). Koncentracije hlorofila su izračunate na osnovu formula koje je dao Arnon (1949) i izražene kao mg pigmenta po g suve mase lista:

$$\text{Chl } a = \frac{(0,0127 * A_{663} - 0,00269 * A_{645}) * V_{DMSO}(g)}{m_{odsečka}(g)}$$

$$\text{Chl } b = \frac{(0,0229 * A_{645} - 0,00468 * A_{663}) * V_{DMSO}(g)}{m_{odsečka}(g)}$$

Sadržaj ukupnih karotenoida u listovima je izračunat prema formulama Wellburn-a (1994) i izražen kao mg pigmeta g^{-1} suve mase lista:

$$\text{Carot} = \frac{1000 * A_{480} - 2,14 * \text{Chl } a - 70 * \text{Chl } b}{1000 * 220 * m_{odsečka}}$$

3.5.10. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Određivanje nivoa oksidativnih oštećenja membranskih lipida zasniva se određivanju sadržaja malondialdehida (MDA), jedinjenja koje nastaje kao rezultat oksidacije nezasićenih masnih kiselina bioloških membrana. Količina MDA je određena prema metodi Heath & Packer (1968) modifikovanoj od strane Hodges et al. (1999). Po 0,5 g svežeg biljnog materijala (list) je usitnjeno u avanu u prisustvu tečnog azota. Usitnjen biljni materijal je pomešan sa 5 ml 80% etanola i 50 μ l 2% dibutilhidroksitoluen (BHT), i smeša ostavljena 24h na -20°C. Nakon filtriranja (Münktel, no. 1289) 1 ml ekstrakta je pomešano sa 0,5 ml 0,04 M tiobarbiturine kiseline (TBA) i 0,5 ml 0,6 M trihlorsirćetne kiseline (TCA). Nakon zagrevanja u vodenom kupatilu na 95°C tokom 15 minuta, reakcija je naglo prekinuta hlađenjem epruveta na ledu. Potom je svakom uzorku dodato 8 ml hladne bidestilovane vode i uzorci su ponovo filtrirani (Münktel, no. 1289). Apsorbanca je izmerena na talasnim dužinama od 600 nm, 532 nm i 450

nm (Ultrospec 2000). Koncentracija MDA, izražena kao μmol MDA po g sveže mase, je izračunata prema sledećoj formuli:

$$\text{MDA} = \frac{[(A_{532} - A_{600}) - (A_{450} - A_{600})] * 0,0571 * 10^6 * V}{157000 * m}$$

u kojoj je: 0,0571 – odnos molarnih apsorbanci 1 ± 10 mM saharoze na 532 nm (8,4) i 440 nm (147); 157000 – molarni ekstinkcioni koeficijent za MDA; V – zapremina upotrebljenog ekstrakta izražena u ml; m – masa uzorka izražena u g sveže mase.

3.5.11. Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala listova

Za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala listova (TAK) je korišćena metoda prema Brand-Williams et al. (1995). Metoda se zasniva na prevođenju oksidovane forme ljubičastog radikala 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazila (DPPH) u redukovani 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazin koji je žute boje, a koja se dešava u prisustvu antioksidansa.

Svež biljni materijal (0,5 g) je usitnjen u avanu u prisustvu tečnog azota. U cilju ekstrakcije antioksidanasa, sprášeni uzorak je pomešan sa 5 ml 99,5% metanola i ostavljen na 4°C tokom noći. Ekstrakt je filtriran (Münktel, no 1289), pa je filtrat uparen do suvog ostatka na 50°C, a zatim rastvoren u 5 ml 99,5% metanola. Svaki uzorak je analiziran u tri rastuće zapremine (50, 100 i 150 μl alikvota) mešanjem sa 0,5 ml 400 μM DPPH i dodavanjem 99,5% metanola do finalne zapremine od 1 ml, apsorbanca izmerena na 517 nm (Ultrospec 2000). Stepenn redukciije DPPH je određen na osnovu sledeće formule:

$$\text{TAK (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} * 100$$

u kojoj je: A_0 – apsorbanca slepe probe; A_1 – apsorbanca uzorka.

3.6. Statistička obrada podataka

Za sve izmerene vrednosti urađena je osnovna statistička analiza kojom su dobijene srednje vrednosti (SV) i standardna devijacija (SD) za tri ponavljanja po organu i tretmanu, i svi rezultati su prikazani kao $SV \pm SD$. Dobijeni rezultati su upoređeni korišćenjem neparametrijskog Mann-Whitney U testa, kako bi se utvrdilo da li postoje statistički značajne razlike u merenim parametrima za svake dve nezavisne grupe uzoraka. Kao statistički značajne uzete su vrednosti za $p \leq 0,05$. Ovaj test je odgovarajući kada je uzorak malobrojan i kada vrednosti merenih varijabli nemaju normalnu raspodelu.

Za upoređivanje svih merenih varijabli (koncentracija metala u listu, biohemijski, fotosintetski i parametri fluorescencije) je korišćen Spirmanov koeficijent korelacije (ρ) kako bi se utvrdila korelacija između dva parametra. Sve statističke analize su rađene u dodatku XLSTAT (verzija 2018.7, free 14 day trial) za MS Excel.

4. REZULTATI

4.1. Hemijske odlike ispitivanog supstrata

Osnovne hemijske osobine ispitivanih uzoraka zemljišta i flotacione jalovine su predstavljene u Tabeli 5. Prema Thurn-ovoj kategorizaciji (Džamić i sar. 1996), supsticiona (pH_{KCl}) i aktivna kiselost ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$) rastvora uzoraka flotacione jalovine su neutralne, sa vrlo malim razlikama između srednjih vrednosti, koje su se kretale u rasponu od 0,07 (BU_0 , jun 2016) do 0,26 (RI_{NPK} , jun 2016). Kontrolno zemljište je slabo kisele (pH_{KCl}) do neutralne reakcije ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$), sa izraženijom razlikom između srednjih vrednosti. Naime, razlike između $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ i pH_{KCl} zemljišnog rastvora u junu 2016. i martu 2018 godine su iznosile 0,74 i 0,98.

Količina organskog ugljenika, a time i procenti organske mase u uzorcima zemljišta i flotacione jalovine su bili slični. Detektovane koncentracije N, P i K u kontrolnom zemljištu su bile višestruko više u odnosu na one u uzorcima jalovine. Pored toga, jalovina tretirana NPK mineralnim đubrivom (BU_{NPK} , RI_{NPK}) je uvek sadržala više koncentracije ovih makroelemenata u odnosu na netretirane podloge (BU_0 , RI_0).

Koncentracija ukupnog N u kontrolnom zemljištu je bila značajno viša u odnosu na podloge na jalovištu i to: u odnosu na BU za 1,7 i 2,5 (jun 2016.) kao i 2,9 i 3,7 puta (mart 2018.), a u odnosu na RI za 17,9 i 41,7 (jun 2016.) i 28,5 i 85,5 puta (mart 2018.). Sadržaj dostupnog P je u podlozi BU bio 3,1 i 3,4 (jun 2016.), kao i 3,2 i 4,5 puta (mart 2018.) manji u odnosu na kontrolno zemljište. Koncentracija dostupnog fosfora u RI je bila 140 (RI_{NPK} , jun 2016.), 64,7 (RI_{NPK}) i 126 (RI_0) puta manja (mart 2018.) u odnosu na kontrolno zemljište. Količina dostupnog P u jalovini RI_0 je u junu 2016. bila ispod nivoa detekcije. Srednja vrednost koncentracije K_2O u kontrolnom zemljištu je bila 1,3 (jun 2016.), kao i 1,4 (BU_{NPK}) i 1,8 (BU_0) (mart 2018.) puta veća. Takođe, bila je viša 2,9 i 4,2 puta u odnosu na RI_{NPK} , odnosno RI_0 u junu 2016. godine, kao i za 3,5 i 4,7 (RI_{NPK} , odnosno RI_0) puta u martu 2018. godine.

Koncentracije ukupnih i dostupnih formi svih elemenata u flotacionoj jalovini, bez obzira na tretman, višestruko prevazilaze koncentracije prisutne u kontrolnom zemljištu (Tabela 6 i 7).

Koncentracije ukupnog i pristupačnog Pb u supstratu se međusobno statistički značajno razlikuju između tretmana u oba perioda uzorkovanja. Koncentracija ukupnog Pb u kontrolnom zemljištu je bila niža od 35 do 81 put u odnosu na supstrat sa flotacionog jalovišta. Iako je značajno niža koncentracija ukupnog Pb detektovana kod BU u odnosu na RI na početku eksperimenta, ove razlike su vidno smanjene na kraju eksperimenta, u martu 2018. g., zbog povećanja koncentracije Pb u BU (Tabela 6). Slična pojava se uočava i u slučaju pristupačnog Pb u uzorcima BU čije su koncentracije bile 1,5 i 1,2 puta više u BU_{NPK} i BU_0 na kraju eksperimenta, iako su obe i dalje ostale značajno niže u odnosu na vrednosti izmerene u supstratu RI (Tabela 7).

Koncentracije ukupnog Zn u supstratu RI su bile od 42,9 do 55,8 puta više u odnosu na one detektovane u kontrolnom zemljištu, dok su u supstratu BU bile više od 26,6 do 46,2 puta (Tabela 6). Osim u odnosu na kontrolu, statistički značajne razlike u koncentraciji ukupnog Zn se uočavaju i između tretmana i perioda uzorkovanja (Tabela 6). Kao i u slučaju Pb, slična pojava se uočava i na primeru Zn u busenovima čije su koncentracije u martu 2018. bile 1,4 puta (ukupne), kao i 2,1 i 1,4 (pristupačne) puta više kod BU_{NPK} i BU_0 u odnosu na juni 2016. godine (Tabela 7). Za razliku od BU, sadržaj pristupačnog Zn u supstratu RI na početku i kraju oglada je bio ujednačen.

Koncentracije ukupnog Cu u uzorcima jalovine RI u dva perioda uzorkovanja su bile od 32 do 43 puta više u odnosu na kontrolno nezagađeno zemljište, dok su koncentracije u BU bile više 21 do 38 puta. U uzorcima supstrata BU sakupljenim 2018. godine su detektovane više koncentracije ukupnog Cu u odnosu na početno stanje 2016. godine (Tabela 6). Kada je reč o pristupačnim formama Cu, njihove koncentracije su bile više na kraju eksperimenta kod BU_0 i RI, ali ne i kod BU_{NPK} (Tabela 7).

Tabela 5. Osnovne hemijske osobine ispitivanog zemljišta i jalovine (SV ± SD).

Parametar	Period uzorkovanja	C	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
pH H ₂ O	VI 2016	6,78 ^b	7,09 ^e	6,95 ^c	7,07 ^d	6,58 ^a
	III 2018	6,60 ^b	6,58 ^a	6,76 ^c	6,95 ^e	6,86 ^d
pH KCl	VI 2016	6,04 ^a	6,87 ^c	6,88 ^c	6,81 ^d	6,47 ^b
	III 2018	5,68 ^a	6,47 ^b	6,92 ^d	7,10 ^e	6,78 ^c
Organski C (%)	VI 2016	2,014 ± 0,033 ^d	2,163 ± 0,197 ^d	1,870 ± 0,019 ^c	1,674 ± 0,030 ^b	1,610 ± 0,042 ^a
	III 2018	1,780 ± 0,001 ^c	2,184 ± 0,249 ^d	1,652 ± 0,025 ^b	1,619 ± 0,013 ^a	1,742 ± 0,060 ^c
Organska masa (%)	VI 2016	3,472 ± 0,057 ^d	3,729 ± 0,340 ^d	3,223 ± 0,033 ^c	2,886 ± 0,051 ^b	2,775 ± 0,072 ^a
	III 2018	3,068 ± 0,002 ^c	3,766 ± 0,429 ^d	2,848 ± 0,043 ^b	2,792 ± 0,022 ^a	3,004 ± 0,103 ^c
Ukupni N (%)	VI 2016	0,125 ± 0,012 ^c	0,073 ± 0,007 ^d	0,050 ± 0,002 ^c	0,007 ± 0,001 ^b	0,003 ± 0,000 ^a
	III 2018	0,171 ± 0,002 ^c	0,059 ± 0,008 ^d	0,046 ± 0,004 ^c	0,006 ± 0,000 ^b	0,002 ± 0,000 ^a
Dostupni P (mg P ₂ O ₅ / 100 g zemljišta)	VI 2016	13,06 ± 0,17 ^c	4,263 ± 0,151 ^d	3,895 ± 0,756 ^c	0,093 ± 0,015 ^b	<nd ^a
	III 2018	12,88 ± 1,57 ^c	4,071 ± 0,511 ^d	2,889 ± 0,140 ^c	0,199 ± 0,002 ^b	0,102 ± 0,015 ^a
Dostupni K (mg K ₂ O / 100 g zemljišta)	VI 2016	23,69 ± 0,05 ^d	18,15 ± 0,43 ^c	18,50 ± 1,148 ^c	8,205 ± 0,280 ^b	5,646 ± 0,660 ^a
	III 2018	27,72 ± 0,96 ^e	19,77 ± 1,87 ^d	15,17 ± 0,489 ^c	7,921 ± 0,815 ^b	5,926 ± 0,043 ^a

Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

<nd – ispod nivoa detekcije

Koncentracije ukupnog Fe u uzorcima sa odlagališta su bile 1,8 do 3,7 puta više u odnosu na kontrolu (Tabela 6). Istovremeno su bile i međusobno statistički različite između tretmana, izuzev RI_{NPK} i RI_0 na početku ogleda. Značajne razlike sadržaja pristupačnog Fe su manje izražene u odnosu na one zabeležene u njegovoj ukupnoj količini. Na kraju eksperimenta, manja pristupačnost Fe je detektovana u BU_{NPK} , dok je u ostalim tretmanima bila viša (Tabela 7).

Koncentracije ukupnog Mn u uzorcima flotacione jalovine su bile od 1,9 do 2,6 puta više u odnosu na kontrolno zemljište (Tabela 6). Na drugom uzorkovanju supstrata su izmerene nešto više koncentracije ukupnog Mn u svim uzorcima. Paralelno sa višom koncentracijom ukupnog Mn detektovane su i više koncentracije pristupačnog Mn u svim uzorcima sa flotacione jalovine (Tabela 7).

Koncentracije ukupnog Ni u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 1,8 do 2,5 puta više u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila od 1,5 do 1,8 puta viša (Tabela 6). U drugom uzorkovanju su koncentracije ukupnog Ni u svim tretmanima bile nešto više u odnosu na prvo uzorkovanje (Tabela 6). Višu koncentraciju ukupnog Ni prate i više koncentracije pristupačnog Ni u BU_{NPK} i R_0 (Tabela 7).

Koncentracije ukupnog Cd u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 182 do 195 puta više u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila 75,5 (BU_0), odnosno 166,3 (BU_{NPK}) puta viša (Tabela 6). U drugom uzorkovanju su koncentracije ukupnog Cd u svim tretmanima bile nešto više u odnosu na prvo uzorkovanje (Tabela 6). Više koncentracije ukupnog Cd su praćene i višim koncentracijama pristupačnog Cd u svim uzorcima sa flotacione jalovine (Tabela 7).

Koncentracije ukupnog Co u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 1,6 do 1,7 puta više u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila 1,5 do 1,6 puta viša (Tabela 6). U drugom uzorkovanju su koncentracije ukupnog Co u svim tretmanima bile nešto više u odnosu na prvo uzorkovanje (Tabela 6). Koncentracije pristupačnog Co u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 3,4 do 3,8 puta više u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila 1,1 do 1,6 puta viša prilikom prvog uzorkovanja (Tabela 7). Nasuprot ukupnim, koncentracije pristupačnog Co su u svim tretmanima bile nešto niže u drugom uzorkovanju.

Koncentracije ukupnog Cr u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 1,04 do 1,2 puta više u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila 1,4 do 1,5 puta viša (Tabela 6). U drugom uzorkovanju su koncentracije ukupnog Co u svim tretmanima bile nešto više u odnosu na prvo uzorkovanje za RI, dok su za C i BU bile nešto niže (Tabela 7). Koncentracije pristupačnog Co u uzorcima flotacione jalovine RI su bile od 0,3 do 2,8 puta niže u odnosu na kontrolu, dok je u uzorcima BU koncentracija bila 2,8 do 7,3 puta viša prilikom prvog uzorkovanja (Tabela 7). Koncentracije pristupačnog Cr su u C, BU_0 i RI_{NPK} tretmanima bile nešto više u drugom uzorkovanju, za razliku od ostalih tretmana kada su bile niže.

Tabela 6. Ukupne koncentracije metala u zemljištu i jalovini ($SV \pm SD \mu\text{g g}^{-1}$)

Element	Period uzorkovanja	C	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
Pb	VI 2016	23,28 ± 0,94 ^a	1023 ± 28 ^b	804,6 ± 18,9 ^c	1850 ± 21 ^d	1892 ± 4 ^c
	III 2018	25,02 ± 0,44 ^a	1434 ± 6 ^b	1009 ± 7 ^c	1534 ± 19 ^d	1513 ± 8 ^c
Zn	VI 2016	82,68 ± 0,74 ^a	3170 ± 111 ^b	2199 ± 78 ^c	4610 ± 129 ^d	3545 ± 104 ^e
	III 2018	95,78 ± 0,65 ^a	4424 ± 60 ^b	3024 ± 17 ^c	4431 ± 151 ^b	4700 ± 46 ^d
Cu	VI 2016	20,73 ± 0,47 ^a	649,9 ± 2,2 ^b	451,3 ± 34,7 ^c	888,1 ± 20,8 ^d	893,0 ± 11,9 ^d
	III 2018	23,28 ± 0,10 ^a	876,9 ± 3,1 ^b	496,9 ± 5,4 ^c	739,1 ± 3,0 ^d	860,6 ± 17,8 ^b
Fe	VI 2016	23752 ± 1213 ^a	43082 ± 1857 ^b	61404 ± 2015 ^c	85587 ± 526 ^d	86990 ± 2276 ^d
	III 2018	34059 ± 691 ^a	60093 ± 1497 ^b	64288 ± 1495 ^c	76021 ± 1633 ^d	78702 ± 1277 ^e
Mn	VI 2016	748,7 ± 26,0 ^a	1613 ± 33 ^b	1439 ± 1 ^c	1920 ± 14 ^d	1793 ± 44 ^c
	III 2018	896,1 ± 9,4 ^a	1874 ± 13 ^b	1829 ± 22 ^c	2126 ± 54 ^d	2146 ± 48 ^d
Ni	VI 2016	37,66 ± 1,31 ^a	58,84 ± 2,14 ^b	55,57 ± 0,56 ^c	75,75 ± 1,08 ^d	75,30 ± 1,41 ^d
	III 2018	42,51 ± 0,39 ^a	74,69 ± 0,47 ^b	70,40 ± 0,50 ^c	77,10 ± 0,85 ^d	105,8 ± 0,2 ^e
Cd	VI 2016	0,134 ± 0,001 ^a	22,29 ± 2,77 ^b	10,12 ± 0,43 ^c	26,16 ± 0,78 ^d	24,38 ± 0,33 ^b
	III 2018	0,153 ± 0,018 ^a	29,49 ± 0,25 ^b	14,06 ± 0,02 ^c	30,06 ± 0,64 ^b	28,52 ± 0,10 ^e
Co	VI 2016	8,027 ± 0,261 ^a	12,32 ± 0,21 ^b	12,55 ± 0,09 ^b	12,81 ± 0,05 ^c	13,97 ± 0,07 ^d
	III 2018	11,08 ± 0,14 ^a	15,76 ± 0,38 ^b	14,28 ± 0,17 ^c	16,46 ± 0,18 ^d	17,98 ± 0,02 ^e
Cr	VI 2016	38,27 ± 2,36 ^a	56,94 ± 0,80 ^b	53,48 ± 1,97 ^c	45,57 ± 1,02 ^d	39,83 ± 1,52 ^a
	III 2018	36,35 ± 0,27 ^a	53,03 ± 0,20 ^b	43,21 ± 0,15 ^c	47,03 ± 0,07 ^d	46,75 ± 0,36 ^d

Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Koncentracije pristupačnih formi metala u zemljištu i jalovini ($SV \pm SD \mu\text{g g}^{-1}$)

Element	Period uzorkovanja	C	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
Pb	VI 2016	6,016 ± 0,243 ^a	256,1 ± 5,5 ^b	186,3 ± 2,8 ^c	439,0 ± 2,1 ^d	525,6 ± 0,4 ^e
	III 2018	5,888 ± 0,165 ^a	364,6 ± 3,3 ^b	229,8 ± 2,3 ^c	487,2 ± 47,6 ^d	544,8 ± 1,4 ^e
Zn	VI 2016	2,695 ± 0,304 ^a	307,6 ± 11,5 ^b	205,3 ± 7,7 ^c	536,1 ± 13,2 ^d	540,8 ± 8,3 ^d
	III 2018	3,445 ± 0,119 ^a	431,0 ± 11,1 ^b	285,4 ± 0,5 ^c	455,7 ± 30,2 ^b	569,6 ± 0,7 ^d
Cu	VI 2016	6,905 ± 0,452 ^a	82,39 ± 1,44 ^b	26,33 ± 0,38 ^c	53,02 ± 0,42 ^d	83,81 ± 2,92 ^b
	III 2018	6,626 ± 0,030 ^a	79,39 ± 0,71 ^b	32,54 ± 0,50 ^c	65,72 ± 6,42 ^d	95,35 ± 1,58 ^c
Fe	VI 2016	81,15 ± 9,43 ^a	52,30 ± 5,69 ^b	47,68 ± 0,93 ^b	44,61 ± 1,73 ^c	43,60 ± 0,37 ^c
	III 2018	72,39 ± 0,02 ^a	43,10 ± 0,15 ^b	59,89 ± 1,53 ^c	63,04 ± 3,24 ^c	61,11 ± 3,19 ^c
Mn	VI 2016	136,4 ± 14,3 ^a	111,0 ± 6,7 ^{bc}	114,7 ± 4,9 ^c	106,8 ± 5,9 ^b	116,0 ± 2,0 ^c
	III 2018	107,9 ± 0,5 ^a	137,4 ± 4,0 ^b	149,6 ± 5,1 ^c	131,6 ± 10,0 ^b	153,4 ± 8,3 ^c
Ni	VI 2016	5,790 ± 0,339 ^a	4,022 ± 0,229 ^b	3,725 ± 0,039 ^c	4,093 ± 0,115 ^b	4,876 ± 0,047 ^d
	III 2018	4,675 ± 0,060 ^a	4,264 ± 0,056 ^b	3,220 ± 0,034 ^c	3,530 ± 0,319 ^c	6,886 ± 0,052 ^d
Cd	VI 2016	0,113 ± 0,008 ^a	3,687 ± 0,228 ^b	2,921 ± 0,160 ^c	5,770 ± 0,149 ^d	5,052 ± 0,012 ^c
	III 2018	0,117 ± 0,009 ^a	5,131 ± 0,005 ^b	3,937 ± 0,007 ^c	5,875 ± 0,495 ^d	6,766 ± 0,009 ^e
Co	VI 2016	0,619 ± 0,046 ^a	0,982 ± 0,014 ^b	0,672 ± 0,105 ^a	2,359 ± 0,109 ^c	2,123 ± 0,420 ^c
	III 2018	0,482 ± 0,029 ^a	0,890 ± 0,035 ^b	0,552 ± 0,099 ^a	1,814 ± 0,123 ^c	1,987 ± 0,096 ^c
Cr	VI 2016	0,898 ± 0,085 ^a	0,123 ± 0,023 ^b	0,317 ± 0,024 ^c	0,241 ± 0,033 ^d	0,324 ± 0,048 ^c
	III 2018	1,165 ± 0,058 ^a	0,098 ± 0,000 ^b	0,406 ± 0,065 ^c	0,328 ± 0,037 ^d	0,286 ± 0,005 ^e

Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.2. Hemijski sastav biljnog materijala

4.2.1. Sadržaj N u biljnom materijalu

Koncentracije N u biljnim organima *M. × giganteus* gajenih na odlagalištu jalovine i kontrolnom zemljištu su predstavljene u Grafikonu 1.

Tokom obe godine, sve biljke gajene na flotacionoj jalovini su se odlikovale značajno nižim sadržajem azota u korenu u odnosu na kontrolne biljke. Razlike u sadržaju N između đubrenih i neđubrenih biljaka su izražene kod RI biljaka u svim fazama.

Sadržaj azota u rizomima kontrolnih biljaka se tokom obe godine menjao na pravilan način. Naime, koncentracija N je značajno niža u avgustu u odnosu na rizome uzorkovane u junu, zatim pokazuje postepen rast tokom leta i jeseni da bi se na kraju sezone (mart) vratila na početnu vrednost izmerenu u rizomima na početku sezone (jun). Takođe i biljke gajene na flotacionoj jalovini pokazuju pravilnu promenu sadržaja azota koja se ogleda u postepenom povećanju u periodu jun-novembar, a zatim postepenom smanjenju koje se detektuje u martu. Kao i u slučaju korenova, razlike u sadržaju N između đubrenih i neđubrenih biljaka se uočavaju u drugoj godini gajenja, i posebno su izražene kod RI biljaka.

U stablu biljaka iz svih tretmana koncentracija N je najviša u fazi aktivnog rasta biljaka u junu, da bi u svim narednim fazama bila značajno niža. U svakoj od godina istraživanja najviše koncentracije N u stablu su zabeležene kod RI_{NPK} biljaka u junu.

Biljke iz svih tretmana najveći sadržaj azota u listu imaju u fazi intenzivnog rasta, odnosno u junu. Nakon toga njegov sadržaj se postepeno smanjuje, pa je niži sadržaj zabeležen u avgustu u odnosu na jun. Dalji pad koncentracije N u listovima je rezultirao u najnižim i sličnim vrednostima u novembru i martu svake godine tokom trajanja eksperimenta.

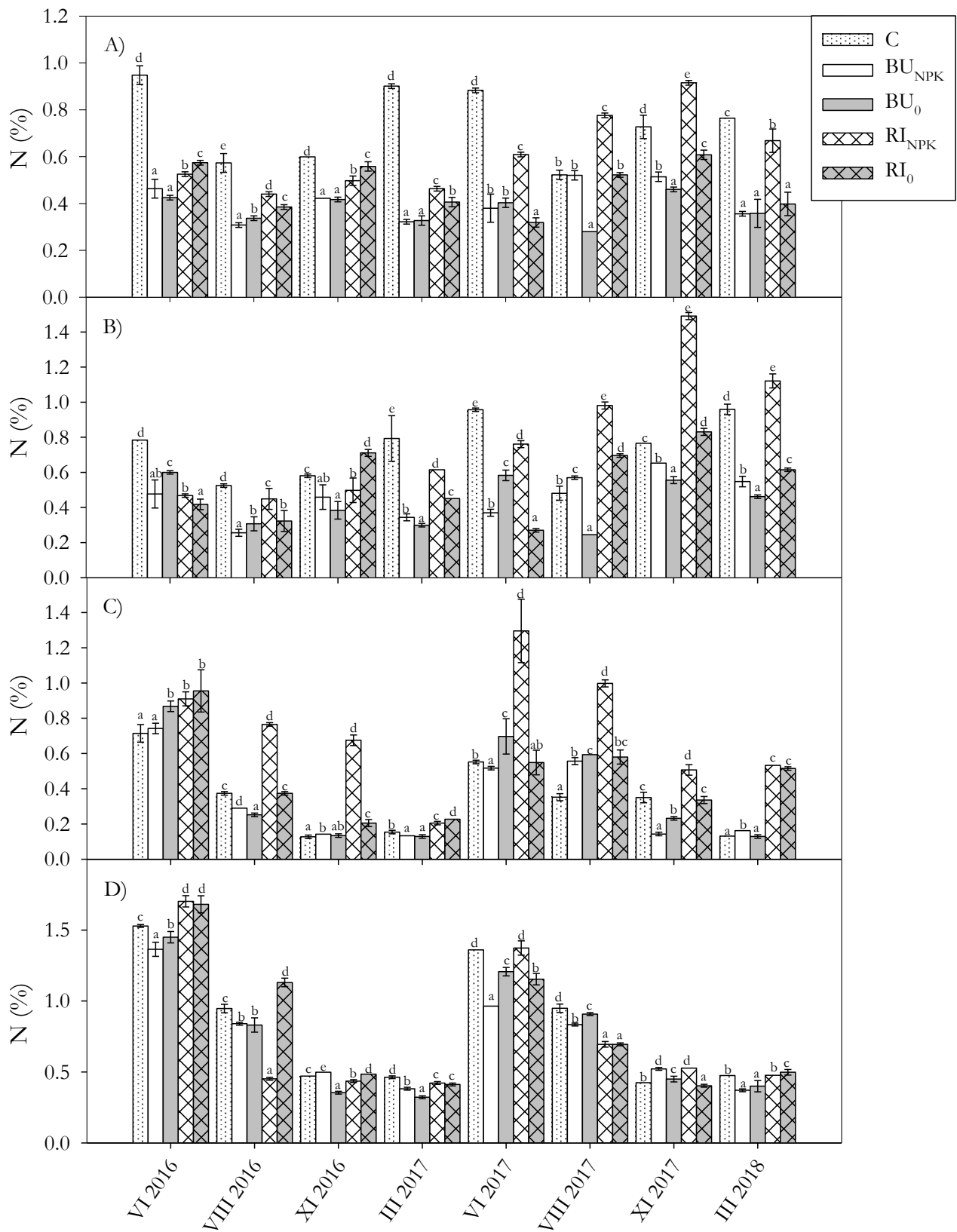
4.2.2. Sadržaj P u biljnom materijalu

Na Grafikonu 2 su prikazane koncentracije fosfora u biljkama gajenim na kontrolnom zemljištu i odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne godine.

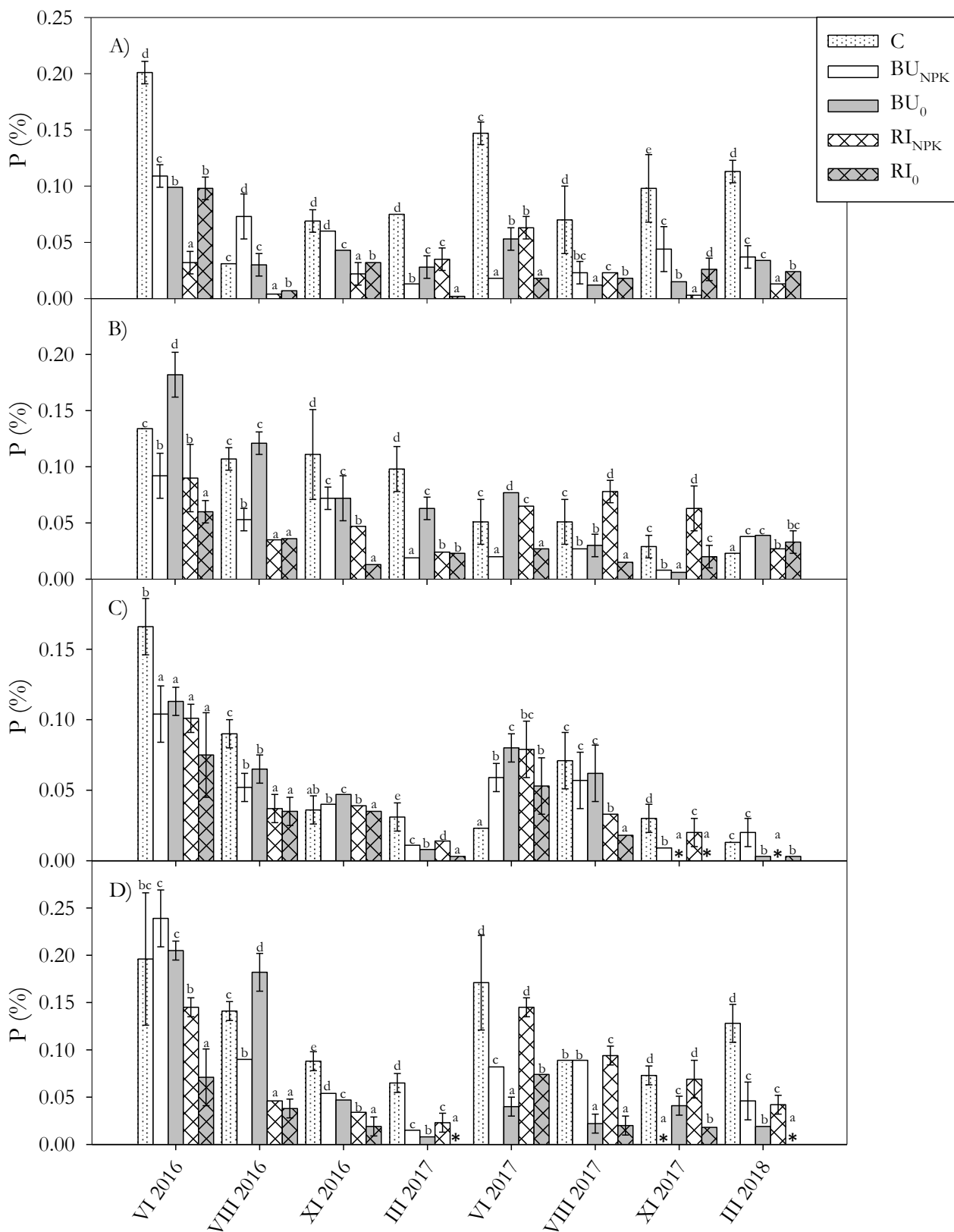
Koncentracije P u korenovima biljaka sa flotacione jalovine su bile značajno niže u odnosu na kontrolu, posebno tokom druge godine rasta. Najniže koncentracije P su detektovane u korenu RI biljaka. Kontrolne biljke pokazuju pravilnost u promeni koncentracije P tokom godine: najviša koncentracija je u junu, zatim dolazi do pada zbog čega je najniža vrednost izmerena u avgustu, da bi se zatim sadržaj P postepeno povećavao tokom jeseni i zime. Međutim, biljke sa flotacione jalovine ne ispoljavaju ovakvu pravilnost, jer se kod njih nakon prve faze intenzivnog rasta sadržaj P snižava.

U rizomu, sadržaj P je bio značajno niži kod biljaka sa flotacione jalovine tokom prve godine, posebno kod RI biljaka. Međutim, tokom druge godine koncentracija P je u većem broju uzorkovanja nešto niža ili viša u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne biljke. Tokom prve vegetacione sezone, koncentracija P se postepeno smanjuje pa je u martu bila uočljivo niža u odnosu na jun iste sezone, osim kod BU_{NPK} i RI₀ u drugoj sezoni.

Stabla biljaka svih tretmana tokom prve godine pokazuju pravilno smanjenje koncentracije P, da bi se tokom druge godine ovaj trend nastavio. Listovi biljaka iz svih tretmana tokom prve godine pokazuju manje ili više pravilno smanjenje koncentracije P, dok se tokom druge godine ovakva pravilnost uočava samo kod RI tretmana. Veći sadržaj P u listovima đubrenih u odnosu na neđubrene biljke sa statistički značajnim razlikama se uočava tokom skoro celog perioda posmatranja (izuzev avgusta prve godine za sve tretmane sa jalovine, i novembra druge godine za BU).



Grafikon 1. Koncentracija N u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 2. Koncentracija P u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. * - ispod nivoa detekcije. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.2.3. Sadržaj K u biljnom materijalu

Grafikon 3 predstavlja koncentracije K u organima *M. × giganteus* gajenog na nezagađenom kontrolnom zemljištu i na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne godine.

Tokom prve i druge godine istraživanja u korenovima RI tretmana se uočava povećanje koncentracije K do novembra, a potom sledi blagi pad koncentracije u martu. Tokom druge godine u korenovima BU₀ koncentracije K rastu do novembra nakon čega se u martu uočavaju niže koncentracije. U korenovima BU_{NPK} tretmana tokom druge godine se uočava nagli skok koncentracije u avgustu nakon čega koncentracija K opada. Nešto viši sadržaj kalijuma u korenovima je detektovan u pojedinim terminima merenja kod đubrenih u odnosu na neđubrene biljke, sa statistički značajnim razlikama zabeleženim kod RI biljaka tokom cele prve godine i u avgustu i martu druge godine, a kod BU biljaka u junu i novembru prve i junu i avgustu druge godine.

Sadržaj K u rizomima kontrolnih biljaka se tokom svake godine postepeno povećavao i najvišu vrednost dostigao u martu. Isti trend pokazuje sadržaj K kod svih ostalih tretmana tokom prve godine, dok se tokom druge godine gajenja ovaj porast koncentracije uočava u periodu avgust-mart kod BU i RI_{NPK} tretmana.

Tokom obe godine koncentracija K u stablima kontrolnih i BU biljaka je bila najviša u junu, da bi zatim postepeno opadala tokom sezone. Isti trend se uočava i kod RI tretmana tokom druge sezone rasta, dok su tokom prve godine najviše koncentracije K detektovane u avgustu. Najniže koncentracije K su zabeležene uvek u martu pred žetvu biljka. Viši sadržaj kalijuma u stablu je detektovan kod đubrenih u odnosu na neđubrene biljke, sa statistički značajnim razlikama zabeleženim samo u biljkama uzorkovanim u martu obe godine, kao i u junu i avgustu druge godine.

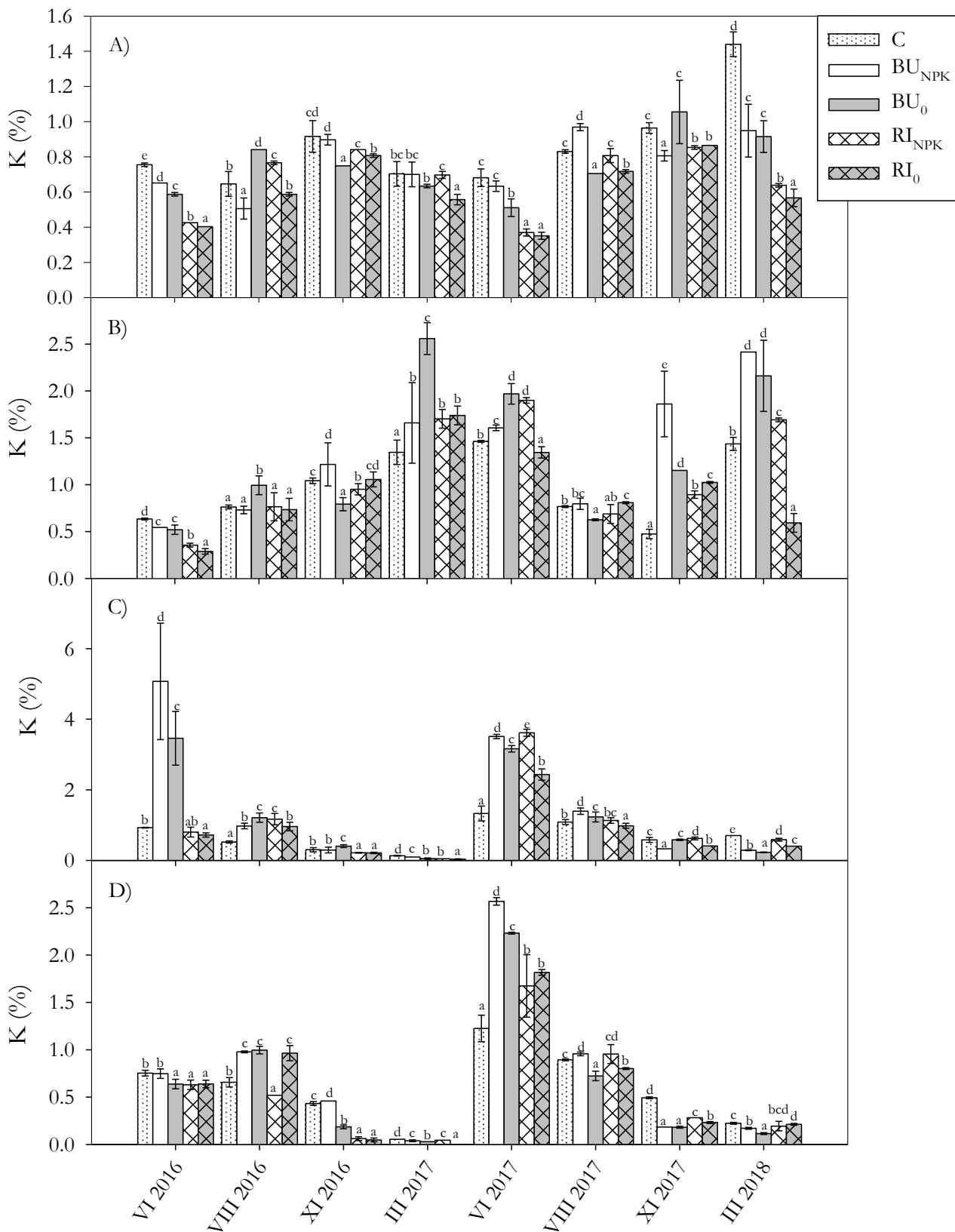
Koncentracija K je u svim uzorcima lista bila višestruko viša u periodu jun-avgust u odnosu na sadržaj senescentnih listova u novembru i martu. Pri tome, značajnije razlike u sadržaju K između đubrenih i neđubrenih biljaka se sreću kod BU biljaka i to u junu, novembru i martu prve godine, kao i u junu, avgustu i martu druge godine rasta.

4.2.4. Sadržaj Pb u biljnom materijalu

Koncentracije Pb u biljnim organima biljaka *M. × giganteus* gajenih na odlagalištu flotacione jalovine i kontrolnom zemljištu su prikazane na Grafikonu 4. Biljke gajene na flotacionoj jalovini su akumulirale višestruko veće koncentracije Pb u svim organima u odnosu na kontrolne biljke. Poređenjem koncentracija Pb u biljnim organima uočava se da su najviše koncentracije prisutne u korenovima biljaka. Najniže koncentracije su prisutne u rizomima, izuzev tretmana RI₀ kod koga je najniža koncentracija detektovana u stablu.

Tokom prve godine gajenja biljaka, višim koncentracijama Pb u korenu se odlikuju biljke RI, da bi tokom druge godine rasta ove razlike postale značajno manje izražene između BU i RI biljaka (Grafikon 4A). Tretman BU₀ ima ujednačene koncentracije tokom obe vegetacione sezone. Značajno višim koncentracijama Pb u korenu se odlikuju đubrene u odnosu na neđubrene RI biljke (VIII-XI 2016., VIII 2016-III 2017.) i BU biljke (VIII-XI 2016., XI 2016-III 2017.). Poređenje srednjih vrednosti koncentracija Pb u korenovima biljaka tokom dve sezone ukazuje da biljke tretirane NPK đubrivom u korenu imaju za 29,5% (BU_{NPK}) i 25,2% (RI_{NPK}) višu koncentraciju Pb u odnosu na netretirane biljke.

Koncentracija olova u rizomima BU biljaka u prvoj godini rasta je bila značajno niža nego kod RI biljaka, sa koncentracijama koje su bile značajno više kod BU₀ u odnosu na BU_{NPK} biljke (Grafikon 4B). U drugoj sezoni rasta, koncentracije Pb su bile približne kod svih biljaka gajenih na flotacionoj jalovini. Za razliku od ostalih tretmana, kod BU_{NPK} se uočava trend rasta koncentracije Pb tokom druge godine.



Grafikon 3. Koncentracija K u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Rast koncentracija Pb u listovima se uočava u BU₀ tokom druge, a u RI_{NPK} tokom prve godine gajenja (Grafikon 4D). Sadržaj olova u listovima biljaka tokom druge godine gajenja na odlagalištu flotacione jalovine se postepeno povećavao. Pored toga, poređenje srednjih vrednosti koncentracija Pb u listovima biljaka tokom dve sezone ukazuje da đubrenje kod BU_{NPK} biljaka smanjuje akumulaciju Pb u listovima za 15,2% u odnosu na BU₀, dok kod RI_{NPK} biljaka je povećava za 29,4% u odnosu na RI₀.

4.2.5. Sadržaj Zn u biljnom materijalu

Na Grafikonu 5 su predstavljene koncentracije Zn u organima kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na flotacionoj jalovini. Najniže koncentracije Zn u svim organima su detektovane kod kontrolnih biljaka. Kod biljaka gajenih na jalovini, najviše koncentracije Zn su prisutne u korenovima (Grafikon 5A), nešto niže u stablu (Grafikon 5C), a najniže u rizomu i listovima (Grafikon 5B, D). Značajno više koncentracije u korenu tokom dve uzastopne godine u odnosu na preostale tretmane sa jalovišta su detekovane kod biljaka dobijenih iz rizoma tretiranih NPK đubrivom (RI_{NPK}) (Grafikon 5A). Sličan trend pokazuju njihovi rizomi i stablo u drugoj godini rasta, u najvećem broju uzorkovanja. Koncentracije Zn u listovima su značajno više tokom prve sezone rasta u odnosu na drugu tokom koje su ujednačene između tretmana (Grafikon 5D). Posebno se izdvaja tretman RI_{NPK} kod koga su detektovane značajno više koncentracije Zn krajem obe vegetacione sezone (XI 2016., XI 2016.-III 2017.).

Pored pozitivnog uticaja đubrenja na koncentraciju Zn u RI_{NPK} biljkama, uočava se i pozitivan odnos između tretmana NPK đubrivom i srednjih vrednosti koncentracija Zn u korenu BU biljaka tokom prve i rizomu obe godine. Analizirajući prosečnu koncentraciju Zn u korenu tokom dve godine uočava se da je srednja vrednost koncentracija u korenu NPK-tretiranih biljaka tokom dve godine bila u proseku viša u odnosu na netretirane, i to kod BU za 6,9%, a kod RI za čak 76,9% (Grafikon 5A).

4.2.6. Sadržaj Cu u biljnom materijalu

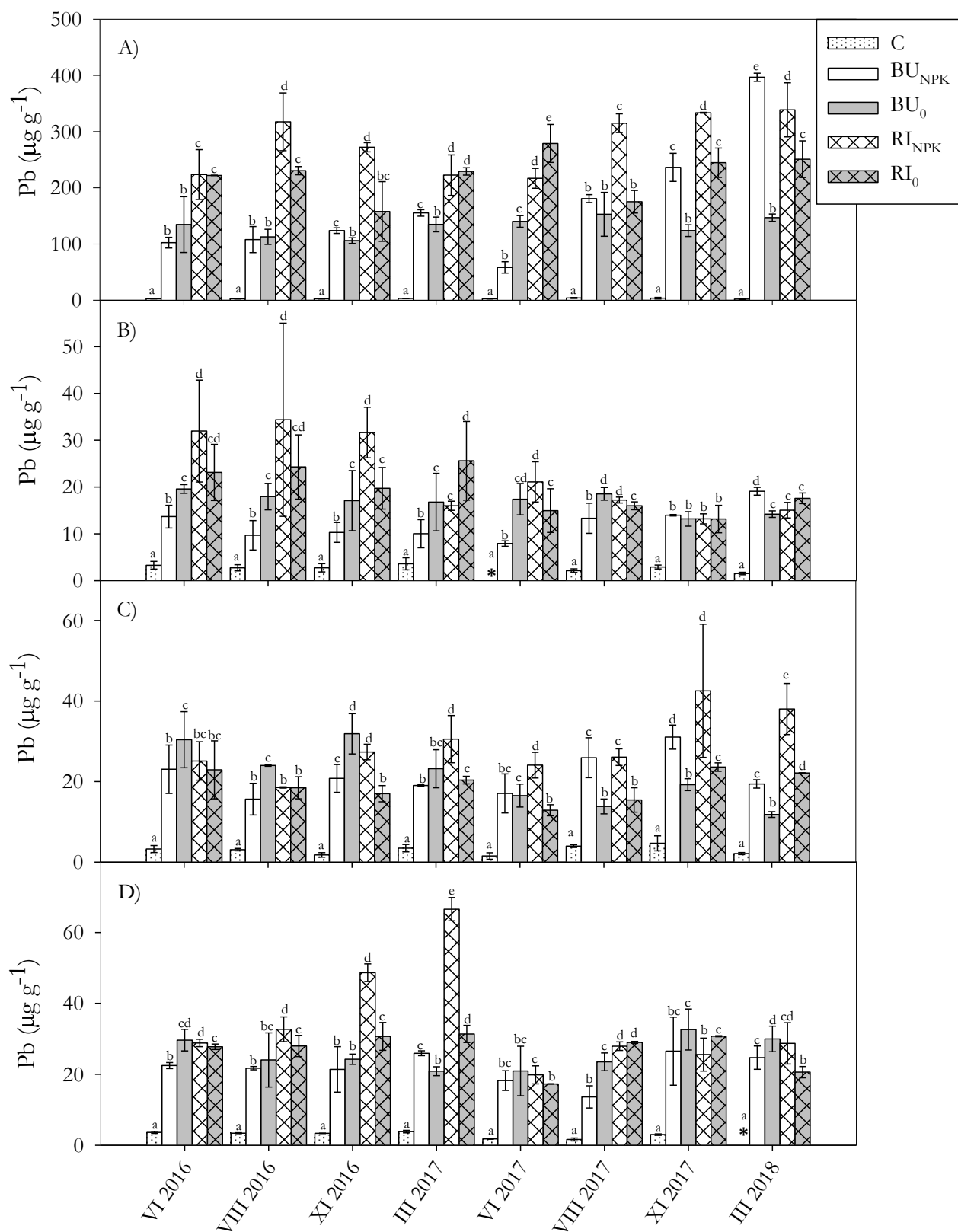
Grafikon 6 predstavlja koncentracije Cu u organima *M. × giganteus* gajenog na nezagađenom kontrolnom zemljištu i na odlagalištu jalovine tokom dve uzastopne godine. U biljkama gajenim na flotacionoj jalovini su detektovane višestruko više koncentracije Cu u odnosu na kontrolne biljke. Najviše koncentracije Cu su detektovane u korenu, a najniže u stablima.

Analizom srednjih vrednosti koncentracije Cu tokom dve godine uočava se da đubrene biljke imaju 16% (BU) odnosno 63,4 % (RI) veću koncentraciju Cu u korenu (Grafikon 6A). Tako je najviša koncentracija bakra u korenovima detektovana u RI_{NPK}, a najniža u BU₀. Korenovi BU_{NPK} pokazuju povećanje koncentracije Cu tokom svake od sezona.

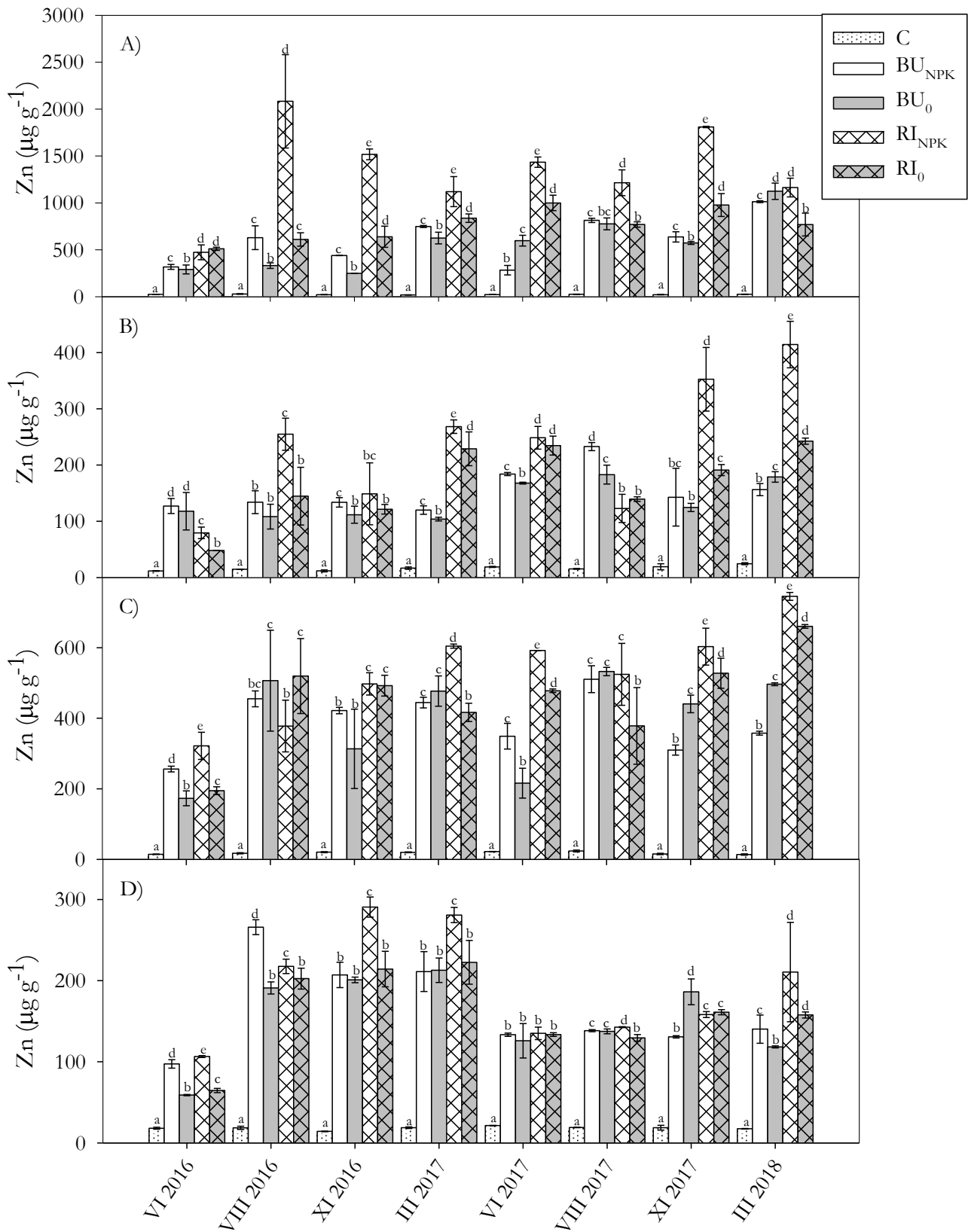
Najviša koncentracija Cu u rizomima, stablima i listovima je detektovana takođe kod RI_{NPK}, a najniža u BU_{NPK} (Grafikon 6B-D). Dodatno, biljke tretirane NPK đubrivom u listovima sadrže niže srednje vrednosti koncentracije Cu za dve godine, i to 23,2% (BU) i 15,9% (RI) u odnosu na netretirane. U listovima biljaka svih tretmana tokom prve vegetacione sezone je uočljiv jasan trend rasta koncentracije Cu od početka do kraja svake od sezona. Najviše koncentracije Cu su zabeležene u listovima RI biljaka u novembru i martu prve, kao i martu druge godine.

4.2.7. Sadržaj Fe u biljnom materijalu

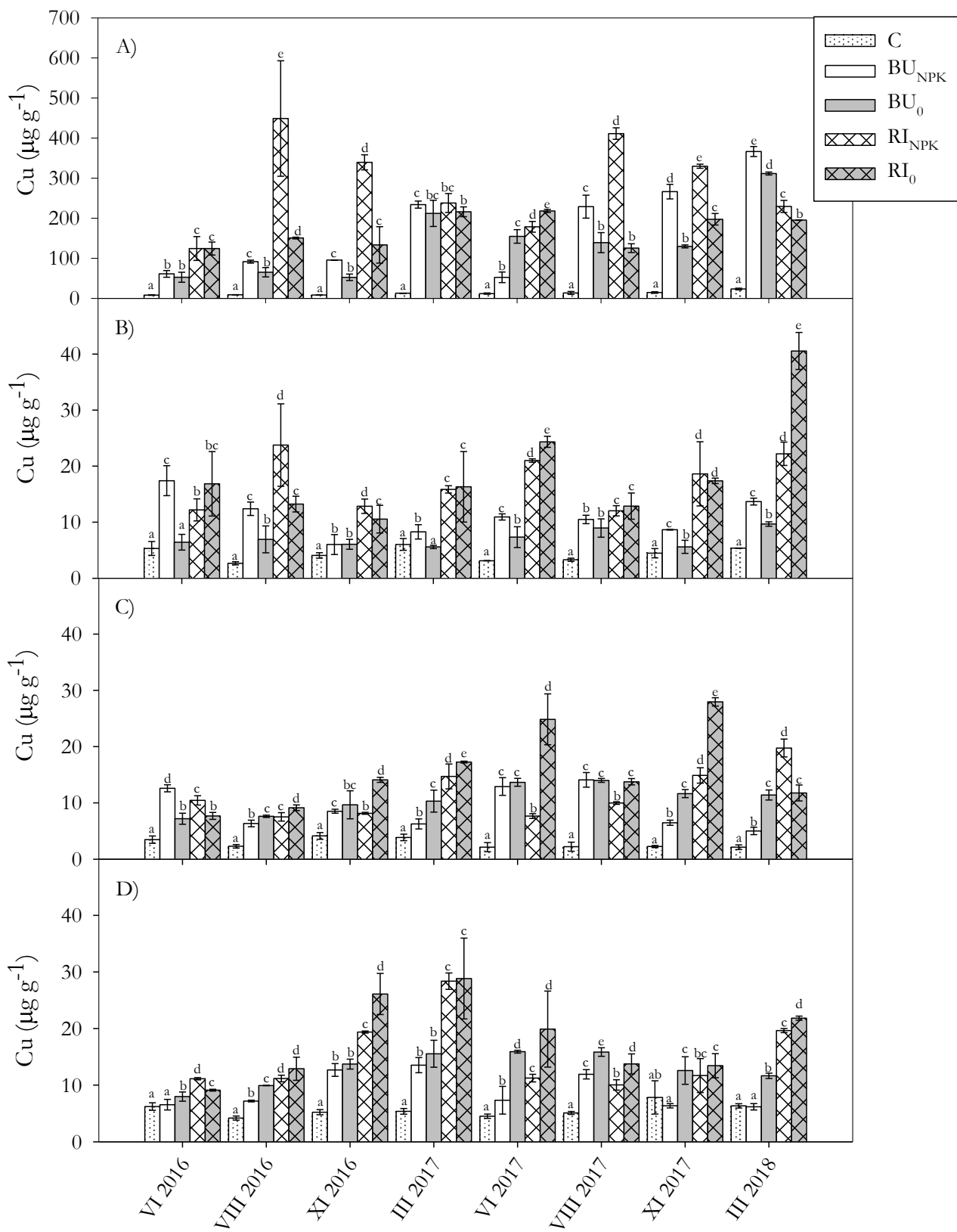
Biljke gajene na flotacionoj jalovini su usvojile i akumulirale Fe u značajno višim koncentracijama u svim organima u odnosu na kontrolne biljke (Grafikon 7). Najviše koncentracije Fe kod svih biljaka, kontrolnih i biljaka sa flotacione jalovine, su detektovane u korenu, nešto niže u rizomu, a najniže u nadzemnim organima – stablu i listovima.



Grafikon 4. Koncentracija Pb u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. * - ispod nivoa detekcije. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 5. Koncentracija Zn u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 6. Koncentracija Cu u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Najviše prosečne koncentracije Fe u BU biljkama su izmerene na kraju druge vegetacione sezone (III 2017.), dok su u RI biljkama najveće prosečne koncentracije Fe zabeležene takođe u drugoj vegetacionoj sezoni, ali nešto ranije: kod RI_{NPK} tokom faze remobilizacije nutrijenata (novembar), a kod RI₀ tokom perioda intenzivnog rasta i funkcionisanja biljke (jun).

Kada je reč o prosečnim koncentracijama za dve godine, najviša koncentracija Fe u korenovima je detektovana kod RI_{NPK} biljaka, a najniža kod BU₀, ne uzimajući u obzir kontrolu koja je imala najnižu koncentraciju Fe (Grafikon 7A). RI biljke se odikuju značajno višom koncentracijom Fe u korenu tokom prve godine rasta u odnosu na BU biljke, a slične vrednosti su zadržale i u drugoj godini. S druge strane, prosečne koncentracije Fe u korenu BU biljaka su u prvoj godini bile tek nešto više u odnosu na kontrolu, a daleko niže u odnosu na RI. Međutim, tokom druge godine rasta na odlagalištu flotacione jalovine koncentracije Fe u korenu BU biljaka su bile značajno više u odnosu na prvu godinu i po proseku se približile koncentracijama kod RI biljaka. Prosečne koncentracije Fe u korenu su bile više tokom prve godine kod RI_{NPK} biljaka u odnosu na RI₀, mada uglavnom bez statističke značajnosti. Ipak, u drugoj godini gajenja biljka se jasno uočava postojanje statistički značajno viših koncentracija Fe u korenovima biljaka tretiranih sa NPK u odnosu na netretirane, u oba tretmana (BU i RI).

RI biljke su u svim uzorkovanjima tokom dve godine imale značajno više koncentracije Fe u rizomu u odnosu na C i BU (Grafikon 7B). Krajem druge sezone gajenja, posebno visokim koncentracijama Fe se odlikuju rizomi RI_{NPK} biljaka.

U stablima je najviša prosečna koncentracija bila prisutna u BU₀, a najniža u RI_{NPK} (Grafikon 7C). Poređenjem prosečnih koncentracija Fe u stablu se uočava da biljke koje nisu tretirane NPK đubrivom po pravilu sadrže više koncentracije Fe u odnosu na đubrene biljke.

Najviša prosečna koncentracija Fe u listovima tokom dve godine je izmerena u RI₀, a najniža u BU_{NPK} (Grafikon 7D). Listovi biljaka svih tretmana, osim kontrole, tokom obe vegetacione sezone pokazuju postepenu akumulaciju Fe, zbog čega su najviše vrednosti detektovane na kraju obe sezone, u martu 2017. i 2018. godine.

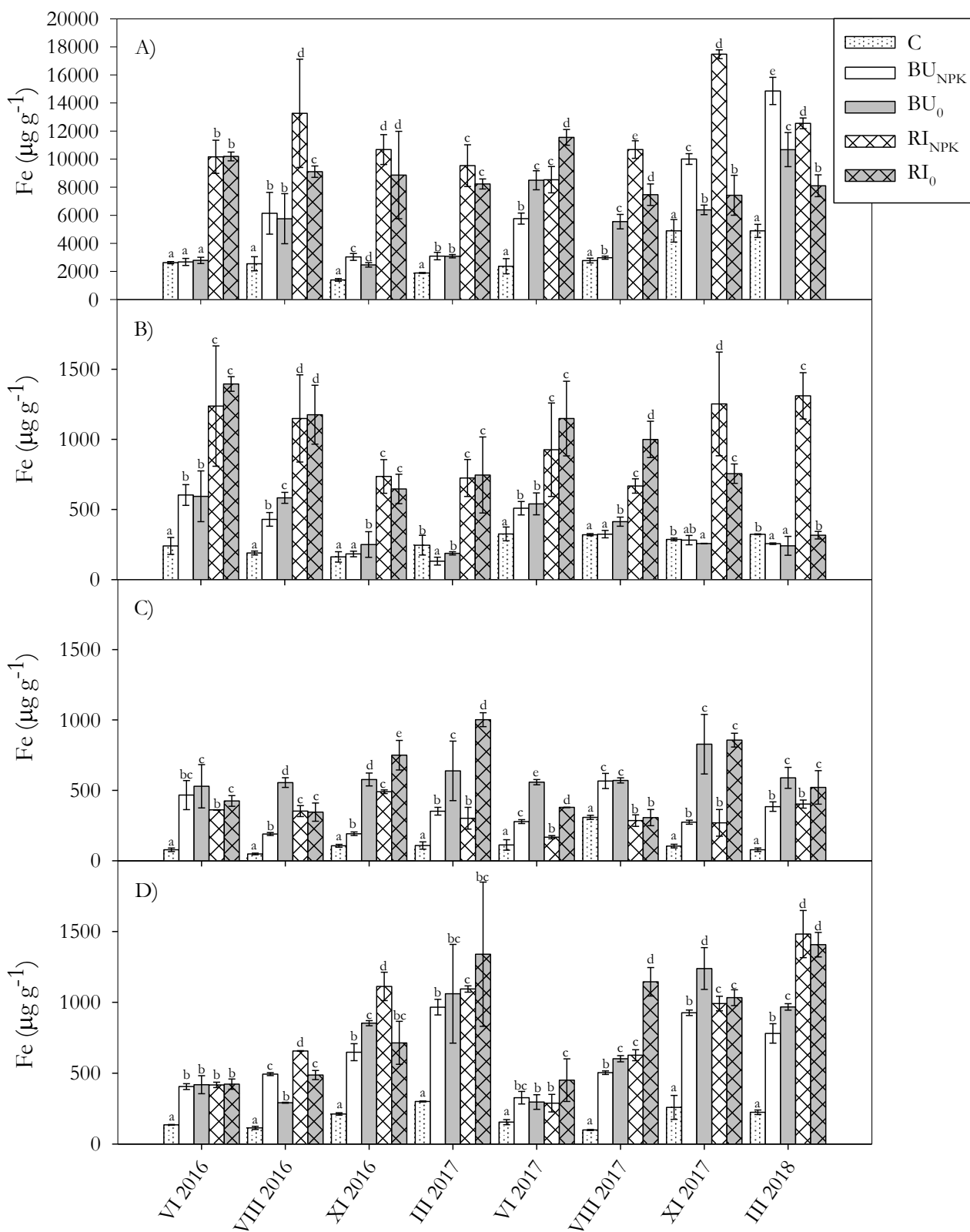
4.2.8. Sadržaj Mn u biljnom materijalu

Na Grafikonu 8 su predstavljene koncentracije Mn u pojedinačnim biljnim organima *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa biljkama gajenih na černozeu. Najniže koncentracije Mn su detektovane u rizomima, a najviše u korenovima.

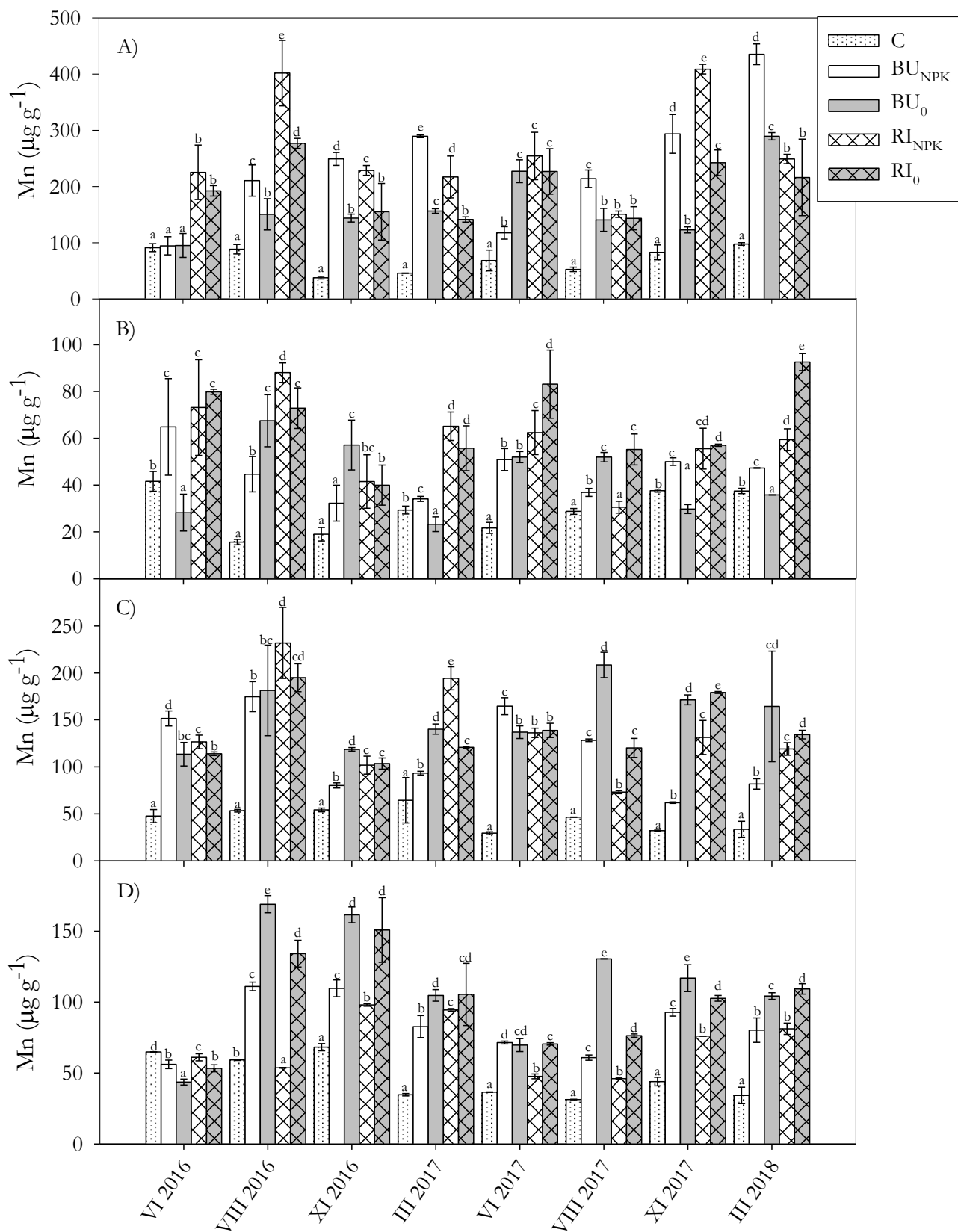
Biljke gajene na flotacionoj jalovini se, bez obzira na tretman i sadni materijal, odlikuju značajno višim koncentracijama Mn u korenovima u odnosu na kontrolne biljke (Grafikon 8A). Pri tome su značajno više koncentracije Mn u korenu detektovane kod biljaka koje su rasle iz rizoma i busenova tretiranih NPK đubrivom u odnosu na netretirane. Pored toga, koncentracija Mn u korenu BU_{NPK} biljaka se progresivno povećavala tokom svake sezone rasta, pa je najviša vrednost zabeležena u martu (Grafikon 8A), dok se u ostalim tretmanima ne uočava ovakva pravilnost. Kada je reč o uticaju NPK đubriva na sadržaj Mn u korenu, sve đubrene biljke su u proseku za obe vegetacione sezone u korenovima akumulirale veće koncentracije Mn. Tako je koren BU_{NPK} u proseku za dve godine sadržao oko 43,6% više Mn u odnosu na BU₀, dok je kod RI_{NPK} sadržao 33,9% više Mn u odnosu na RI₀.

U slučaju rizoma i stabala se ne uočava jasan trend promena u koncentraciji Mn tokom vremena (Grafikon 8B, 8C). Nasuprot tome, biljke tretirane NPK su istovremeno imale značajno niže koncentracije Mn u listovima, i to za 26,1% (BU) i 30,5% (RI). Tokom perioda jun-novembar, u listovima svih biljaka sa jalovišta koncentracija Mn se povećala, da bi nakon toga njegov sadržaj u listovima blago opadao ili stagnirao do trenutka žetve u martu (Grafikon 8D).

Poređenjem prosečnih koncentracija Mn uočava se da RI_{NPK} biljke imaju veće koncentracije Mn u korenu, a manje u listovima u odnosu na RI₀ biljke.



Grafikon 7. Koncentracija Fe u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 8. Koncentracija Mn u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.2.9. Sadržaj Ni u biljnom materijalu

Najviše koncentracije Ni su detektovane u korenovima biljaka svih tretmana. Poređenjem srednjih vrednosti koncentracija Ni u korenovima uočavaju se više koncentracije Ni kod biljaka tretiranih NPK đubrivom u odnosu na netretirane i to za 14,8% kod BU biljaka i 25,8% kod RI. Ustanovljena je i povećana akumulacija Ni u listovima BU_{NPK} biljaka za 28% u odnosu na BU₀, kao i smanjenje koncentracije Ni u listovima RI_{NPK} biljaka za 34,3% u odnosu na RI₀. S druge strane, akumulacija Ni nije pokazala zavisnost od supstrata, kao ni od faze razvoja biljke.

Koncentracija Ni u korenu biljaka se postepeno povećavala tokom perioda od dve godine (Grafikon 9A). Za razliku od RI biljaka koje su već nekoliko meseci od početka rasta na flotacionoj jalovini akumulirale značajno višu koncentraciju Ni u odnosu na kontrolne i BU biljke, kod BU biljaka se uočava postepeno povećanje sadržaja Ni u korenu koji najviše vrednosti dostiže na kraju eksperimentalnog perioda, u martu 2018. godine. Pozitivan uticaj đubrenja na sadržaj Ni u korenu se dobro uočava kod RI biljaka, iako razlike nisu uvek statistički značajne. Ovakav uticaj đubrenja se uočava i kod BU biljaka počevši od kraja prve sezone gajenja.

Koncentracije Ni u rizomima, stablu i listovima ne prate promene u koncentracijama u korenu i često su čak i niže u odnosu na kontrolu (Grafikon 9B-D). Osim toga, RI biljke u poslednjoj fazi eksperimenta imaju značajno više koncentracije Ni u rizomu, stablu i listovima u odnosu na BU biljke.

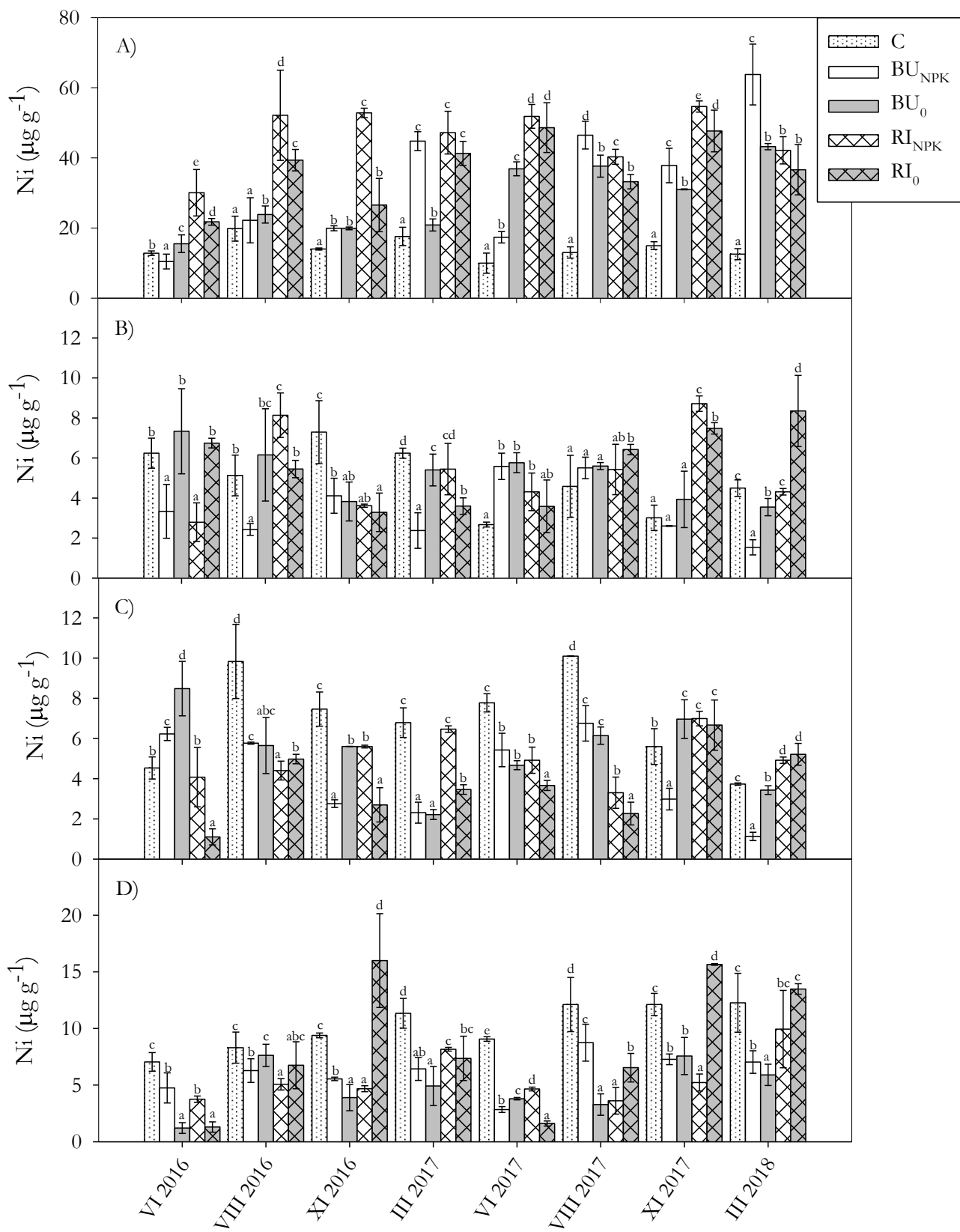
4.2.10. Sadržaj Cd u biljnom materijalu

Na Grafikonu 10 (A-D) su predstavljene koncentracije Cd u pojedinim biljnim organima biljaka gajenih na flotacionoj jalovini i kontrolnim biljkama gajenim na nezagađenom černozeu. Biljke gajene na flotacionoj jalovini imaju značajno više koncentracije Cd u svim organima. Kod ovih biljaka se uočava sledeća distribucija Cd: list < rizom < stablo < koren, pri čemu su koncentracije u korenu višestruko više u odnosu na one u ostalim biljnim organima.

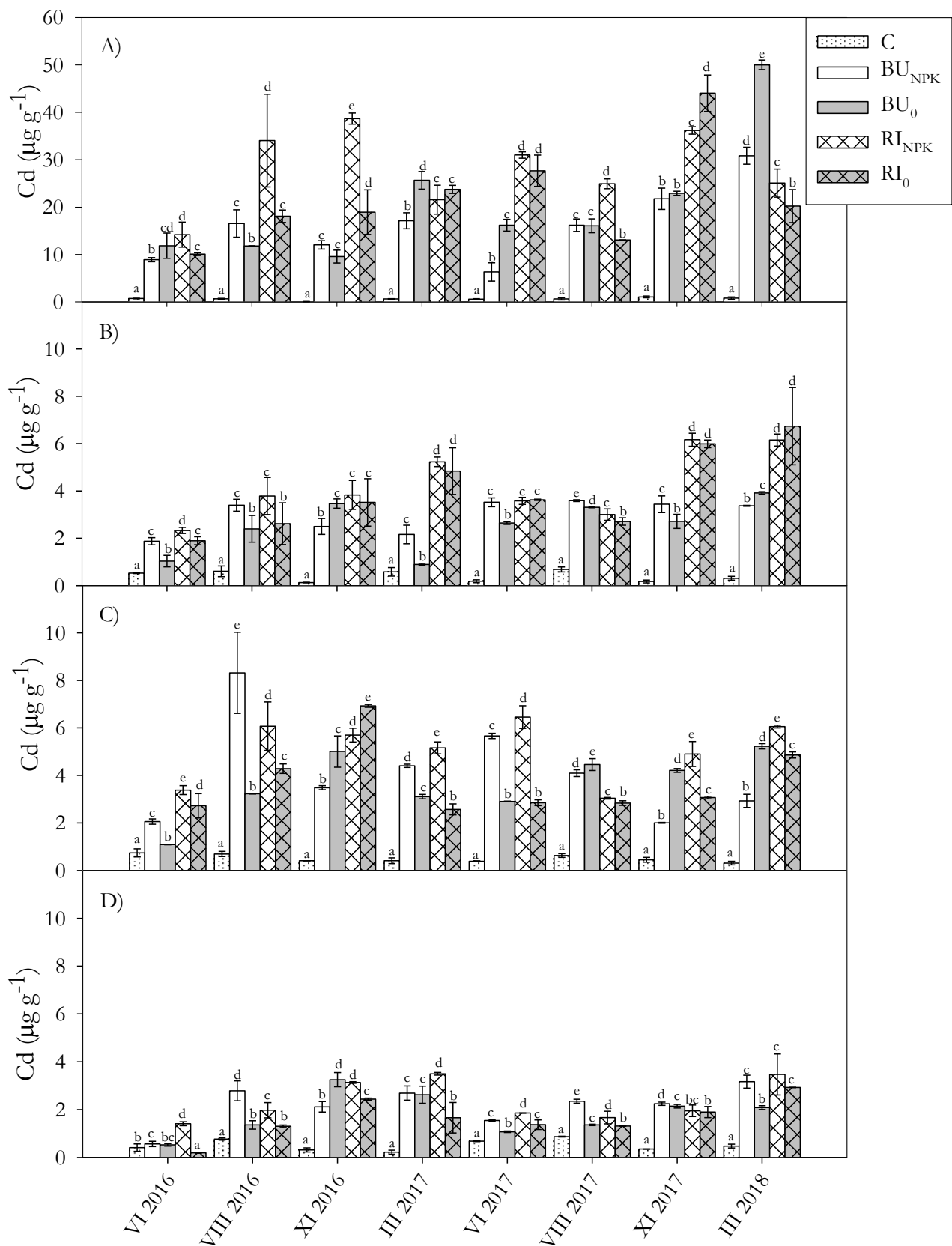
Kod BU biljaka se uočava postepeno uvećanje koncentracije Cd u korenu tokom obe sezone, pa su biljke najviše koncentracije Cd dostigle na kraju obe sezone, odnosno u martu 2017. i 2018. godine (Grafikon 10A). U korenovima RI biljaka se ne uočava pravilnost u promeni sadržaja Cd, a najviše koncentracije su dostignute u novembru poslednje sezone. Poređenje srednjih vrednosti koncentracija Cd tokom dve godine ukazuje da dodavanje NPK đubriva smanjuje usvajanje Cd korenovima za 20,9% (BU), odnosno podstiče ga za 28,3% (RI).

Tokom svake od sezona se primećuje postepeno povećanje koncentracije Cd u rizomu RI biljaka koje najviše vrednosti dostižu krajem svake od sezona, dakle u martu i novembru 2017. i martu 2018. godine, nezavisno od NPK tretmana (Grafikon 10B). Ove koncentracije Cd su ujedno i statistički značajno više u odnosu na one detektovane u istom periodu kod BU.

Koncentracije Cd u listovima su se postepeno povećavale tokom svake sezone i bile značajno više u poslednjoj fazi pred žetvu (u senescentnim listovima biljaka u martu) u odnosu na koncentracije detektovane u nekoj od ranijih faza rasta biljke (Grafikon 10D). Poređenjem prosečnih vrednosti koncentracija Cd u senescentnim listovima u martu obe sezone se uočava da su listovi đubrenih biljaka akumulirali više Cd u odnosu na neđubrene, mada u pojedinim slučajevima ove razlike nisu statistički značajne.



Grafikon 9. Koncentracija Ni u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 10. Koncentracija Cd u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.2.11. Sadržaj Co u biljnom materijalu

Biljke gajene na odlagalištu flotacione jalovine su akumulirale Co u značajno višim koncentracijama u korenu, rizomu i stablu u odnosu na kontrolne biljke (Grafikon 11). Najviše koncentracije su detektovane u korenovima u svim tretmanima, a najniže u listovima, izuzev RI_{NPK} biljaka kod kojih je najniža koncentracija zabeležena u stablu.

Značajno više koncentracije Co u korenovima RI u odnosu na BU biljke su detektovane u fazama intenzivnog rasta (jun i avgust obe sezone). Od početka svake sezone se uočava postepeno povećanje koncentracije Co u korenu BU biljaka, zbog čega na kraju svake sezone dostižu vrednosti slične onima kod RI biljaka (Grafikon 11A).

Poređenjem srednjih vrednosti koncentracije Co u rizomima uočavaju se značajne razlike između prve i druge godine rasta. Naime, od juna do novembra prve godine rasta, rizomi BU i RI biljaka sadrže više koncentracije Co u odnosu na drugu godinu (Grafikon 11B). Koncentracije Co u stablu i listovima variraju između uzorkovanja, ali bez uočljive pravilnosti (Grafikon 11C, D).

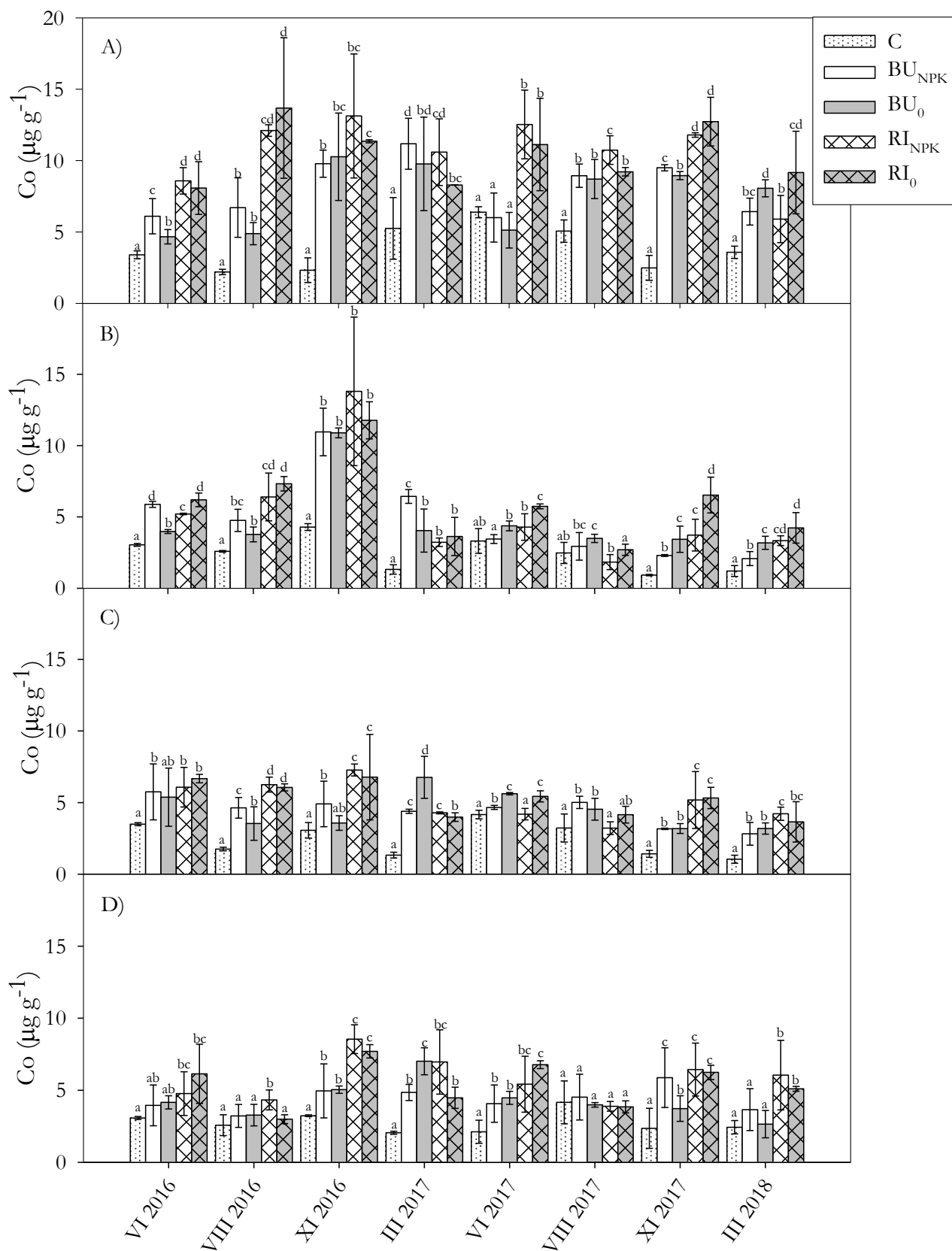
Koncentracije Co u biljnim organima nisu bile statistički značajno drugačije između različitih faza razvoja biljke, kao ni između đubrenih i neđubrenih tretmana.

4.2.12. Sadržaj Cr u biljnom materijalu

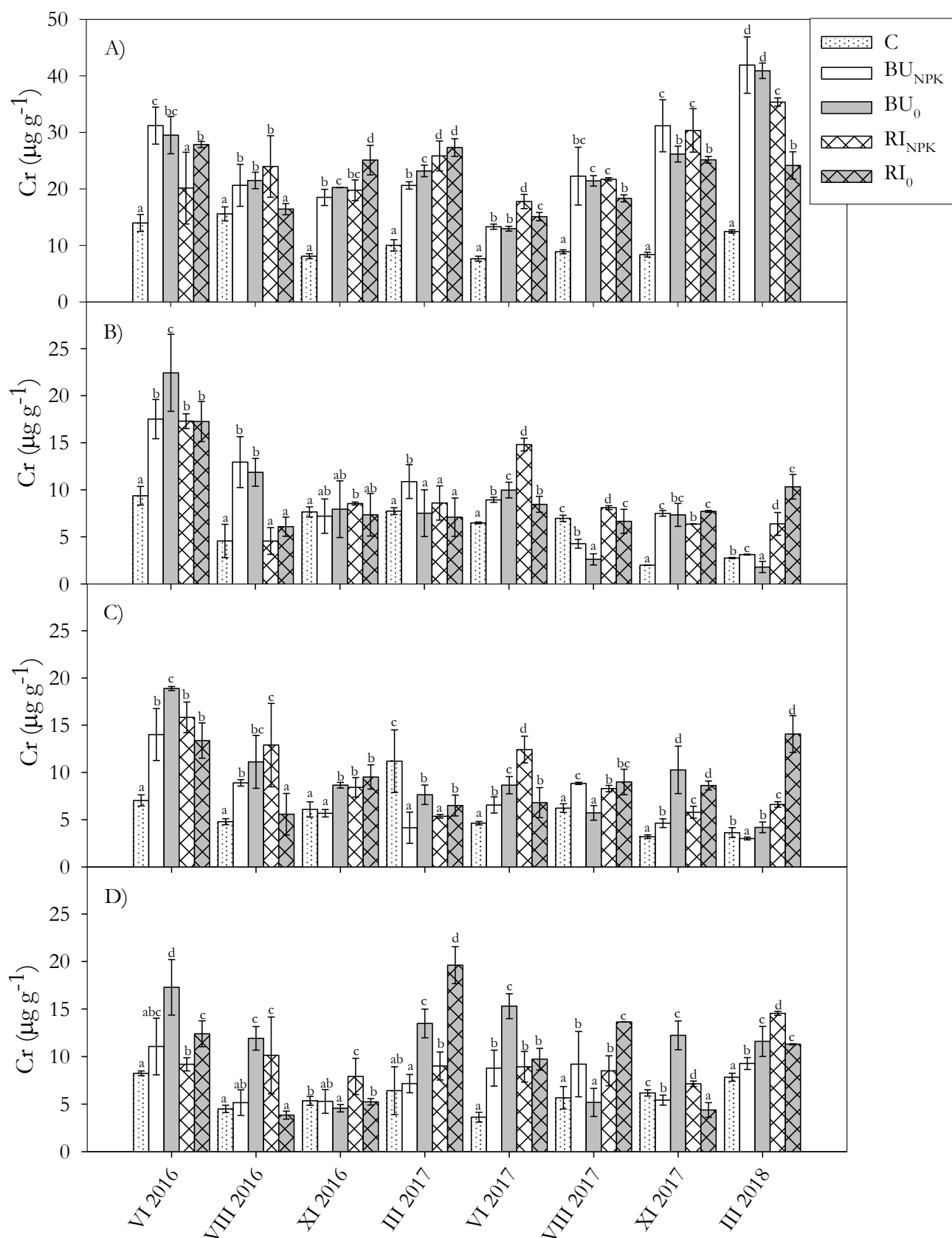
Na Grafikonu 12 su uporedno predstavljene koncentracije Cr u organima biljaka gajenih na nezagađenom kontrolnom zemljištu i deponiji flotacione jalovine. Najviše koncentracije su detektovane u korenovima svih biljaka.

U zavisnosti od uzorka, prosečne koncentracije Cr biljaka sa flotacione jalovine su bile slične kao u kontroli ili do 3,4 puta više u odnosu na koren kontrolnih biljaka (BU_{NPK}, mart 2018.) i do 3,8 puta više u odnosu na rizom kontrolnih biljaka (RI₀, mart 2018.). Takođe, bile su 3,9 puta više u odnosu na stablo (RI₀, mart 2018.) i do 3,1 puta više u odnosu na list kontrolnih biljaka (RI₀, mart 2017.).

Tokom vremena nema uočljivog trenda promena sadržaja Cr u biljnim organima, izuzev kod korena u drugoj godini gajenja kada se primećuje porast koncentracije (Grafikon 12A), kao i kod stabla gde se uočava pad koncentracije u prvog godini (Grafikon 12C). Biljke BU tretirane NPK đubrivom se u proseku odlikuju 33% nižim sadržajem Cr u listovima u odnosu na netretirane biljke (Grafikon 12D).



Grafikon 11. Koncentracija Co u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 12. Koncentracija Cr u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. × giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u poređenju sa kontrolnim biljkama. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog organa za svaki period uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.3. Fitoremedijacioni potencijal *M. × giganteus*

Biokoncentracijski faktor (BCF) koji predstavlja odnos koncentracije ispitivanog metala u korenu miskantusa i koncentracije pristupačnog metala u podlozi je predstavljen u Tabela 8 do 16. BCF >1 je detektovan za sve elemente tokom obe godine u svim tretmanima, osim za Pb.

Pri poređenju srednjih vrednosti BCF tokom dve uzastopne godine se uočava da je veći BCF prisutan kod BU_{NPK} biljaka u drugoj godini za Fe, Mn i Ni tokom cele godine, kao i za Pb, Zn, Cu i Cr od avgusta pa do kraja druge sezone. Takođe, kod BU₀ biljaka više vrednosti BCF se uočavaju za Pb, Zn, Cu, Fe, Ni i Cd tokom cele druge godine. Nasuprot tome, kod RI biljaka se ne uočava razlika akumulacije metala u korenu između dve godine gajenja.

Poređenjem srednjih vrednosti BCF između netretiranih i biljaka tretiranih NPK đubrivom gajenih na odlagalištu flotacione jalovine se uočava da BU_{NPK} biljke imaju veći BCF za Mn i Cr tokom obe godine, kao i za Ni samo tokom druge godine gajenja. Nasuprot tome, kod BU₀ biljaka je veći BCF detektovan za Pb tokom prve, za Zn i Cd tokom druge, kao i za Cu i Co tokom obe godine gajenja. Kod RI biljaka koje su tretirane NPK đubrivom se uočava veći BCF za Pb, Zn, Cu, Mn, Ni i Cr tokom obe godine, a za Fe od avgusta do kraja sezone obe godine trajanja eksperimenta.

Poredeći BCF vrednosti između BU_{NPK} i RI_{NPK} biljaka, uočava se da RI_{NPK} biljke imaju veći BCF za Ni u prvoj i Cu i Fe u obe godine, a niži za Co i Cr tokom obe godine.

Upoređivanjem BCF vrednosti između BU₀ i RI₀ biljaka je ustanovljeno da rizomski propagirane biljke imaju manji BCF za Pb, Zn, Cu i Co tokom obe godine, kao i za Cr od avgusta druge godine. Nasuprot tome, RI₀ biljke imaju veći BCF za Mn i Ni tokom prve, a za Fe tokom obe godine gajenja u odnosu na BU₀.

Tabela 8. Biokoncentracijski faktor za Pb (SV ± SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,07	0,42 ± 0,06	0,52 ± 0,05
	II godina	0,42 ± 0,09	0,67 ± 0,16	0,60 ± 0,27	0,33 ± 0,11
BU _{NPK}	I godina	0,40 ± 0,05	0,42 ± 0,10	0,48 ± 0,01	0,61 ± 0,04
	II godina	0,23 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,92 ± 0,08	1,55 ± 0,01
BU ₀	I godina	0,72 ± 0,26	0,60 ± 0,06	0,57 ± 0,04	0,72 ± 0,06
	II godina	0,75 ± 0,04	0,82 ± 0,20	0,67 ± 0,07	0,79 ± 0,02
RI _{NPK}	I godina	0,51 ± 0,10	0,72 ± 0,11	0,62 ± 0,02	0,51 ± 0,08
	II godina	0,49 ± 0,04	0,72 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,77 ± 0,11
RI ₀	I godina	0,42 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,30 ± 0,10	0,44 ± 0,01
	II godina	0,53 ± 0,06	0,33 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,48 ± 0,06

Tabela 9. Biokoncentracijski faktor za Zn (SV ± SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	9,21 ± 1,29	10,8 ± 0,1	7,91 ± 0,98	6,97 ± 0,82
	II godina	8,65 ± 1,01	9,70 ± 0,45	8,20 ± 1,46	9,83 ± 0,83
BU _{NPK}	I godina	1,04 ± 0,13	2,04 ± 0,33	1,43 ± 0,05	2,44 ± 0,13
	II godina	0,92 ± 0,20	2,65 ± 0,17	2,07 ± 0,10	3,30 ± 0,09
BU ₀	I godina	1,41 ± 0,18	1,61 ± 0,09	1,22 ± 0,05	3,04 ± 0,19
	II godina	2,90 ± 0,18	3,79 ± 0,45	2,80 ± 0,18	5,49 ± 0,62
RI _{NPK}	I godina	0,88 ± 0,13	3,87 ± 0,83	2,83 ± 0,04	2,09 ± 0,25
	II godina	2,67 ± 0,04	2,26 ± 0,20	3,38 ± 0,07	2,17 ± 0,24
RI ₀	I godina	0,94 ± 0,02	1,13 ± 0,11	1,18 ± 0,19	1,55 ± 0,06
	II godina	1,85 ± 0,12	1,42 ± 0,03	1,81 ± 0,20	1,42 ± 0,25

Tabela 10. Biokoncentracioni faktor za Cu (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Av gust	Novembar	Mart
C	I godina	1,19 \pm 0,04	1,31 \pm 0,06	1,22 \pm 0,13	1,87 \pm 0,10
	II godina	1,72 \pm 0,12	1,94 \pm 0,41	2,11 \pm 0,16	3,41 \pm 0,53
BU _{NPK}	I godina	0,74 \pm 0,12	1,11 \pm 0,04	1,16 \pm 0,01	2,84 \pm 0,06
	II godina	0,64 \pm 0,17	2,78 \pm 0,40	3,23 \pm 0,16	4,45 \pm 0,07
BU ₀	I godina	2,01 \pm 0,50	2,48 \pm 0,48	1,99 \pm 0,28	8,07 \pm 1,36
	II godina	5,88 \pm 0,73	5,29 \pm 1,03	4,93 \pm 0,07	11,8 \pm 0,0
RI _{NPK}	I godina	2,34 \pm 0,54	8,48 \pm 2,79	6,41 \pm 0,41	4,49 \pm 0,48
	II godina	3,37 \pm 0,28	7,76 \pm 0,33	6,22 \pm 0,05	4,33 \pm 0,32
RI ₀	I godina	1,48 \pm 0,14	1,80 \pm 0,09	1,61 \pm 0,60	2,58 \pm 0,06
	II godina	2,61 \pm 0,12	1,50 \pm 0,18	2,36 \pm 0,25	2,33 \pm 0,09

Tabela 11. Biokoncentracioni faktor za Fe (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Av gust	Novembar	Mart
C	I godina	32,6 \pm 3,0	31,2 \pm 2,7	17,4 \pm 3,3	23,5 \pm 2,5
	II godina	29,0 \pm 3,4	34,3 \pm 2,0	60,0 \pm 3,0	60,4 \pm 1,7
BU _{NPK}	I godina	51,9 \pm 10,5	57,6 \pm 8,4	58,1 \pm 1,7	60,0 \pm 11,7
	II godina	112 \pm 20	116 \pm 16	192 \pm 14	285 \pm 13
BU ₀	I godina	58,5 \pm 5,7	117 \pm 13	51,7 \pm 2,4	64,7 \pm 3,6
	II godina	178 \pm 18	121 \pm 40	134 \pm 5	224 \pm 21
RI _{NPK}	I godina	229 \pm 35	295 \pm 75	240 \pm 33	213 \pm 25
	II godina	191 \pm 14	239 \pm 5	392 \pm 8	282 \pm 19
RI ₀	I godina	234 \pm 5	209 \pm 11	203 \pm 70	189 \pm 10
	II godina	265 \pm 11	171 \pm 16	170 \pm 31	186 \pm 19

Tabela 12. Biokoncentracioni faktor za Mn (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Av gust	Novembar	Mart
C	I godina	0,67 \pm 0,02	0,65 \pm 0,06	0,28 \pm 0,05	0,34 \pm 0,04
	II godina	0,50 \pm 0,08	0,39 \pm 0,01	0,61 \pm 0,04	0,72 \pm 0,06
BU _{NPK}	I godina	0,86 \pm 0,20	1,91 \pm 0,37	2,25 \pm 0,24	2,61 \pm 0,14
	II godina	1,07 \pm 0,16	1,94 \pm 0,26	2,64 \pm 0,15	3,93 \pm 0,08
BU ₀	I godina	0,84 \pm 0,22	1,32 \pm 0,30	1,25 \pm 0,01	1,37 \pm 0,09
	II godina	1,99 \pm 0,26	1,23 \pm 0,23	1,07 \pm 0,01	2,52 \pm 0,06
RI _{NPK}	I godina	2,13 \pm 0,56	3,76 \pm 0,46	2,15 \pm 0,20	2,02 \pm 0,24
	II godina	2,37 \pm 0,27	1,41 \pm 0,02	3,84 \pm 0,29	2,34 \pm 0,20
RI ₀	I godina	1,66 \pm 0,05	2,39 \pm 0,08	1,33 \pm 0,41	1,22 \pm 0,06
	II godina	1,95 \pm 0,32	1,24 \pm 0,19	2,09 \pm 0,16	1,87 \pm 0,62

Tabela 13. Biokoncentracioni faktor za Ni (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Av gust	Novembar	Mart
C	I godina	2,22 \pm 0,24	3,41 \pm 0,41	2,43 \pm 0,19	3,03 \pm 0,28
	II godina	1,71 \pm 0,40	2,24 \pm 0,15	2,58 \pm 0,04	2,18 \pm 0,40
BU _{NPK}	I godina	2,62 \pm 0,68	5,47 \pm 1,30	4,97 \pm 0,47	11,2 \pm 1,3
	II godina	4,34 \pm 0,65	11,6 \pm 1,7	9,38 \pm 0,70	15,8 \pm 1,3
BU ₀	I godina	4,17 \pm 0,72	6,41 \pm 0,72	5,34 \pm 0,16	5,61 \pm 0,52
	II godina	9,91 \pm 0,63	10,1 \pm 0,9	8,33 \pm 0,12	11,6 \pm 0,4
RI _{NPK}	I godina	7,32 \pm 1,41	12,8 \pm 3,5	12,9 \pm 0,04	11,6 \pm 1,8
	II godina	12,7 \pm 1,2	9,86 \pm 0,79	13,3 \pm 0,0	10,3 \pm 0,7
RI ₀	I godina	4,46 \pm 0,24	8,07 \pm 0,71	5,45 \pm 1,61	8,47 \pm 0,79
	II godina	9,98 \pm 1,56	6,81 \pm 0,49	9,78 \pm 1,31	7,50 \pm 1,40

Tabela 14. Biokoncentracioni faktor za Cd (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	6,34 \pm 0,92	5,59 \pm 0,52	0,61 \pm 0,27	5,51 \pm 0,73
	II godina	5,04 \pm 0,61	5,44 \pm 1,63	9,16 \pm 1,10	6,86 \pm 1,78
BU _{NPK}	I godina	2,42 \pm 0,03	4,47 \pm 0,51	3,28 \pm 0,44	4,68 \pm 0,75
	II godina	1,74 \pm 0,63	4,41 \pm 0,63	5,90 \pm 0,24	8,36 \pm 0,03
BU ₀	I godina	4,04 \pm 0,70	4,05 \pm 0,24	3,30 \pm 0,64	8,78 \pm 0,17
	II godina	5,54 \pm 0,15	5,49 \pm 0,21	7,86 \pm 0,28	17,2 \pm 1,27
RI _{NPK}	I godina	2,45 \pm 0,40	5,93 \pm 1,85	6,70 \pm 0,05	3,75 \pm 0,63
	II godina	5,37 \pm 0,04	4,32 \pm 0,29	6,27 \pm 0,04	4,34 \pm 0,40
RI ₀	I godina	1,99 \pm 0,06	3,58 \pm 0,27	3,75 \pm 0,94	4,70 \pm 0,18
	II godina	5,48 \pm 0,66	2,59 \pm 0,01	8,71 \pm 0,76	4,00 \pm 0,68

Tabela 15. Biokoncentracioni faktor za Co(SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	5,51 \pm 0,49	3,57 \pm 0,46	3,75 \pm 1,33	8,46 \pm 3,22
	II godina	10,3 \pm 0,7	8,27 \pm 1,89	4,06 \pm 1,53	5,77 \pm 0,33
BU _{NPK}	I godina	6,20 \pm 1,17	6,85 \pm 2,22	9,97 \pm 1,11	11,4 \pm 1,7
	II godina	6,13 \pm 1,84	9,10 \pm 0,79	9,67 \pm 0,36	6,54 \pm 0,86
BU ₀	I godina	7,03 \pm 1,12	7,43 \pm 1,83	15,8 \pm 6,7	14,6 \pm 4,4
	II godina	7,70 \pm 1,89	13,1 \pm 2,4	13,6 \pm 2,6	12,1 \pm 1,4
RI _{NPK}	I godina	3,65 \pm 0,56	5,14 \pm 0,34	5,51 \pm 1,59	4,47 \pm 0,78
	II godina	5,29 \pm 0,78	4,55 \pm 0,26	5,00 \pm 0,16	2,53 \pm 0,81
RI ₀	I godina	3,79 \pm 0,13	6,94 \pm 3,82	5,49 \pm 1,06	4,01 \pm 0,81
	II godina	5,59 \pm 2,71	4,48 \pm 1,05	6,27 \pm 2,09	4,24 \pm 0,55

Tabela 16. Biokoncentracioni faktor za Cr (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	15,6 \pm 0,3	17,4 \pm 0,3	9,08 \pm 1,28	11,3 \pm 2,0
	II godina	8,53 \pm 0,30	9,91 \pm 0,52	9,37 \pm 0,70	13,9 \pm 1,3
BU _{NPK}	I godina	257 \pm 36	174 \pm 52	152 \pm 16	172 \pm 34
	II godina	111 \pm 20	182 \pm 31	262 \pm 71	353 \pm 97
BU ₀	I godina	94,1 \pm 17,7	68,1 \pm 6,5	64,2 \pm 4,8	73,3 \pm 3,7
	II godina	41,2 \pm 4,5	68,0 \pm 8,1	83,1 \pm 10,5	129 \pm 7
RI _{NPK}	I godina	82,1 \pm 15,3	98,5 \pm 9,5	82,2 \pm 3,6	108 \pm 13
	II godina	74,8 \pm 14,0	91,0 \pm 11,3	128 \pm 29	149 \pm 23
RI ₀	I godina	87,0 \pm 11,2	51,2 \pm 5,9	78,6 \pm 15,1	86,0 \pm 17,7
	II godina	47,5 \pm 9,4	57,2 \pm 6,6	78,8 \pm 12,4	75,9 \pm 16,1

Vrednosti dobijene za **translokacioni faktor (TF)**, koji predstavlja odnos koncentracija ispitivanog elementa u listu i korenu, su prikazane u Tabelama 17 do 25. TF<1 je utvrđen za većinu elemenata tokom obe godine gajenja u svim tretmanima, osim u slučaju nekoliko izuzetaka.

Poređenjem TF u dve uzastopne godine je ustanovljeno da je kod BU_{NPK} biljaka TF Fe veći, a TF Mn i TF Ni manji tokom cele druge godine gajenja. Takođe, TF za Pb, Zn, Cu i Cd je manji, ali u periodu od avgusta do marta druge godine. Kod BU₀ biljaka TF za Zn, Cu i Mn je manji tokom cele druge godine u odnosu na prvu, dok je TF za Cd manji od avgusta. Takođe, TF za Zn je za sve RI biljke manji u drugoj godini, kao i u RI_{NPK} za Pb i Cu. Kod RI₀ biljaka TF-Fe je veći u drugoj godini.

Upoređivanjem TF između BU_{NPK} i BU₀ biljaka je ustanovljeno da BU₀ imaju veći TF za Pb, Zn i Cu tokom cele, kao i za Mn i Co od avgusta do kraja prve godine gajenja. Nasuprot tome, BU_{NPK} imaju veći TF za Cd. Kod RI_{NPK} biljaka je TF za Co značajno viši samo na kraju druge sezone gajenja.

Tokom druge godine, TF kod RI₀ je veći tokom cele godine za Zn, Cu, Fe i Mn, a za Ni tokom najvećeg dela godine.

Poredeći TF vrednosti između BU_{NPK} i RI_{NPK} biljaka, utvrđeno je da je ovaj faktor veći za BU_{NPK} tokom prve godine za Zn i Fe, kao i za Cu, Mn, Ni i Cd u najvećem broju uzorkovanja. Nasuprot tome, TF-Cr je veći u RI_{NPK} tokom prve godine gajenja.

Pri poređenju TF između BU₀ i RI₀ je ustanovljeno da je TF veći za BU₀ za Pb tokom celog eksperimentalnog perioda, za Zn, Fe i Cd tokom cele prve, a za Cu, Mn i Cr do kraja prve sezone. Takođe, TF je za BU₀ biljke veći za Zn i Cu do marta, a za Ni je manji od avgusta druge godine.

Tabela 17. Translokacioni faktor za Pb (SV ± SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	1,43 ± 0,25	1,34 ± 0,30	1,33 ± 0,25	1,24 ± 0,18
	II godina	0,73 ± 0,12	0,43 ± 0,20	0,93 ± 0,33	0,00 ± 0,00
BU _{NPK}	I godina	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,17 ± 0,00
	II godina	0,32 ± 0,11	0,08 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01
BU ₀	I godina	0,24 ± 0,07	0,22 ± 0,10	0,23 ± 0,00	0,16 ± 0,02
	II godina	0,15 ± 0,06	0,16 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,20 ± 0,02
RI _{NPK}	I godina	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,30 ± 0,03
	II godina	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
RI ₀	I godina	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,02	0,21 ± 0,09	0,14 ± 0,01
	II godina	0,06 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,08 ± 0,02

Tabela 18. Translokacioni faktor za Zn (SV ± SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,74 ± 0,07	0,64 ± 0,01	0,67 ± 0,01	1,01 ± 0,05
	II godina	0,93 ± 0,00	0,73 ± 0,06	0,87 ± 0,19	0,66 ± 0,03
BU _{NPK}	I godina	0,31 ± 0,04	0,43 ± 0,07	0,47 ± 0,04	0,28 ± 0,04
	II godina	0,48 ± 0,10	0,17 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,02
BU ₀	I godina	0,21 ± 0,03	0,58 ± 0,08	0,80 ± 0,02	0,34 ± 0,06
	II godina	0,21 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,11 ± 0,01
RI _{NPK}	I godina	0,23 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,25 ± 0,03
	II godina	0,09 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,18 ± 0,04
RI ₀	I godina	0,13 ± 0,00	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,27 ± 0,02
	II godina	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,21 ± 0,03

Tabela 19. Translokacioni faktor za Cu (SV ± SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,76 ± 0,11	0,46 ± 0,05	0,62 ± 0,03	0,42 ± 0,03
	II godina	0,38 ± 0,03	0,39 ± 0,09	0,52 ± 0,14	0,27 ± 0,04
BU _{NPK}	I godina	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	II godina	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
BU ₀	I godina	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,07 ± 0,02
	II godina	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,04 ± 0,00
RI _{NPK}	I godina	0,09 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,01
	II godina	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01
RI ₀	I godina	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,13 ± 0,04
	II godina	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,00

Tabela 20. Translokacioni faktor za Fe (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,05 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00
	II godina	0,07 \pm 0,02	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00
BU _{NPK}	I godina	0,15 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02	0,21 \pm 0,00	0,31 \pm 0,02
	II godina	0,06 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00
BU ₀	I godina	0,15 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03	0,34 \pm 0,10
	II godina	0,04 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
RI _{NPK}	I godina	0,04 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02
	II godina	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,12 \pm 0,01
RI ₀	I godina	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,16 \pm 0,05
	II godina	0,04 \pm 0,01	0,16 \pm 0,03	0,14 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01

Tabela 21. Translokacioni faktor za Mn (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,71 \pm 0,06	0,67 \pm 0,07	1,81 \pm 0,05	0,76 \pm 0,02
	II godina	0,56 \pm 0,15	0,60 \pm 0,04	0,54 \pm 0,05	0,35 \pm 0,06
BU _{NPK}	I godina	0,61 \pm 0,14	0,53 \pm 0,09	0,44 \pm 0,04	0,29 \pm 0,02
	II godina	0,61 \pm 0,07	0,29 \pm 0,03	0,32 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03
BU ₀	I godina	0,47 \pm 0,08	1,16 \pm 0,26	1,13 \pm 0,09	0,67 \pm 0,04
	II godina	0,31 \pm 0,05	0,94 \pm 0,14	0,95 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02
RI _{NPK}	I godina	0,28 \pm 0,07	0,14 \pm 0,02	0,43 \pm 0,02	0,44 \pm 0,07
	II godina	0,19 \pm 0,03	0,31 \pm 0,01	0,19 \pm 0,00	0,33 \pm 0,01
RI ₀	I godina	0,28 \pm 0,00	0,48 \pm 0,03	1,01 \pm 0,19	0,75 \pm 0,18
	II godina	0,32 \pm 0,06	0,54 \pm 0,08	0,43 \pm 0,03	0,55 \pm 0,20

Tabela 22. Translokacioni faktor za Ni (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,55 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01	0,67 \pm 0,03	0,65 \pm 0,02
	II godina	0,97 \pm 0,30	0,96 \pm 0,30	0,81 \pm 0,01	0,97 \pm 0,08
BU _{NPK}	I godina	0,49 \pm 0,23	0,31 \pm 0,14	0,28 \pm 0,00	0,14 \pm 0,03
	II godina	0,17 \pm 0,03	0,19 \pm 0,05	0,20 \pm 0,04	0,11 \pm 0,00
BU ₀	I godina	0,08 \pm 0,02	0,32 \pm 0,07	0,19 \pm 0,06	0,24 \pm 0,10
	II godina	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,03	0,24 \pm 0,05	0,14 \pm 0,02
RI _{NPK}	I godina	0,13 \pm 0,04	0,10 \pm 0,04	0,09 \pm 0,00	0,17 \pm 0,02
	II godina	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,23 \pm 0,06
RI ₀	I godina	0,06 \pm 0,02	0,17 \pm 0,04	0,61 \pm 0,02	0,18 \pm 0,03
	II godina	0,03 \pm 0,01	0,20 \pm 0,05	0,33 \pm 0,04	0,38 \pm 0,09

Tabela 23. Translokacioni faktor za Cd (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,57 \pm 0,17	1,23 \pm 0,12	5,06 \pm 2,08	0,35 \pm 0,11
	II godina	1,22 \pm 0,26	1,55 \pm 0,61	0,35 \pm 0,06	0,68 \pm 0,34
BU _{NPK}	I godina	0,06 \pm 0,02	0,17 \pm 0,00	0,18 \pm 0,03	0,16 \pm 0,03
	II godina	0,26 \pm 0,09	0,15 \pm 0,02	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00
BU ₀	I godina	0,05 \pm 0,01	0,12 \pm 0,01	0,35 \pm 0,08	0,10 \pm 0,02
	II godina	0,07 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00
RI _{NPK}	I godina	0,10 \pm 0,03	0,06 \pm 0,03	0,08 \pm 0,00	0,16 \pm 0,03
	II godina	0,06 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02
RI ₀	I godina	0,02 \pm 0,00	0,07 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02
	II godina	0,05 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,15 \pm 0,03

Tabela 24. Translokacioni faktor za Co (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,91 \pm 0,04	1,20 \pm 0,44	1,55 \pm 0,66	0,44 \pm 0,18
	II godina	0,34 \pm 0,13	0,82 \pm 0,26	0,99 \pm 0,18	0,70 \pm 0,20
BU _{NPK}	I godina	0,70 \pm 0,38	0,54 \pm 0,30	0,51 \pm 0,20	0,44 \pm 0,02
	II godina	0,67 \pm 0,03	0,51 \pm 0,16	0,62 \pm 0,23	0,60 \pm 0,32
BU ₀	I godina	0,89 \pm 0,08	0,69 \pm 0,26	0,52 \pm 0,15	0,80 \pm 0,39
	II godina	0,93 \pm 0,33	0,47 \pm 0,07	0,42 \pm 0,10	0,33 \pm 0,10
RI _{NPK}	I godina	0,57 \pm 0,24	0,36 \pm 0,05	0,70 \pm 0,21	0,65 \pm 0,07
	II godina	0,46 \pm 0,25	0,36 \pm 0,03	0,55 \pm 0,16	1,00 \pm 0,13
RI ₀	I godina	0,83 \pm 0,48	0,24 \pm 0,09	0,68 \pm 0,03	0,54 \pm 0,09
	II godina	0,64 \pm 0,16	0,42 \pm 0,03	0,49 \pm 0,04	0,60 \pm 0,21

Tabela 25. Translokacioni faktor za Cr (SV \pm SD).

Tretman	Period	Jun	Avgust	Novembar	Mart
C	I godina	0,59 \pm 0,05	0,29 \pm 0,05	0,66 \pm 0,02	0,66 \pm 0,29
	II godina	0,48 \pm 0,07	0,64 \pm 0,14	0,74 \pm 0,01	0,63 \pm 0,03
BU _{NPK}	I godina	0,36 \pm 0,13	0,25 \pm 0,02	0,29 \pm 0,06	0,35 \pm 0,04
	II godina	0,66 \pm 0,12	0,40 \pm 0,07	0,18 \pm 0,04	0,22 \pm 0,04
BU ₀	I godina	0,60 \pm 0,17	0,56 \pm 0,08	0,23 \pm 0,02	0,58 \pm 0,09
	II godina	1,18 \pm 0,06	0,24 \pm 0,06	0,47 \pm 0,08	0,28 \pm 0,05
RI _{NPK}	I godina	0,48 \pm 0,12	0,41 \pm 0,08	0,40 \pm 0,06	0,35 \pm 0,08
	II godina	0,50 \pm 0,08	0,39 \pm 0,08	0,24 \pm 0,02	0,41 \pm 0,00
RI ₀	I godina	0,45 \pm 0,05	0,23 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03	0,72 \pm 0,03
	II godina	0,65 \pm 0,11	0,74 \pm 0,02	0,17 \pm 0,03	0,47 \pm 0,05

Indeks tolerantnosti (Tabela 26) koji se procenjuje na osnovu postignute suve biomase je u odnosu na kontrolne biljke <1 za sve tretmane u oba termina žetve i niži je na kraju druge godine. Uočava se sledeća distribucija indeksa tolerantnosti između tretmana: BU_{NPK} > BU₀ > RI_{NPK} > RI₀, u oba posmatrana perioda.

Tabela 26. Indeks tolerantnosti miskantusa gajenog na odlagalištu flotacione jalovine u odnosu na kontrolu (SV \pm SD).

Žetveni period	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
Mart 2017	0,52	0,33	0,19	0,08
Mart 2018	0,30	0,18	0,03	0,02

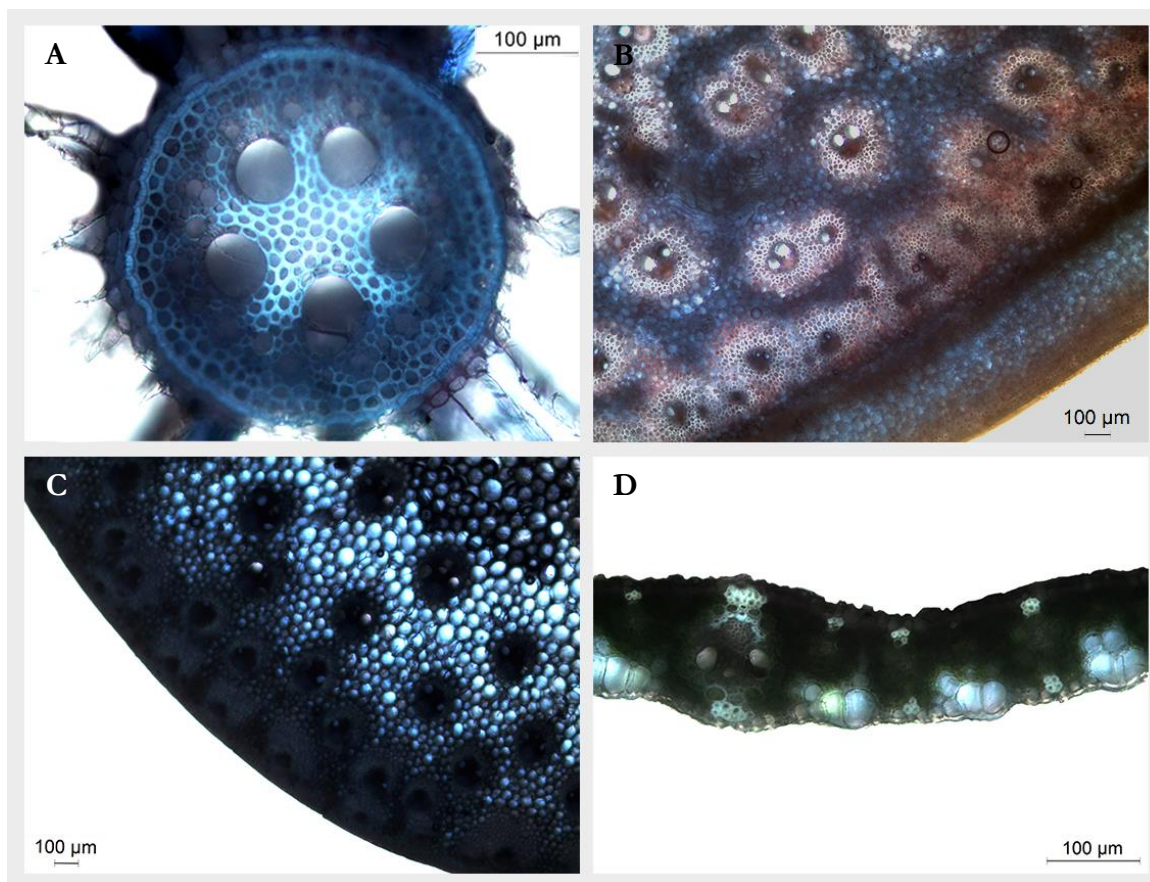
4.4. Histoheмиjska detekcija metala

Histoheмиjska lokalizacija metala koji su akumulirani u povećanim koncentracijama u biljnim organima omogućava njihovu detekciju u različitim biljnim tkivima i nije kvantitativnog tipa.

Na osnovu specifične plave boje koju daje kompleks Zn sa bojom cinkon se uočavaju mesta akumulacije Zn u tkivima biljnih organa biljaka *M. \times giganteus* gajenih na odlagalištu flotacione jalovine. U korenu, Zn je lokalizovan u ćelijskim zidovima endoderma, kao i u ćelijskim zidovima ćelija centralnog cilindra (Slika 5A). Pored toga, Zn se akumulirao i unutar ćelija primarne kore i parehnama rizoma (Slika 5B), kao i u parehnijskim ćelijama stabla, što ukazuje na njegovu akumulaciju u ćelijskoj vakuoli (Slike 5C). U listu, Zn je lokalizovan unutar ćelija epidermisa lica i naličja, kao i unutar krupnih buliformnih ćelija (Slika 5D), dok se u ćelijama parenhimske sare i sklerenhima uočava u ćelijskom zidu.

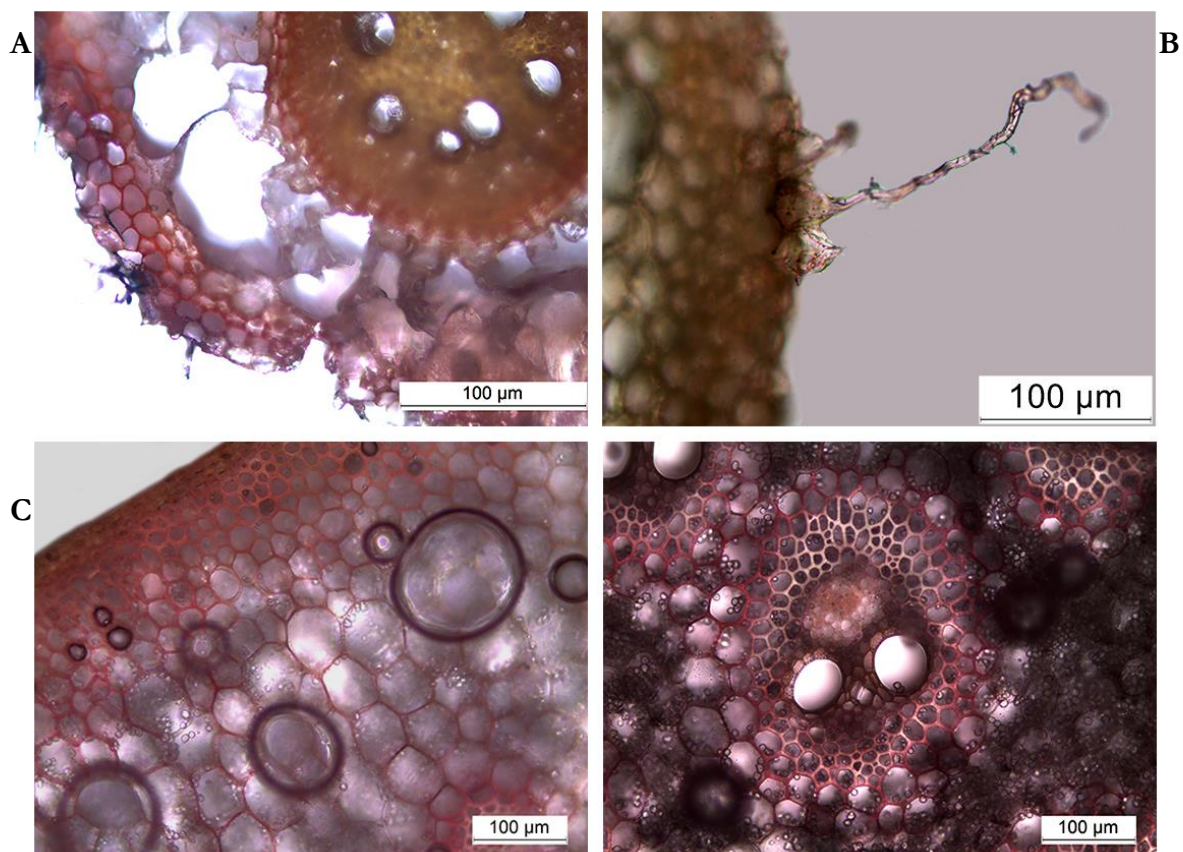
Boja kojom se boji Pb je manje specifična u odnosu na boju kojom se boji Zn jer pored olova reaguje i sa bakrom. Na osnovu obojenosti tkiva i uočava se da se Pb i Cu nakupljaju u ćelijskim zidovima ćelija egzodermisa, ćelija endoderma i pericikla korena (Slika 6A), kao i korenskim dlakama

(Slika 6B). U rizomu, povećana akumulacija Pb i Cu je detektovana u ćelijskim zidovima primarne kore (Slika 6C) i ćelija parenhima (Slika 6D), dok je u stablu detektovana unutar ćelija parenhima stabla (Slika 7A, B). U listu, ova dva elementa su akumulirana unutar ćelija parenhimske sare i buliformnim ćelijama (Slika 7C, D).

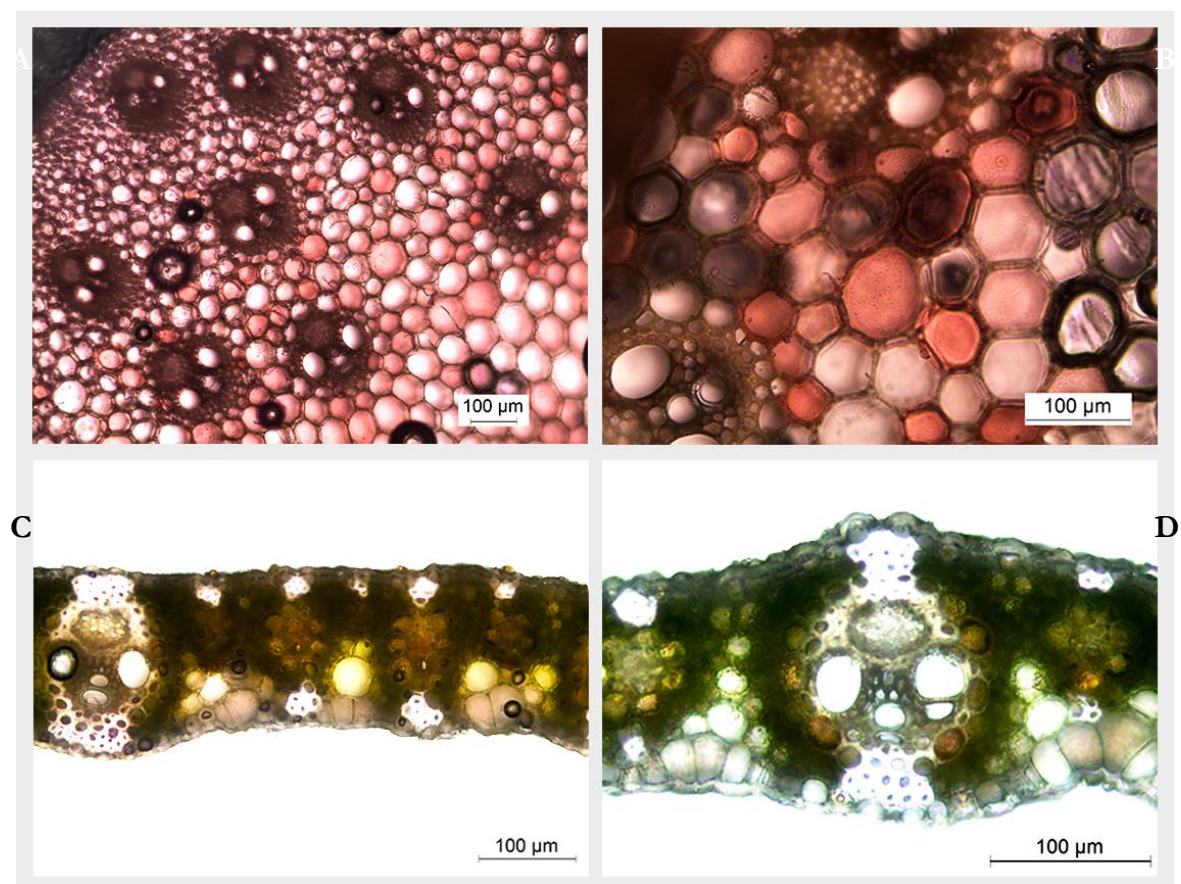


Slika 5. Histohemijska detekcija Zn u korenu (A), rizomu (B), stablu (C) i listu (D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine.

Bojenje dimetilglioksimom koji se koristi za histohemijsku detekciju Ni nije dalo vidljive rezultate. Međutim, treba imati u vidu da je izostanak uočljive obojenosti rezultat niže koncentracije metala, koja se nalazi ispod nivoa osetljivosti metode za histohemijsku detekciju.



Slika 6. Histohemijska detekcija Pb i Cu u korenu (A), korenskoj dlaci (B) i rizomu(C, D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine.

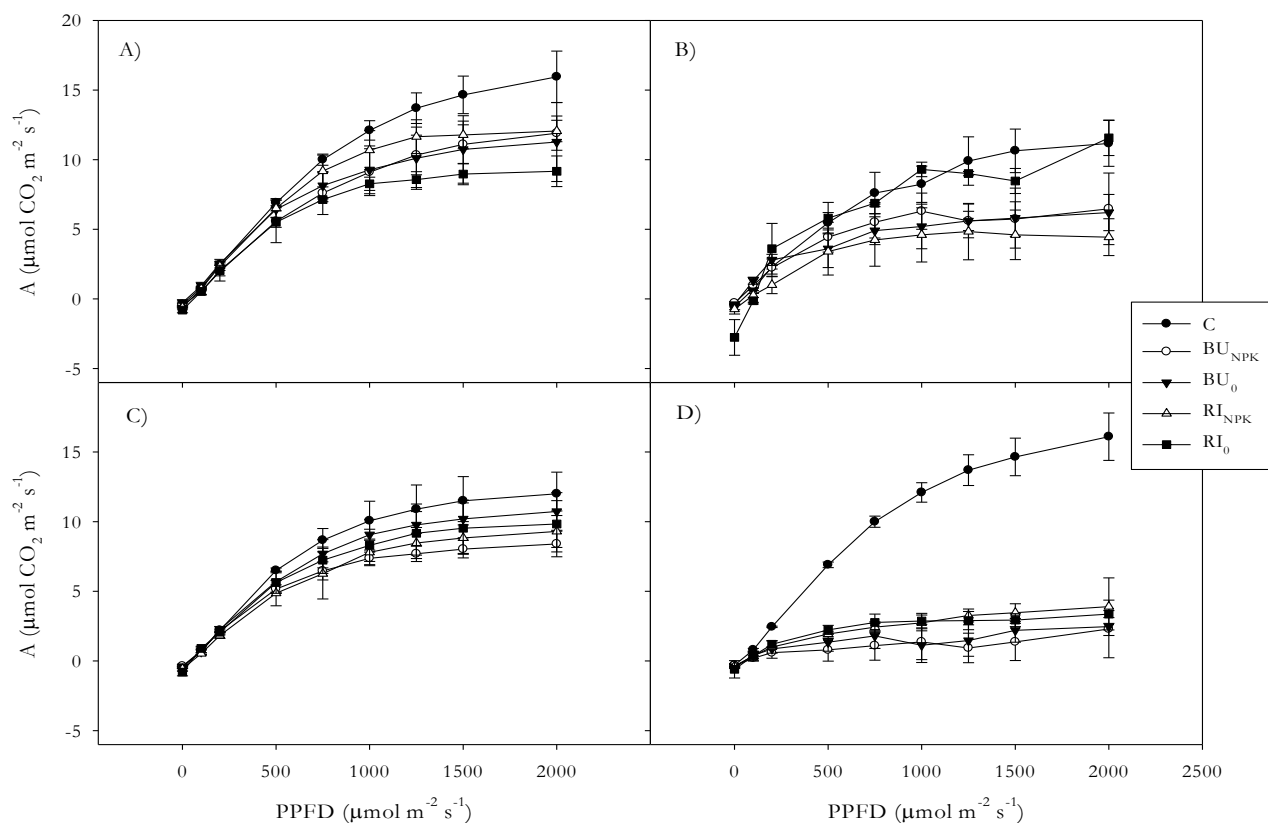


Slika 7. Histohemijska detekcija Pb i Cu u stablu (A, B) i listu (C, D) *M. x giganteus* gajenog na odlagalištu flotacione jalovine.

4.5. Fotosintetska aktivnost i razmena gasova

Biljke gajene na odlagalištu flotacione jalovine pokazuju niži intenzitet fotosinteze u poređenju sa biljkama gajenim na kontrolnom zemljištu u svim terminima merenja, a ove razlike su najizraženije pri višim intenzitetima osvetljenosti (Grafikon 13A-D). Na osnovu dobijenih svetlosnih kriva se uočava da sve biljke postepeno povećavaju intenzitet fotosinteze sa povećanjem intenziteta osvetljenosti. Dok kontrolne biljke maksimum fotosintetske aktivnosti dostižu pri najvišim intenzitetima svetlosti (2000 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$), biljke sa flotacione jalovine maksimalni intenzitet fotosinteze dostižu pri nešto nižim PPFD (1000 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u junu obe godine, i pri značajno nižim PPFD (300-500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$) u avgustu obe godine. Najizraženije smanjenje fotosintetske aktivnosti je izmereno u avgustu druge godine kada su biljke sa flotacione jalovine postigle najniže i ujedno slične vrednosti tokom eksperimentalnog perioda (Grafikon 13D). Tokom prve godine, intenzitet fotosinteze je značajno negativno korelisan sa koncentracijom Zn, Cd ($p < 0,001$) i Fe u listu ($p < 0,01$) (Prilog 3), a tokom druge godine sa koncentracijama Pb, Zn, Fe, Mn i Cd ($p < 0,001$), kao i koncentracijom Cu ($p < 0,01$) (Prilog 4).

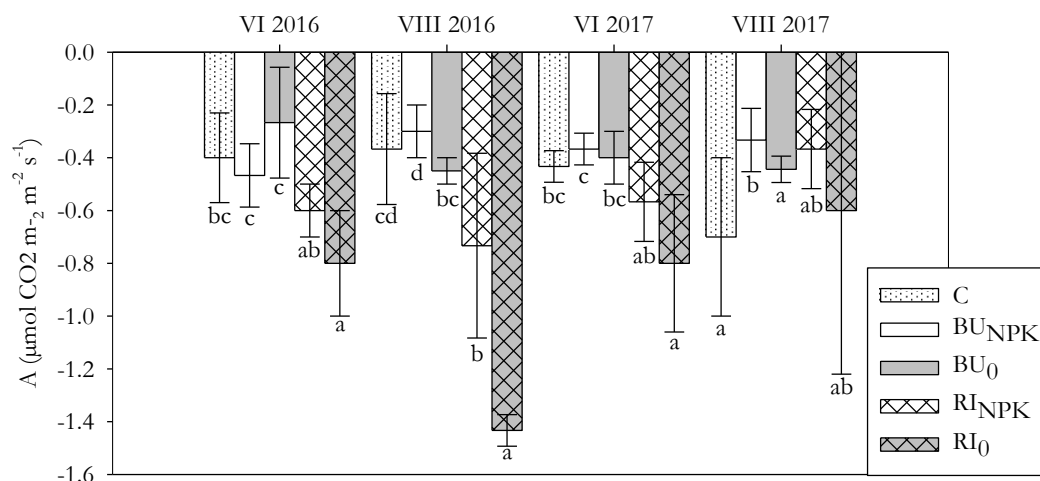
Za razliku od prve godine gajenja tokom koje nije bilo značajnih razlika u intenzitetu fotosinteze između BU_{NPK} i BU_0 , u junu druge godine se uočavaju više vrednosti A kod BU_0 biljaka u odnosu na BU_{NPK} na svetlosnim intenzitetima preko 500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ova razlika je bila najizraženija na najvišem intenzitetu osvetljenosti (Grafikon 13C). Sa druge strane, poređenjem RI_{NPK} i RI_0 se uočava da je tokom juna prve godine intenzitet fotosinteze statistički značajno veći kod RI_{NPK} na intenzitetima svetlosti većim od 500 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$, da bi tokom avgusta iste godine kod RI_{NPK} intenzitet fotosinteze bio značajno niži pri svim PPFD preko 200 $\mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Grafikon 13B). Tokom obe godine A je bio značajno pozitivno korelisan sa sadržajem N u listu ($p < 0,001$). U prvoj godini A je bio pozitivno korelisan ($p < 0,001$), a u drugoj godini negativno korelisan sa sadržajem fosfora u listu ($p < 0,05$) (Prilog 3 i 4).



Grafikon 13. Svetlosne krive biljaka iz juna (A) i avgusta (B) prve i juna (C) i avgusta (D) druge godine gajenja.

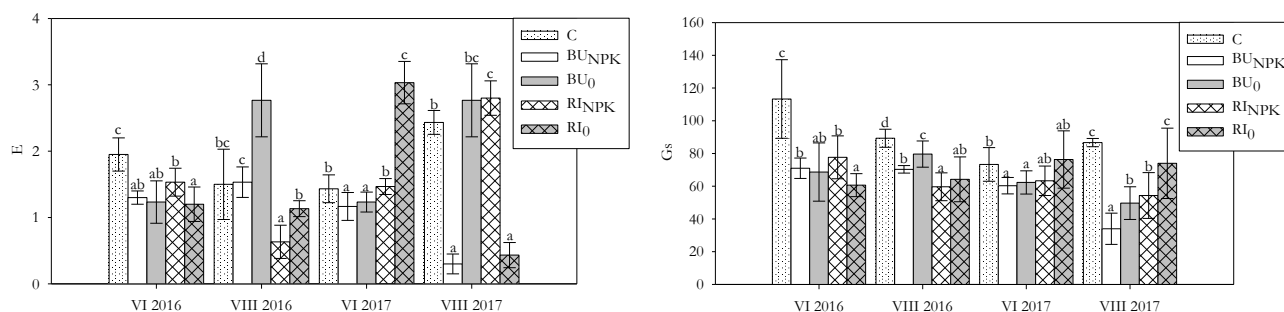
Intenzitet disanja kontrolnih i BU biljaka u mraku je bio vrlo sličan, dok je kod RI biljaka bio viši u svim terminima merenja, iako uglavnom bez statistički značajnih razlika zbog velike varijabilnosti

između uzoraka (Grafikon 14). Pored toga, RI₀ biljke pokazuju intenzivnije disanje u odnosu na RI_{NPK}. Takve razlike se ne uočavaju između BU_{NPK} i BU₀.



Grafikon 14. Uporedne vrednosti intenziteta disanja kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

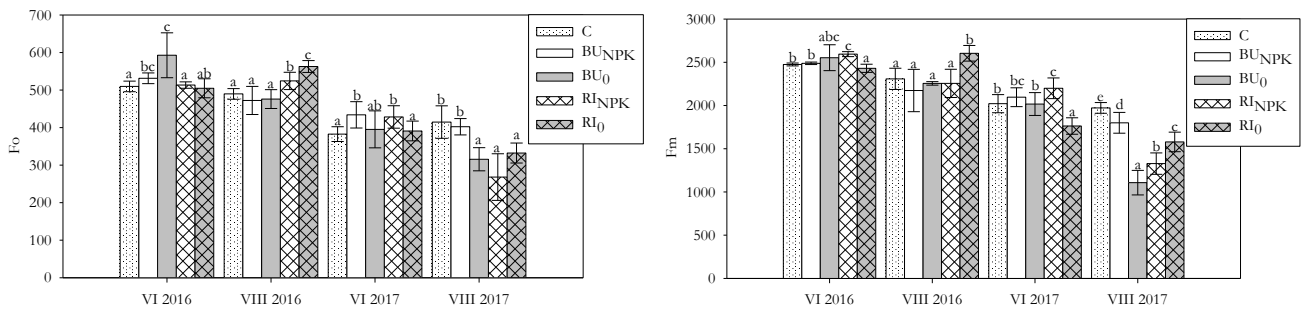
Intenzitet transpiracije je samo u junu prve godine bio značajno veći u kontroli u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 15A). Provodljivost stoma je tokom prve godine značajno veća u kontrolnim biljkama u odnosu na ostale tretmane (Grafikon 15B), i visoko negativno korelisan sa koncentracijama Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Co, ($p < 0,001$), a pozitivno sa koncentracijom Ni i fosfora u listovima ($p < 0,001$) (Prilog 3). Tokom druge godine provodljivost stoma je bila značajno negativno korelisan sa koncentracijama Pb, Fe ($p < 0,05$), Zn i Cd ($p < 0,001$), a pozitivno sa sadržajem azota ($p < 0,05$) (Prilog 4).



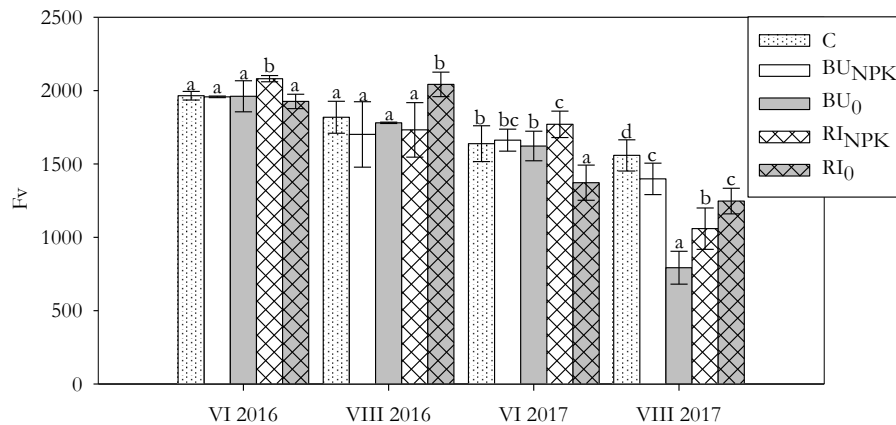
Grafikon 15. Uporedne vrednosti intenzitet transpiracije (E) (levo); provodljivost stoma (Gs) (desno) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.6. Promene u parametrima fluorescencije hlorofila a

Značajno smanjenje varijabilne fluorescencije (Fv) je zabeleženo kod biljaka izloženih stresu metalima (BU₀, RI₀, RI_{NPK}) samo u avgustu druge godine eksperimenta. Pri tome je detektovan istovremeni pad Fo i Fm vrednosti, nešto izraženiji kod Fm što je rezultovalo padom Fv (Grafikoni 16-18). Sva tri parametra (Fo, Fm i Fv) su visoko negativno korelisan ($p < 0,001$) sa koncentracijom Pb i Fe u listu, a pozitivno visoko korelisan sa sadržajem N i K (Prilog 3 i 4).

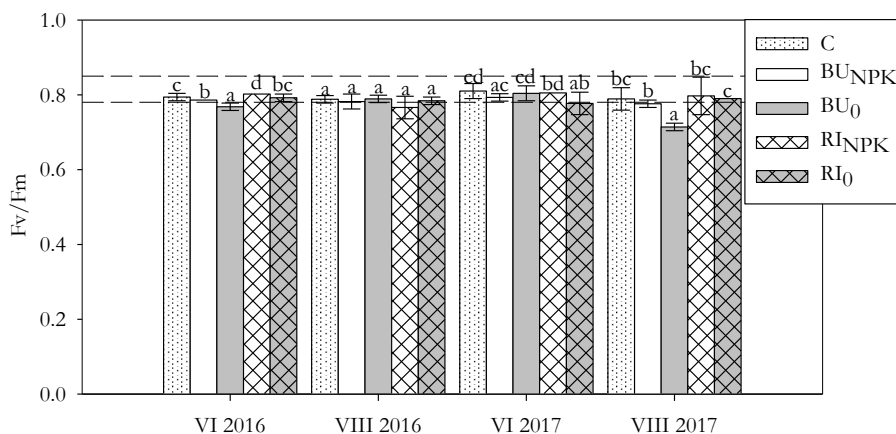


Grafikon 16. Uporedne vrednosti minimalne fluorescencije lista adaptiranog na mrak (F_o) (levo) i maksimalne fluorescencije lista adaptiranog na mrak (F_m) (desno) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Grafikon 17. Uporedne vrednosti varijabilne fluorescencije (F_v) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

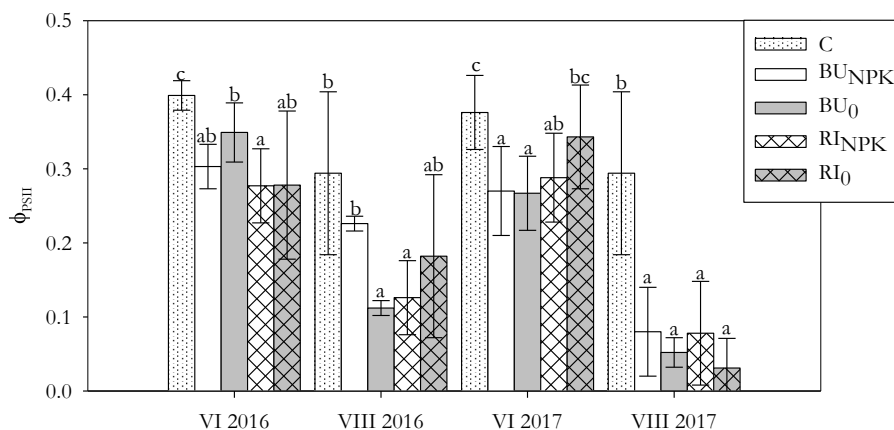
Vrednost F_v/F_m je kod kontrolnih biljaka, kao i kod RI i BU_{NPK}, ostala manje-više ujednačena i relativno visoka u svim terminima merenja (Grafikon 18). Značajniji pad ove vrednosti je izmeren samo kod BU₀ biljaka u avgustu druge godine. Ovaj parametar je visoko negativno korelisan sa sadržajem Mn u listu (Prilog 4).



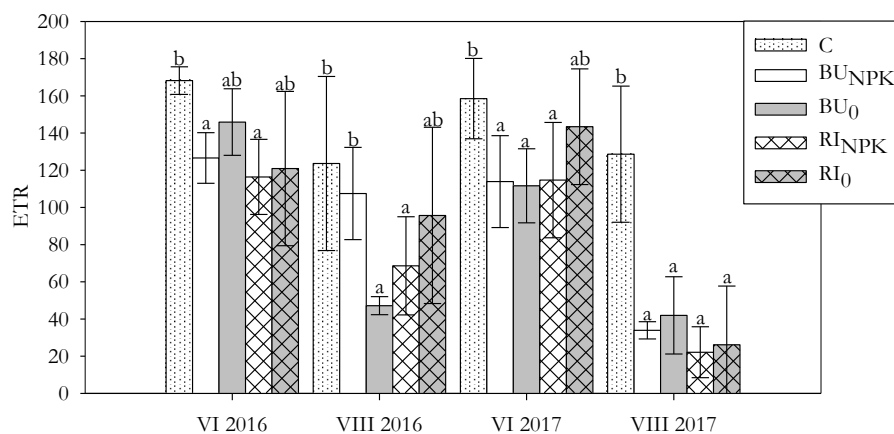
Grafikon 18. Uporedne vrednosti fotosintetičke efikasnosti fotohemije PSII (F_v/F_m) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Horizontalne isprekidane linije predstavljaju prosečne vrednosti F_v/F_m kod nestresiranih biljaka prema Björkman & Demmig (1987). Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Snižene vrednosti fotohemijske efikasnosti (Φ_{PSII}) i nivoa transporta elektrona (ETR) su zabeležene kod svih biljaka sa flotacionog jalovišta u avgustu obe godine u odnosu na jun, pri čemu je

izraziti pad vrednosti oba parametra detektovan u drugoj godini ispitivanja (Grafikon 19 i 20). Smanjenje vrednosti Φ_{PSII} je u obe godine visoko pozitivno korelisano sa ETR ($\rho=0,93$ i $\rho=0,95$), sa intenzitetom fotosinteze na maksimalnom intenzitetu svetlosti (A2000) ($\rho=0,542$ i $\rho=0,756$) i sadržajem N u listu ($\rho=0,57$ i $\rho=0,73$) (Prilozi 3 i 4). Takođe, smanjenje vrednosti ETR je tokom obe godine visoko pozitivno korelisano sa A2000 ($\rho=0,521$ i $\rho=0,709$) i sadržajem N u listu ($\rho=0,611$ i $\rho=0,743$), a visoko negativno korelisano sa sadržajem Cd u listu ($\rho=0,-0,506$ i $\rho=-0,428$) i NPQ ($\rho=-0,777$ i $\rho=-0,622$) ($p<0,001$) (Prilozi 3 i 4).



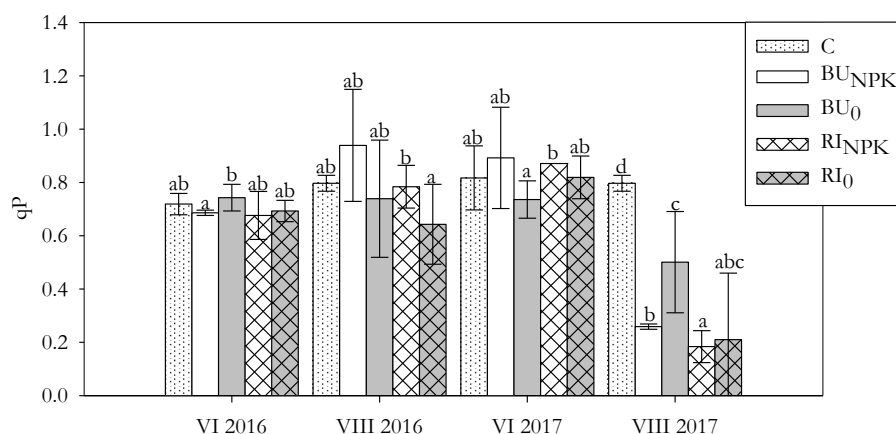
Grafikon 19. Uporedne vrednosti fotohemijske efikasnosti (Φ_{PSII}) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p\leq 0,05$).



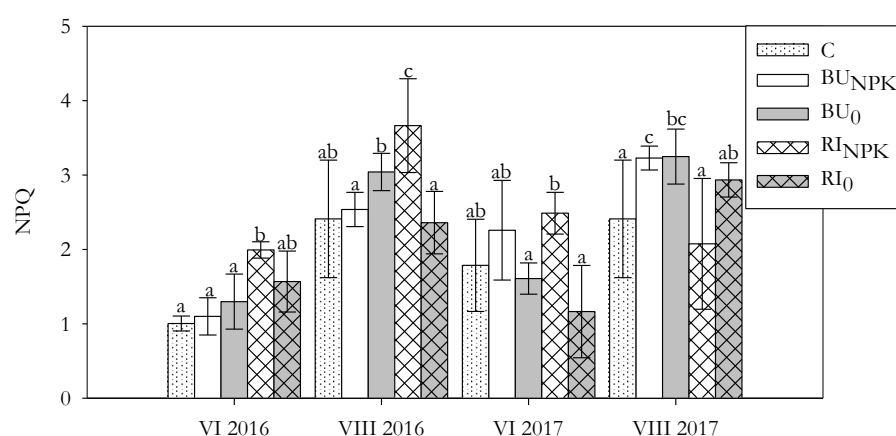
Grafikon 20. Uporedne vrednosti nivoa transporta elektrona (ETR) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p\leq 0,05$).

Drastičniji pad fotohemijskog gašenja fluorescencije (qP) se uočava samo u avgustu druge godine kod biljaka sa flotacione jalovine (Grafikon 21), i samo je u toj fazi značajno pozitivno korelisano sa većinom merenih parametara fluorescencije, osim sa Fv/Fm i NPQ, dok je visoko negativno korelisano sa koncentracijom Pb i Fe u listu (Prilog 4).

Prosečne vrednosti odavanja energije u vidu toplote NPQ kod svih tretmana su bile više u avgustu u odnosu na juni u svakoj od godina ispitivanja (Grafikon 22). Vrednost NPQ je negativno korelisana sa qP u drugoj godini ($\rho=-0,323$), a visoko negativno korelisana sa Φ_{PSII} ($\rho=-0,799$ u prvoj i $\rho=-0,727$ u drugoj godini), ETR ($\rho=-0,745$ u prvoj i $\rho=-0,622$ u drugoj godini), kao i sa A2000 ($\rho=-0,505$ u prvoj i $\rho=-0,6147$ u drugoj godini) (Prilog 3 i 4).



Grafikon 21. Uporedne vrednosti fotohemijskog gašenja fluorescencije (qP) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

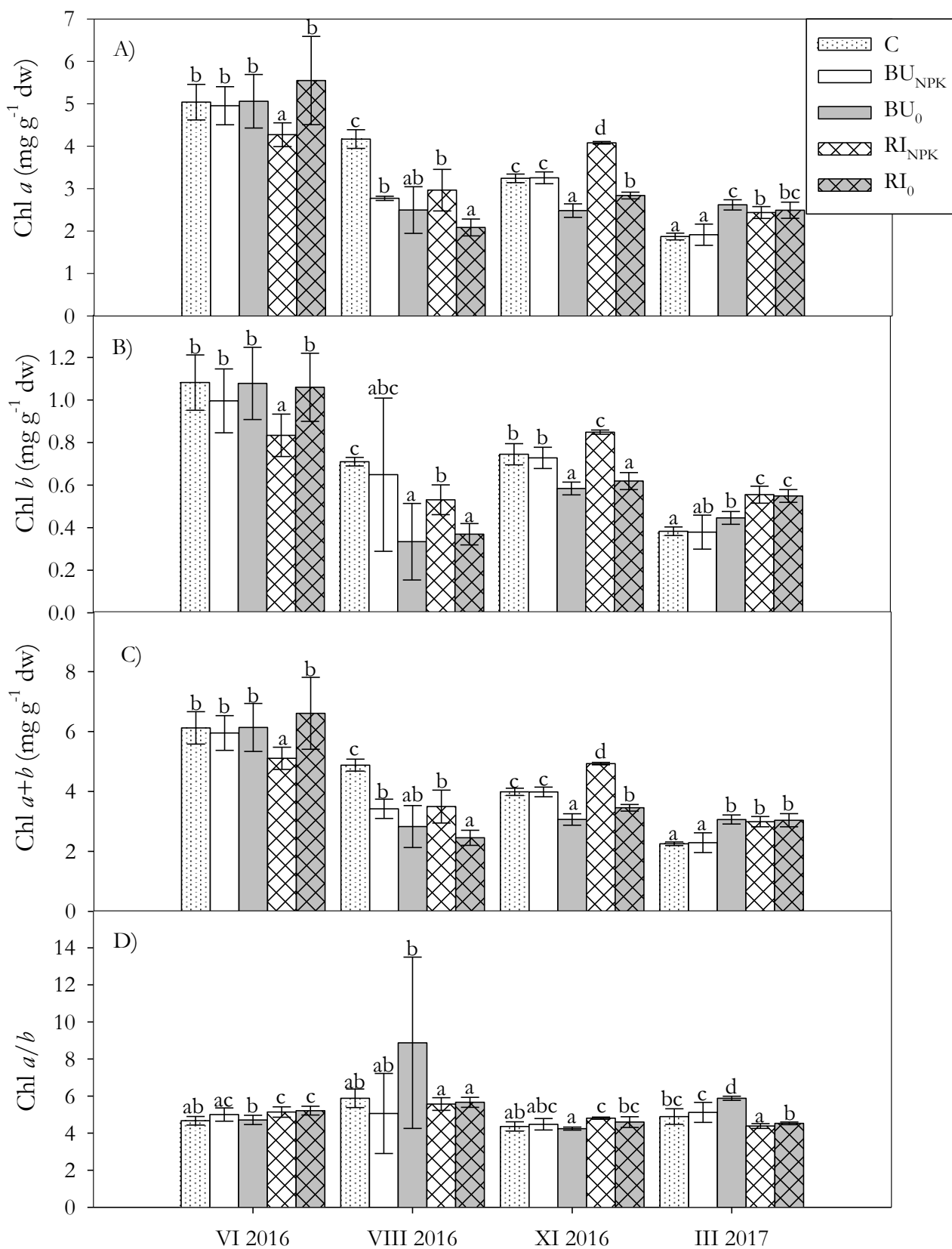


Grafikon 22. Uporedne vrednosti odavanja energije u vidu toplote (NPQ) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

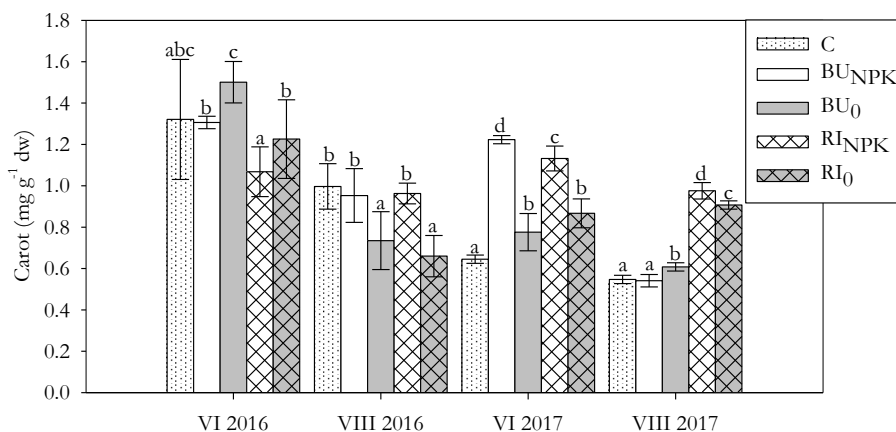
4.7. Biohemijski parametri *M. × giganteus*

Koncentracije Chl *a* i Chl *b* (Grafikon 23), a samim tim i ukupan sadržaj hlorofila u listu, pokazuju sličan trend promena tokom dve uzastopne vegetacione sezone. Njihov sadržaj je u avgustu bio nešto niži u odnosu na jun iste godine. Pored toga, kod svih biljaka sa flotacione jalovine je samo u avgustu prve godine istraživanja koncentracija oba pigmenta bila značajno niža u odnosu na kontrolu. Njihove koncentracije u listovima BU i RI biljaka tretiranih NPK đubrivom je bio nešto viši u avgustu prve i junu druge godine. U drugoj godini, biljke sa flotacione jalovine pokazuju trend rasta koncentracije hlorofila, pa su Chl *a* i Chl *b* u junu viši kod RI_{NPK} u odnosu na ostale tretmane, da bi u avgustu iste godine bili viši kod BU₀, RI_{NPK} i RI₀ u odnosu na kontrolu. Sličan trend promena obe vrste hlorofila je rezultovao manje-više ujednačenim odnosom sadržaja ova dva pigmenta tokom eksperimentalnog perioda. Samo RI biljke pokazuju njihov manji odnos u avgustu druge godine kao rezultat izrazitijeg povećanja Chl *b* u odnosu na Chl *a*.

Koncentracija ukupnih karotenoida (Carot) je generalno viša u junu u odnosu na avgust u svakoj godini, kao i kod većine biljaka sa flotacione jalovine u odnosu na kontrolu tokom druge godine eksperimenta (Grafikon 24). Takođe, ustanovljena je i značajno viša koncentracija ukupnih karotenoida u listovima biljaka tretiranih NPK đubrivom u odnosu na netretirane u avgustu prve godine, junu druge godine gajenja, kao i kod RI biljaka u avgustu druge godine gajenja.

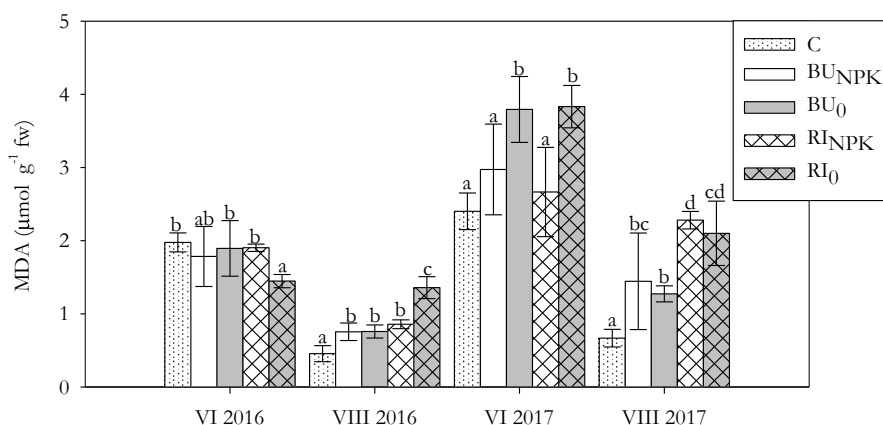


Grafikon 23. Uporedne vrednosti Chl *a* (A), Chl *b* (B), Chl *a+b* (C) odnosa *a/b* (D) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



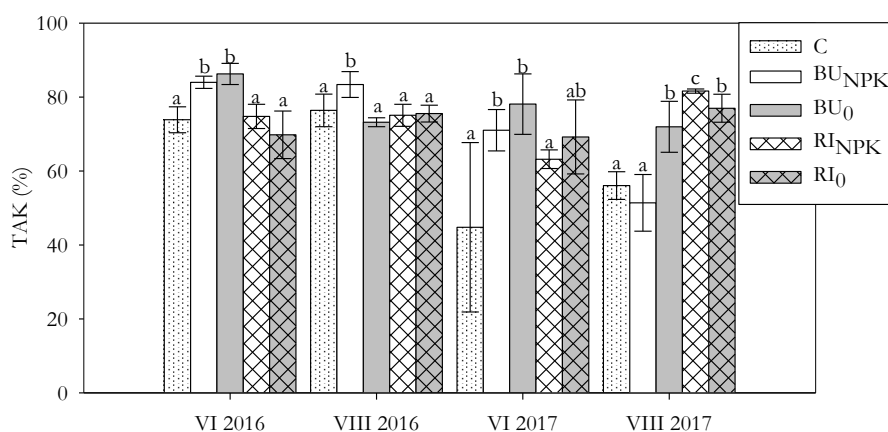
Grafikon 24. Uporedne vrednosti sadržaja ukupnih karotenoida (Carot) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Stepen lipidne peroksidacije, koji ukazuje na oksidativna oštećenja ćelijskih membrana, je viši u junu u odnosu na avgust svake od godina ispitivanja (Grafikon 25). Takođe, kod biljaka sa flotacione jalovine koncentracija MDA je veća u drugoj u odnosu na prvu godinu gajenja, kao i u odnosu na kontrolne biljke tokom avgusta obe sezone. Pored toga, značajno veće koncentracije MDA su detektovane kod nekih netretiranih u odnosu na biljke tretirane NPK đubrivom, i to kod RI₀ biljaka u avgustu prve sezone, kao i kod BU₀ i RI₀ biljaka u junu naredne sezone.



Grafikon 25. Uporedne vrednosti malondialdehida (MDA) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Za razliku od prve godine tokom koje većih promena u ukupnom antioksidativnom kapacitetu listova (TAK) nije bilo u odnosu na kontrolne biljke, veće promene se uočavaju tokom druge godine kada biljke iz većine tretmana sa flotacione jalovine pokazuje uvećanje TAK u odnosu na kontrolu (Grafikon 26).



Grafikon 26. Usporedne vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta listova (TAK) kod kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na odlagalištu flotacione jalovine tokom dve uzastopne sezone. Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

4.8. Biometrijske odlike ispitivanih biljaka

Morfometrijski i meristički karakteri koji opisuju rast biljaka gajenih na kontrolnom zemljištu i odlagalištu flotacione jalovine su predstavljeni u Tabeli 27. Statistički značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka gajenih na flotacionoj jalovini se ispoljavaju u odnosu na sve ispitivane parametre već u prvoj godini, a posebno su izražene u drugoj godini rasta. Pored toga, posebno se ističu manje dimenzije praćenih morfoloških parametara kod biljaka dobijenih iz rizoma (RI) i to u drugoj godini rasta. Kod kontrolnih biljaka visina i debljina stabla, dužina i širina podvršnog lista, kao i broj izdanaka se povećavaju vremenom zbog čega su u drugoj godini rasta značajno veći. Međutim, ova pravilnost se ne uočava i kod biljaka sa odlagališta flotacione jalovine. Dimenzije podvršnih listova, dužina i širina, se značajno razlikuju od dimenzija RI tokom obe sezone rasta, kao i od dimenzija BU ali tek u drugoj godini rasta biljaka.

Ukupan broj listova se tokom prve vegetacione sezone povećao u svim tretmanima izuzev kontrolne grupe, dok je povećanje ukupnog broja listova u drugoj godini uočeno samo kod kontrolnih biljaka; u RI_{NPK} ostaje isti, dok se u ostalim tretmanima smanjuje. Ozelenjenost je u svakom od merenja bila značajno niža kod biljaka gajenih na flotacionoj jalovini u odnosu na kontrolu. Pri tome se uočava značajno veći broj suvih listova u avgustu u odnosu na juni, posebno kod BU i RI. Dok se u avgustu 2016. i 2017. godine udeo suvih listova kod kontrolnih biljaka u proseku povećao za 11 i 15% u odnosu na juni iste godine, taj porast je kod BU_{NPK} iznosio 15 i 28%, kod BU₀ 21 i 39%, kod RI_{NPK} 33 i 60% i kod RI₀ 28 i 29% (Tabela 27).

Kontrolne biljke su se odlikovale značajno većom visinom stabla u odnosu na biljke BU i RI, u svim fazama uzorkovanja. Smanjen rast stabla biljaka sa jalovišta se uočava već u prvoj godini, a izraženiji je u drugoj godini gajenja. Posebno je izražen kod RI biljaka (Slike 8-12). Kada je reč o debljini stabla, statistički značajne razlike se uočavaju između C i BU₀ i RI, ali tek u drugoj godini rasta. Sve biljke, bez obzira na tretman, su dostigle značajno veću visinu i debljinu stabla u drugoj u odnosu na prvu godinu gajenja, u oba perioda merenja.

Broj izdanaka C i BU biljaka se značajno uvećao u drugoj u odnosu na prvu sezonu rasta, dok kod RI biljaka nije bilo prisutno značajnije uvećanje broja. Izrazito veći broj izdanaka je kontinuirano beležen kod tretmana BU_{NPK} u odnosu na C i sve ostale tretmane tokom celog perioda istraživanja (Tabela 27).

Nadzemna biomasa biljaka koje su rasle na flotacionoj jalovini je na kraju obe vegetacione sezone bila značajno niža kod biljaka sa flotacione jalovine u odnosu na kontrolu. Njihova ukupna biomasa u martu 2017. godine je bila niža 1,9 (BU_{NPK}), 3,0 (BU₀), 5,4 (RI_{NPK}) i 11,9 puta (RI₀) u odnosu

na biomasu kontrolnih biljaka, a u martu 2018. je bila u proseku niža 3,5 (BU_{NPK}), 5,5 (BU_0), 28,8 (RI_{NPK}) i 44,4 puta (RI_0). Iz podataka se vidi da su u drugoj godini prinos suve biomase po jedinici površine povećale kontrolne biljke (4,4 puta), a nešto manje biljke BU_{NPK} (2,6) i BU_0 (2,4). Isti prinos biomase u obe godine je zabeležen kod RI.

Uticaj đubrenja se ogleda u statistički značajno većoj dužini i širini podvršnog lista RI_{NPK} u odnosu na RI_0 , ali i manjoj ozelenjenosti. Pozitivan uticaj đubrenja je detektovan kod biljaka BU_{NPK} koje su obe godine imale značajno veću produkciju biomase u odnosu na BU_0 , kao i značajno veći broj izdanaka u odnosu na neđubrene BU_0 biljke u avgustu druge sezone rasta (Slike 13-16).



Slika 8. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik (levo) i na kontrolnoj parceli u INEPu u Beogradu (desno) tokom juna 2016.



Slika 9. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik tokom avgusta 2016 godine propagiran iz busena (levo) i rizoma (desno) uz dodatak NPK đubriva.

Tabela 27. Parametri rasta biljaka gajenih na kontrolnom zemljištu i odlagalištu flotacione jalovine (SV \pm SD)

Parametar	Period merenja	C	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
Dužina podvršnog lista (cm)	VI 2016	53,76 \pm 6,27 ^c	44,78 \pm 5,24 ^b	46,25 \pm 9,66 ^c	38,67 \pm 9,17 ^b	29,58 \pm 6,97 ^a
	VIII 2016	59,42 \pm 10,60 ^{ab}	62,80 \pm 9,65 ^b	58,38 \pm 7,12 ^b	61,44 \pm 8,85 ^b	48,62 \pm 9,31 ^a
	VI 2017	77,08 \pm 8,91 ^c	51,42 \pm 10,02 ^b	58,00 \pm 11,53 ^b	42,17 \pm 10,09 ^{ab}	42,69 \pm 6,65 ^a
	VIII 2017	79,92 \pm 8,53 ^c	59,00 \pm 7,89 ^{bc}	63,06 \pm 5,87 ^c	48,83 \pm 4,75 ^{ab}	44,38 \pm 5,56 ^a
Širina podvršnog lista (mm)	VI 2016	14,28 \pm 1,50 ^{ab}	16,20 \pm 1,71 ^{bc}	18,11 \pm 1,62 ^d	15,65 \pm 1,22 ^{bc}	12,85 \pm 3,42 ^a
	VIII 2016	15,50 \pm 0,67 ^b	17,62 \pm 2,53 ^b	14,55 \pm 2,06 ^{ab}	13,74 \pm 1,74 ^a	11,82 \pm 2,61 ^a
	VI 2017	21,53 \pm 3,46 ^c	16,41 \pm 2,12 ^{ab}	16,79 \pm 1,89 ^b	15,20 \pm 3,12 ^{ab}	15,20 \pm 2,29 ^a
	VIII 2017	22,06 \pm 0,53 ^c	17,70 \pm 2,83 ^b	17,20 \pm 2,38 ^b	15,09 \pm 1,94 ^{ab}	12,97 \pm 2,16 ^a
Ukupan broj listova	VI 2016	7,706 \pm 1,160 ^b	7,333 \pm 0,871 ^b	7,167 \pm 2,252 ^b	6,333 \pm 1,411 ^{ab}	5,583 \pm 1,080 ^a
	VIII 2016	7,083 \pm 0,291 ^a	10,50 \pm 1,840 ^c	8,846 \pm 1,412 ^{bc}	8,000 \pm 0,712 ^b	9,538 \pm 0,783 ^c
	VI 2017	7,111 \pm 1,374 ^{ab}	8,750 \pm 0,871 ^{ab}	8,875 \pm 1,820 ^b	7,667 \pm 1,073 ^a	7,875 \pm 1,367 ^{ab}
	VIII 2017	10,33 \pm 0,49 ^c	8,417 \pm 1,161 ^b	8,438 \pm 1,032 ^b	7,667 \pm 0,984 ^{ab}	6,875 \pm 1,151 ^a
Broj zelenih listova	VI 2016	7,706 \pm 1,160 ^{ab}	6,889 \pm 0,601 ^b	6,583 \pm 2,021 ^b	6,222 \pm 1,481 ^{ab}	5,417 \pm 0,996 ^a
	VIII 2016	6,333 \pm 0,492 ^b	7,100 \pm 2,234 ^b	4,923 \pm 2,019 ^{ab}	3,111 \pm 1,537 ^a	6,615 \pm 0,961 ^b
	VI 2017	6,833 \pm 1,098 ^c	6,500 \pm 0,798 ^{bc}	6,438 \pm 0,814 ^{ab}	5,417 \pm 0,669 ^a	5,875 \pm 1,088 ^{ab}
	VIII 2017	8,417 \pm 0,669 ^d	5,000 \pm 1,414 ^c	4,625 \pm 1,893 ^{bc}	2,917 \pm 1,564 ^a	3,250 \pm 1,238 ^{ab}
Broj suvih listova	VI 2016	0,000 \pm 0,000 ^a	0,444 \pm 0,726 ^{ab}	0,583 \pm 0,669 ^b	0,111 \pm 0,333 ^a	0,167 \pm 0,389 ^a
	VIII 2016	0,750 \pm 0,452 ^a	3,400 \pm 0,843 ^{bc}	3,923 \pm 1,115 ^{bc}	4,889 \pm 1,269 ^c	2,923 \pm 0,94 ^b
	VI 2017	0,278 \pm 0,575 ^a	2,250 \pm 0,866 ^b	2,438 \pm 1,459 ^{ab}	2,250 \pm 0,622 ^b	2,000 \pm 0,966 ^{ab}
	VIII 2017	1,917 \pm 0,515 ^a	3,417 \pm 1,240 ^{ab}	3,813 \pm 1,223 ^{bc}	4,750 \pm 1,422 ^c	3,625 \pm 0,885 ^b
Ozelenjenost (%)	VI 2016	100,0 \pm 0,0 ^b	94,60 \pm 8,96 ^{ab}	92,94 \pm 8,22 ^a	98,15 \pm 5,56 ^{ab}	97,42 \pm 6,05 ^b
	VIII 2016	89,43 \pm 6,39 ^c	66,50 \pm 11,1 ^{ab}	54,22 \pm 16,55 ^{ab}	38,29 \pm 16,85 ^a	69,45 \pm 9,11 ^b
	VI 2017	96,84 \pm 6,49 ^c	74,60 \pm 9,01 ^{ab}	74,11 \pm 9,81 ^{ab}	70,98 \pm 5,62 ^a	75,28 \pm 11,02 ^{bc}
	VIII 2017	81,44 \pm 5,12 ^c	59,31 \pm 14,19 ^b	53,63 \pm 17,12 ^b	37,65 \pm 19,12 ^a	46,59 \pm 13,50 ^{ab}

Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).

Nastavak Tabela 27. Parametri rasta biljaka gajenih na kontrolnom zemljištu i odlagalištu flotacione jalovine (SV \pm SD)

Parametar	Period merenja	C	BU _{NPK}	BU ₀	RI _{NPK}	RI ₀
Visina stabla (cm)	VI 2016	23,94 \pm 6,08 ^b	19,44 \pm 5,68 ^{ab}	22,42 \pm 5,30 ^b	15,89 \pm 5,11 ^{ab}	11,96 \pm 5,77 ^a
	VIII 2016	50,83 \pm 6,75 ^c	42,80 \pm 11,93 ^b	40,77 \pm 7,18 ^b	29,89 \pm 5,30 ^b	26,27 \pm 7,50 ^a
	VI 2017	53,56 \pm 8,05 ^c	18,00 \pm 5,74 ^b	21,25 \pm 6,43 ^b	9,917 \pm 3,343 ^a	12,50 \pm 4,38 ^a
	VIII 2017	83,00 \pm 6,94 ^c	38,83 \pm 9,82 ^b	41,69 \pm 8,31 ^b	20,00 \pm 2,63 ^a	19,06 \pm 5,76 ^a
Debljina stabla (mm)	VI 2016	7,445 \pm 1,668 ^b	6,441 \pm 1,524 ^{ab}	7,234 \pm 2,034 ^b	6,521 \pm 2,016 ^{ab}	5,625 \pm 1,191 ^a
	VIII 2016	7,825 \pm 1,454 ^{ab}	8,495 \pm 0,982 ^b	7,920 \pm 1,177 ^{ab}	8,007 \pm 1,576 ^{ab}	6,800 \pm 0,657 ^a
	VI 2017	8,876 \pm 1,444 ^b	7,796 \pm 1,362 ^{ab}	7,838 \pm 1,484 ^a	5,931 \pm 2,015 ^a	7,299 \pm 1,806 ^a
	VIII 2017	11,07 \pm 2,03 ^c	10,14 \pm 2,01 ^{bc}	9,186 \pm 1,530 ^{ab}	8,893 \pm 1,367 ^{ab}	7,636 \pm 1,070 ^a
Broj izdanaka	VI 2016	1,634 \pm 0,767 ^a	5,138 \pm 3,729 ^{bc}	4,700 \pm 2,812 ^b	2,033 \pm 0,928 ^c	1,806 \pm 0,749 ^c
	VIII 2016	1,725 \pm 0,716 ^a	6,483 \pm 4,672 ^{ab}	5,575 \pm 3,404 ^b	3,586 \pm 1,937 ^b	2,405 \pm 1,142 ^b
	VI 2017	6,085 \pm 1,250 ^b	14,18 \pm 8,72 ^b	8,636 \pm 5,694 ^{ab}	3,783 \pm 1,678 ^a	2,806 \pm 1,305 ^a
	VIII 2017	7,797 \pm 1,156 ^b	16,28 \pm 5,34 ^d	9,135 \pm 2,451 ^c	4,148 \pm 2,381 ^{ab}	3,086 \pm 1,463 ^a
Biomasa (kg ha ⁻¹)	III 2017	1090 \pm 683 ^d	566,7 \pm 85,4 ^d	358,8 \pm 105,0 ^c	202,2 \pm 86,5 ^b	91,34 \pm 36,25 ^a
	III 2018	4777 \pm 2427 ^c	1455 \pm 46 ^d	871,1 \pm 141,6 ^c	165,6 \pm 28,0 ^b	107,5 \pm 34,9 ^a

Srednje vrednosti po tretmanu u okviru jednog perioda uzorkovanja koje ne sadrže nijedno zajedničko slovo su međusobno statistički različite prema Mann-Whitney U testu ($p \leq 0,05$).



Slika 10. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik tokom oktobra 2016. godine, propagiran iz rizoma.



Slika 11. Miskantus pod snegom na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik tokom marta 2017. godine.



Slika 12. Korenov sistem miskantusa propagiranog iz rizoma gajenog na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik (mart 2017.).



Slika 13. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik: BU_{NPK} (gore levo), BU_0 (gore desno), RI_{NPK} (dole levo) i RI_0 (dole desno) tokom juna 2017. godine.



Slika 14. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik: BU_{NPK} (gore), BU_0 (dole) tokom avgusta 2017. godine.



Slika 15. Miskantus na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik: RI_{NPK} (levo), RI₀ (desno) tokom avgusta 2017. godine.



Slika 16. Ogledne parcele na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik tokom decembra 2017. godine.

5. DISKUSIJA

5.1. Hemijske odlike podloge

Odlagališta flotacione jalovine predstavljaju specifičan supstrat antropogenog porekla, klasifikovan kao tehnosol (FAO & ITPS, 2015). To je otpadni materijal koji nastaje u procesu fizičke i hemijske obrade stene u rudarstvu (proces pripreme i koncentrisanja mineralnih sirovina). Direktna ekološka restauracija privremeno ili trajno napuštenih odlagališta flotacione jalovine bez primene bilo koje druge tehnološke metode osim fitoremedijacije predstavlja veoma izazovan i neizvestan poduhvat.

Prema sadržaju organske materije, svi uzorci flotacione jalovine i kontrolnog prema kategorizaciji Tyrin (1965) spadaju u slabo humozna zemljišta. Iako je ova količina organske mase uobičajena za kontrolno zemljište koje pripada tipu karbonatnog luvičnog černoze (IUSS Working Group WRB, 2015), relativno visok udeo organske materije (2,775-3,766%) u jalovini je neočekivan. Posebno jer se najveći deo ispitivane površine odlagališta flotacione jalovine odlikuje potpunim odsustvom vegetacijskog pokrivača, pojedinačnih vaskularnih biljaka, mahovina i lišajeva. Samo se na ivičnim delovima deponije, značajno dalje od eksperimentalnog polja, pojavljuju rastavić (*Equisetum* sp.) i trska (*Phragmites australis*). Ovako visok procenat organske materije izmerene u flotacionoj jalovini potiče od organskog aditiva ksantata koji se koristi u procesu flotiranja Pb-Zn rude, a koji sa produktima degradacije veoma dugo ostaje u sastavu flotacione jalovine (Shen et al. 2016).

Flotaciona jalovina ima neutralnu pH vrednost što je od velikog značaja za dostupnost metala iz podloge. Naime, najveći broj metala ima veću rastvorljivost i mobilnost u kiseloj u odnosu na neutralnu podlogu, a time i veću biodostupnost. U pojedinim uzorcima flotacione jalovine vrednosti aktivne i supstitucione kiselosti su veoma slične što ukazuje na sredinu koju odlikuje odsustvo komponenti koje uslovljavaju supstitucionu kiselost, a koje su svojstvene za prirodna zemljišta, poput prisustva mineralnih i organskih kiselina i hidrolitičkih soli. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je *M. × giganteus* osetljiv na pH vrednost podloge nižu od 5,8 (Wanat et al. 2013), što ukazuje na to da je pH vrednost flotacione jalovine povoljna za rast ove biljne vrste.

Odsustvo humusnih jedinjenja koja predstavljaju osnovnu komponentu organske materije u zemljištu potvrđuje i izuzetno nizak sadržaj N, P i K koji je u flotacionoj jalovini daleko ispod optimalnog nivoa neophodnog za ishranu biljaka (Marschner 1995), izuzev BU tretmana za kalijum. Jalovina, koja je poreklom od stene, po svojoj prirodi ne sadrži azot. Azot u podlogu dospeva aktivnošću specifičnih grupa zemljišnih bakterija, kao i razlaganjem izumrle organske materije (Randelović 2015). Prema obezbeđenosti ukupnog azota (Džamić i sar. 1996) ispitivana flotaciona jalovina spada u klasu sa niskim (0,002 do 0,073%), a kontrolno zemljište sa srednjim sadržajem N (0,125-0,171%). Značajno višim sadržajem N se odlikuje supstrat BU tretmana u odnosu na RI čemu doprinosi zemljište koje je dodato tokom sadnje, kao i podloge tretirane NPK đubrivom u odnosu na netretirane podloge. Radi poređenja, pored drugačijeg sastava metala, u površinskim slojevima deposola odlagališta flotacione jalovine „RTB BOR“ sadržaj ukupnog N je nešto povoljniji i kreće se u opsegu 0,010-0,075%, što podržava razvoj samonikle vegetacije na ovim površinama (Randelović 2015).

Pored izrazitog deficita azota, flotaciona jalovina se odlikuje i naglašenim nedostakom fosfora. Prema Džamić i sar. (1996) flotaciona jalovina pripada klasi podloge siromašne fosforom (0,001-4,263 mg P₂O₅/100 g zemljišta), dok je kontrolno zemljište srednje snabdeveno (12,88-13,06 mg P₂O₅/100 g zemljišta). Kao i u slučaju N, sadržaj lako pristupačnog P₂O₅ u flotacionoj jalovini uveliko zavisi od tretmana – mešanja sa zemljištem i dodavanja mineralnog đubriva. Tako mešavina zemljišta i flotacione jalovine (BU) rezultuje desetostruko višom koncentracijom lako pristupačnog P₂O₅ u odnosu na jalovinu. Pored toga, dodavanje mineralnog đubriva je i kod BU i kod RI tretmana dovelo do povećanja sadržaja lako pristupačnog P₂O₅, a razlike u njegovom sadržaju između đubrene i neđubrene podloge su daleko veće kod RI u odnosu na BU. Razlog tome je već izuzetno nizak sadržaj lako pristupačnog P₂O₅ koji se značajno menja dodavanjem NPK đubriva. Poređenja radi, sadržaj pristupačnog fosfora u

površinskim slojevima jalovine rekultivisanih delova borskog odlagališta se kreće u opsegu od 2,9 do 68,5 mg P₂O₅/100 g zemljišta (Randelović 2015). Može se smatrati da na slabiju dostupnost fosfora dodatno utiče i neutralna pH flotacione jalovine, s obzirom da rastvaranju neorganskih fosfatnih jedinjenja u podlozi i njihovom prevođenju u oblike koji su dostupni biljkama pogoduju niže pH vrednosti podloge (Marschner 1995).

Koncentracija lakopristupačnih oblika kalijuma u podlozi je značajna zbog uloge koju K ima u otpornosti biljaka na oboljenja i tolerisanje temperaturnih ekstrema, i važnosti za razvoj biljke u nepovoljnim uslovima sredine koji vladaju na odlagalištima flotacione jalovine (Randelović 2015). Po sadržaju lakopristupačnih oblika kalijuma, kontrolno zemljište spada u klasu dobro snabdevenih (23,69-27,72 mg K₂O/100 g zemljišta). Kod BU tretmana se uočava umerena snabdevenost zahvaljujući mešanju černozema i flotacione jalovine prilikom sadnje (15,77-19,77 mg K₂O/100 g zemljišta), dok su RI tretmani siromašni K (5,646-8,205 mg K₂O/100 g zemljišta). Sadržaj lakopristupačnih oblika K u površinskim slojevima deposola borskog odlagališta se nalazi u opsegu od 2,65 do 36,9 mg K₂O/100 g zemljišta, što takođe doprinosi lakšem razvoju samonikle vegetacije (Randelović 2015).

Kada je reč o metalima, gvožđe je metal koji je prisutan u najvišim koncentracijama u odnosu na sve ostale metale u zemljištu i flotacionoj jalovini. To je i očekivano imajući u vidu da je Fe jedan od glavnih konstituenata litosfere (oko 5%) i zbog ovako visokog sadržaja u zemljištima se ne smatra elementom u tragovima (Kabata-Penidas 2011). Dok je koncentracija Fe u černozemu bila oko 3%, zastupljenost Fe u flotacionoj jalovini je iznosila od 4,3-6,4% u BU tretmanu zbog mešanja flotacione jalovine i černozema prilikom sadnje, dok je u RI tretmanu flotaciona jalovina sadržala od 7,6-8,7% Fe. Izražena razlika u koncentracijama Fe između kontrolnog zemljišta, BU i RI podloge je rezultovala i povećanom akumulacijom Fe u korenu biljaka iz RI tretmana što je u početnim fazama rasta bilo posebno izraženo.

Koncentracije Pb, Cu, Cd, Co i Cr u kontrolnom zemljištu su u opsegu vrednosti za antropogeno nezagađena zemljišta i u okviru su svetskog proseka, dok su koncentracije Zn, Mn i Ni u kontrolnom zemljištu nešto iznad svetskog proseka. Nešto niže koncentracije metala, izuzev Fe i Mn, su detektovane u BU tretmanu u odnosu na RI kao rezultat unošenja nezagađenog zemljišta (černozema) prilikom sadnje rizoma. U flotacionoj jalovini su detektovane vrlo visoke koncentracije metala poreklom iz matične stene, prvenstveno Pb, Cu i Zn koji predstavljaju glavne metale koji se ekstrahuju iz rude. Ukupne koncentracije svakog od ova tri metala u jalovini su bile u opsegu karakterističnom za podloge koje su veoma kontaminirane otpadnim vodama iz topionica metala i industrijskim izvorima zagađenja, i samim tim višestruko više u odnosu na nezagađena zemljišta (Akopyan et al. 2018; Ettler 2016; Kabata-Pendias 2011; Kołodziej et al. 2016). Koncentracije ovih elemenata višestruko premašuju granične vrednosti zagađujućih, štetnih i opasnih materija u vodonosnom sloju koje mogu ukazati na hemijsko zagađenje zemljišta (remedijacione vrednosti), dok koncentracije Ni i Co premašuju granične vrednosti zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu čije prekoračenje ukazuje na nivo kontaminacije koji narušava ekološku ravnotežu i pri čijem prekoračenju dolazi do narušavanja nivoa koji je bezbedan za korišćenje (granične maksimalne vrednosti RS) propisane Uredbom o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu (Sl. glasnik RS, br. 30/2018 i 64/2019).

Koncentracija Mn u kontrolnom zemljištu je veoma slična vrednostima u nezagađenim zemljištima širom sveta u kojima varira između 411 i 550 mg/kg (Kabata-Pendias 2011). Nasuprot tome, koncentracija Mn u flotacionoj jalovini (1793-2146 mg/kg) je karakteristična za mafitske podloge u kojima se Mn nalazi u koncentracijama oko 2000 mg/kg.

Koncentracija Ni u prirodnim zemljištima se kreće u veoma širokom intervalu, a najčešće vrednosti se kreću između 13-37 mg/kg (Kabata-Pendias 2011). Kontrolno zemljište sadrži Ni u granicama koje su uobičajene za nezagađena zemljišta, dok je u flotacionoj jalovini koncentracija Ni dvostruko viša. Nikl je veoma slabo mobilan u podlozi, a njegova mobilnost jako opada sa povećanjem

pH podloge iznad 6,5 (Zhang et al. 2004), zbog čega su koncentracije pristupačne forme Ni između kontrolnog zemljišta i flotacione jalovine bile slične.

Prosečna koncentracija Cd u zemljištu je oko 0,4 mg/kg (Kabata-Pendias 2011), mada više koncentracije Cd prate stene koje su bogate Zn i Pb, kao što je slučaj sa ispitivanom flotacionom jalovinom koja je sadržala do 29 mg Cd/kg. Podloge BU koje su nastale mešanjem zemljišta tipa černozema i flotacione jalovine se, takođe, odlikuju visokom, ali nešto nižom koncentracijom Cd u odnosu na RI, dok je sadržaj Cd u kontrolnom zemljištu nešto niži od svetskog proseka.

Koncentracije ukupnog Co u kontrolnom zemljištu su u okviru prosečnih vrednosti za zemljišta (10 mg/kg), dok su one detektovane u flotacionoj jalovini (RI) karakteristične za različite rudničke jalovine (Kabata-Pendias 2011). Koncentracije Cr i u kontrolnom zemljištu i u flotacionoj jalovini su niže od prosečnih koncentracija u zemljištima u svetu koja iznosi 60 mg/kg (Kabata-Pendias 2011). Zbog toga, koncentracije hroma u ispitivanoj flotacionoj jalovini se ne smatraju potencijalno opasnim.

Poznato je da dostupnost metala može izrazito varirati u zavisnosti od pH podloge (Porter et al. 2004). Na rastvorljivost i biodostupnost svih ispitivanih metala (Mn, Cr, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb) utiče pH podloge (Bartlett & Kimble 1976; Godo & Reisenauer 1980; Kabata-Pendias 2011; McBride & Blasiak 1976), pa se očekuje da na pH flotacione jalovine sa vrednostima oko neutralne ovi elementi budu slabije biodostupni. Biljke, kao i zemljišni mikroorganizmi, svojim eksudatima mogu sniziti pH u rizosferi i tako povećati dostupnost i apsorpciju metala (Johnstone & Nolan 2015; Schalk et al. 2011). Koncentracije biodostupnih formi nekih ispitivanih metala su višestruko više od onih koje se prema Kabata Pendias (2011) smatraju toksičnim za većinu biljaka (>30 mg/kg Pb; >20 mg/kg Cu; >300 mg/kg Zn), a takođe i od koncentracija detektovanih u antropogeno nezagađenim zemljištima sveta (5-90 mg/kg Pb; 14-109 mg/kg Cu; 60-89 mg/kg Zn). Sa druge strane, koncentracije biodostupnih oblika ostalih ispitivanih elemenata u flotacionoj jalovini su niže od onih koje se prema Kabata-Pendias (2011) i Marschner (2012) smatraju toksičnim za većinu biljnih vrsta (<200 mg/kg Mn; <500 mg/kg Fe; 10-50 mg/kg Ni).

Poređenjem udela dostupnih formi metala u uzorcima flotacione jalovine iz četiri različita tretmana uočava se da BU podloge tretirane NPK đubrivom sadrže nešto viši udeo dostupnih formi metala. Ovo se može povezati sa činjenicom da fertilizacija sa NPK dovodi do promene pH i redoks potencijala podloge što izaziva promene u hemijskom ponašanju metala. Apсорpcija amonijum jona (NH_4^+) iz mineralnog đubriva od strane biljke dovodi do istovremenog izlučivanja H^+ zbog održavanja jonske ravnoteže, i do sniženja pH u rizosferi biljke (Belay et al. 2002; Czarnecki & Düring 2015; Magdoff et al. 1997). Pored toga, amonijum joni su u kompeticiji sa jonima metala u podlozi, dovode do njihove desorpcije sa razmenljivih mesta na površini zemljišnih čestica i otpuštanja u zemljišni rastvor. Na ovaj način, dodavanjem đubriva koja sadrže amonijačni N se povećava rastvorljivost metala, njihova mobilnost u podlozi i biodostupnost (Hanc et al. 2012; Komárek et al. 2008; Kozdrój et al. 2007).

5.2. Sadržaj ispitivanih elemenata u biljnom materijalu

I pored izuzetno nepovoljnih edafskih uslova predstavljenih niskim koncentracijama makronutrijenata i veoma visokim koncentracijama više metala u podlozi, biljke *M. × giganteus* su tokom dve sezone više ili manje uspešno rasle i razvijale se na odlagalištu flotacione jalovine. Poznato je da su koncentracije elemenata u biljnim organima promenjive tokom vremena, a njihova sezonska dinamika u biljci zavisi od usvajanja i mobilnosti metala u biljci, redistribucije tokom perioda senescencije nadzemnih organa, kao i odnosa akumulacije metala i prirasta biomase koji ne moraju pratiti jedan drugog, posebno u slučaju slabo mobilnih elemenata.

Poređenjem sadržaja N između biljaka iz različitih tretmana uočava se da biljke koje su rasle na odlagalištu flotacione jalovine, bez obzira na tretman, imaju niži sadržaj ovog elementa u korenu u

odnosu na kontrolu. I pored značajnih razlika u količini N koje su detektovane u flotacionoj jalovini u različitim tretmanima, većih razlika u sadržaju N u biljkama sa ovih podloga nema.

Za razliku od azota, sadržaj fosfora u biljkama pokazuje jasnu zavisnost od tretmana. Tako su značajno više koncentracije P u svim biljnim organima detektovane kod kontrolnih biljaka u odnosu na biljke sa jalovine, kao i kod biljaka tretiranih mineralnim đubrivom u odnosu na netretirane. Koncentracije P koje su detektovane kod biljaka sa jalovine, a posebno kod biljaka iz RI_{NPK} i RI₀ tretmana, su veoma niske i smatraju se prema Marschner (1995), deficitarnim za normalan rast i razvoj biljke. Sadržaj kalijuma pokazuje jasnu dinamiku tokom godine - koncentracija K u nadzemnim organima se povećava tokom perioda intenzivnog rasta biljke, a smanjuje tokom jesenjeg i zimskog perioda kada se odvija njegova redistribucija u podzemne organe. Posledično, rizom i koren se nakon perioda senescencije nadzemnih delova biljke odlikuju najvišim koncentracijama K. Najniži sadržaj K se uočava kod RI₀ zbog izrazitog deficita K u podlozi.

Na osnovu koncentracija ispitivanih metala u podzemnim i nadzemnim organima jasno se uočava da *M. × giganteus* tokom dvogodišnjeg rasta na odlagalištu flotacione jalovine akumulira sve ispitivane metale u korenovima u daleko višim koncentracijama u poređenju sa nadzemnim organima. Efikasna akumulacija metala u visokim koncentracijama u korenu je predstavljena i vrednostima BCF>1 za sve metale, osim za Pb. Ovakvim rezultatima svakako značajno doprinosi velika biodostupnost metala u podlozi. Mali deo sadržaja metala koji su akumulirani u korenu se translocira u nadzemne delove biljke na šta ukazuju niske vrednosti TF koje su za sve metale bile niže od 1, osim za Mn kod BU₀, a koji je bio tek nešto iznad 1. Vrednosti TF < 1 ukazuju na strategiju isključivanja metala iz daljeg transporta kroz biljku na nivou korena, pa se *M. × giganteus* može svrstati u grupu biljaka ekskludera metala. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima koja su prethodno objavljena za Zn (Andrejić et al. 2018; Korzeniowska & Stanislawska-Glubiak 2015) i kombinaciju nekoliko metala u *M. × giganteus* (Nurzhanova et al. 2019; Pidlisnyk et al. 2018), kao i za različite vrste roda *Miscanthus* gajenih na supstratima koji su opterećeni visokim koncentracijama metala (Antosiewicz 2004; Guo et al. 2016; Korzeniowska & Stanislawska-Glubiak 2015; Nsanganwimana et al. 2014, 2015; Pidlisnyk et al. 2014, 2016, 2018; Prasad 2015).

Koncentracije metala koje su detektovane u korenovima biljaka su u velikoj meri određene njihovim sadržajem u flotacionoj jalovini, a bile su u okviru vrednosti koje su toksične za najveći broj biljaka (Kabata-Pendias 2011). Međutim, ovo dvogodišnje istraživanje pokazuje da ovako visoke koncentracije metala u korenu nisu eliminatorni faktor za preživljavanje i rast *M. × giganteus* na flotacionoj jalovini. Ranije studije su pokazale da su štetni uticaji sličnih koncentracija metala na vitalne procese korena kod biljnih vrsta koje se spontano javljaju na podlogama opterećenim metalima veoma retko primećeni. Razlog tome je uglavnom efikasna imobilizacija metala unutar ćelijskih zidova parenhimskih ćelija korteksa korena, i postojanje hidrofobnih Kasparijevih traka endoderma kojima se efikasno sprečava dalji apoplastični put kretanja metala i njihova translokacija ka provodnom sistemu korena, a odatle dalje ka nadzemnim organima biljke (Meyers et al. 2008; Seregin et al. 2004). Imobilizacija toksičnih metala u apoplastu se uglavnom zasniva na visokom afinitetu njihovih dvovalentnih i trovalentnih katjona za vezivanje za funkcionalne grupe ćelijskog zida (-OH, -COOH i -SH) i pektina (-COOH) (Colzi et al. 2011; Meyers et al. 2008; Schmohl et al. 2000). Uobičajeni mehanizam za detoksikaciju teških metala je i heliranje metala specifičnim ligandima (proteini, organske kiseline, amino kiseline), što dalje vodi ka sekvenciji kompleksa ligand-metal u vakuoli parenhimskih ćelija korteksa korena (Callahan et al. 2006; Krämer et al. 2000; Yang et al. 2005). Dakle, iako detektovane koncentracije svih metala u korenovima značajno prevazilaze vrednosti koje su toksične za izdanke većine biljnih vrsta, njihove kritične koncentracije u korenu mogu biti daleko više u odnosu na one u izdanku zahvaljujući imobilizaciji metala. Poznato je da se izuzetno malo metala u biljci može naći u vidu slobodnih jona i da su, u cilju održanja jonske homeostaze, njihovo usvajanje, transport i kompartmentacija koordinisani procesi. Kao rezultat efikasne imobilizacije metala, njihove koncentracije u nadzemnim delovima biljke su bile u okviru vrednosti za koje se smatra da ne izazivaju oštećenja kod biljaka osetljivih na metale (Kabata-Pendias 2011), izuzev Pb, Zn i Cu.

Metali koji svojom koncentracijom dominiraju u svim organima biljaka *M. × giganteus* gajenih na flotacionoj jalovini su Fe i Zn, što je rezultat njihovih visokih koncentracija u podlozi. Fe i Zn u korenu po zastupljenosti prate Cu>Mn>Pb>Ni>Cd>Cr>Co, u rizomu Mn>Cu>Pb>Cr>Co>Ni>Cd, a u nadzemnim organima Mn>Pb>Cu>Cr>Ni>Cd≥Co, što je u skladu sa istraživanjima Kocoń & Jurga (2017). Ove uopštene promene u redosledu metala po sadržaju su rezultat procesa imobilizacije koji se dešava ne samo na nivou korena, već tokom čitavog puta metala kroz biljku, dakle i na nivou ostalih biljnih organa. S obzirom da su Fe, Mn, Zn i Cu esencijalni elementi za biljke, biljke poseduju mehanizme za njihovo usvajanje i translokaciju, pa pri veoma povećanim koncentracijama u podlozi nisu u mogućnosti da u potpunosti spreče njihovo intenzivnije usvajanje.

I pored efikasne imobilizacije značajne količine metala u korenu, neki od ispitivanih metala su u nadzemnim delovima biljke detektovani u koncentracijama koje izazivaju štetne efekte kod biljaka osetljivih na metale. Jedan od njih je Zn, koji se u nadzemnim organima *M. × giganteus* sa flotacione jalovine javlja u koncentracijama značajno višim u odnosu na vrednosti koje su toksične za većinu biljaka osetljivih na metale (100 do 500 mg/kg; Kabata-Pendias 2011), što je u skladu sa ranije objavljenim podacima Nsanganwimana et al. (2014). Ovako visoke koncentracije Zn u nadzemnim organima *M. × giganteus* su posledica kako visokog sadržaja pristupačnog Zn u jalovini, tako i dobre mobilnosti ovog elementa unutar biljke (van Goor & Wiersma 1976). Naime, poznato je da je usvajanje Zn korenovima direktno zavisno od koncentracije dostupne forme metala u supstratu (Kabata-Pendias 2011), a koja je u flotacionoj jalovini u svim tretmanima bila visoka, na šta ukazuju i relativno visoke vrednosti BCF (do 5,5). Koncentracije Zn u stablima ovih biljaka su više nego u listovima, i u svim fazama rasta višestruko premašuju koncentracije dobijene u istraživanju Nsanganwimana et al. (2016) u kome su biljke gajene na fizički i hemijski drugačijem supstratu - zemljištu koje je kontaminirano određenim koncentracijama Cd, Pb i Zn. Uočena distribucija Zn u *M. × giganteus* (koren > stablo > listovi) odstupa od uobičajene distribucije u biljnim organima (koren > listovi > stablo). Visoke koncentracije Zn u stablu se mogu objasniti njegovom efikasnom translokacijom iz korena ka nadzemnim delovima biljke, a zatim akumulacijom i imobilizacijom unutar parenhimskih ćelija stabla, što se može zaključiti i na osnovu histohemijske lokalizacije Zn (Slika 5). Intenzivno bojenje ćelijskih zidova unutar stele korena ukazuje na translokaciju značajne količine Zn ka provodnom sistemu korena i dalji transport u akropetalnom pravcu. Visoke koncentracije Zn u listovima i stablu su vezane za činjenicu da je Zn jedan od esencijalnih mikroelemenata u biljkama, koji ulazi u sastav različitih metaloenzima poput proteinaza, peptidaza, fosfohidrilaza ili Cu/Zn SOD (Cakmak 2000; Kabata-Pendias 2011). Zbog ovakve uloge Zn, biljke poseduju čitav niz transportera i organskih molekula koji predstavljaju ligande Zn i učestvuju u njegovom transportu kroz biljku, sekvencijalno u ćeliji i homeostazi (Haydon & Cobbett 2007; Milner et al. 2013). Histohemijska lokalizacija Zn u listovima je pokazala značajnije nakupljanje Zn u unutrašnjosti tankozidnih buliformnih ćelija i u ćelijskom zidu sklerenhimskih ćelija lista, ali ne i u fotosintetskim ćelijama lista (Slika 5).

U odnosu na visoke koncentracije Pb u flotacionoj jalovini, *M. × giganteus* pokazuje nizak nivo akumulacije Pb u korenu, na šta ukazuju niske vrednosti BCF (0,23-1,55). Olovo je jedini od ispitivanih metala čije su koncentracije u korenu bile niže u odnosu na koncentraciju pristupačnih formi elementa u flotacionoj jalovini. Ovako nizak nivo akumulacije korenom i pored visokih koncentracija pristupačnog Pb u flotacionoj jalovini (186-545 $\mu\text{g g}^{-1}$) se može objasniti njegovom slabom mobilnošću u podlozi i činjenicom da predstavlja jedan od elemenata koji nema poznatu ulogu u biljnom organizmu (Kabata-Pendias 2004). Za sada nije ustanovljeno koliki je udeo Pb u različitim tipovima podloge generalno dostupan biljkama, ali se na osnovu nekih istraživanja procenjuje da iznosi tek 0,005–0,13% (Davies 1995). Međutim, treba imati u vidu da BCF vrednosti predstavljaju odnos koncentracije metala u korenu i one u supstratu pa time ne govore o konkretnom sadržaju akumuliranog metala. Tako su koncentracije Pb u korenu visoke i daleko iznad onih koje su uobičajene za nadzemne delove biljaka sa nezagađenih podloga. Niske koncentracije Pb u rizomu i nadzemnim delovima biljke, ukazuju na nizak nivo translokacije Pb u akropetalnom pravcu, na šta ukazuju i niske vrednosti TF (0,06-0,32). Poznato je da se Pb dominantno kreće kroz apoplast kore korena u radijalnom pravcu i akumulira u neposrednoj blizini endoderma. Na ovom putu kroz koren se odvija veoma efikasna, ali samo delimična prevencija

njegove translokacije u nadzemne delove biljke, koja se postiže taloženjem Pb duž zidova ćelija parenhima kore korena i veoma efikasnom barijerom - hidrofobnom Kasparijevom trakom endoderma (Jiang & Liu 2010; Meyers et al. 2008; Seregin et al. 2004). Smatra se da je glavni proces u akumulaciji Pb u korenskim tkivima njegova depozicija u vidu taloga ili kristala, posebno u vidu olovo-pirofosfata duž ćelijskih zidova i površine plazmaleme (Malone et al. 1974; Seregin et al. 2004). Slične naslage Pb su uočene ne samo u korenovima, već i u stablima i listovima što ukazuje da se Pb deponuje na sličan način u svim tkivima biljaka. Ovo potvrđuje i histohemijska lokalizacija Pb na nivou korena *M. × giganteus* koja je pokazala intenzivno nakupljanje Pb u ćelijskim zidovima korteksa i površine endoderma korena, kao i u ćelijskim zidovima parenhimskih ćelija rizoma, ali ne i provodnog snopića (Slika 6). Imobilizacija Pb u korenu je ranije dokazana kod *M. × giganteus* (Korzeniowska & Stanislawska-Glubiak 2015; Pidlisniuk et al. 2018), kao i kod *Phragmites australis* (Prca et al. 2019; Rocha et al. 2014), *Helianthus annuus* (Wińska-Krysiak et al. 2015), *Allium sativum* (Jiang & Liu 2010), *Nicotiana tabacum* (Gichner et al. 2008), i nekoliko metalofita i pseudometalofita (Dahmani-Muller et al. 2000). Međutim, imobilizacija Pb u korteksu korena je samo delimična, pa se ovaj metal prenosi simplastom i ulazi u provodni sistem korena i dalje transportuje kroz rizom i stablo do listova (Wierzbicka 1987).

Najniže koncentracije Pb su detektovane u rizomima (izuzev RI_0) u kojima ga ima 6,2-25 puta manje u odnosu na korenove, nešto više ga ima u stablu, a još više listovima, što je u skladu sa ranijim istraživanjima biljaka sa flotacione jalovine i zemljišta jako zagađenih Pb (Nsanganwimana et al. 2014, 2016; Wanat et al. 2013). Iako je sadržaj Pb u listovima daleko niži od onoga u korenu, njegova koncentracija prevazilazi vrednosti koje su zabeležene u biljkama sa nezagađenih područja (2-2,5 mg Pb/kg dw; Markert 1992). I neka rana istraživanja su pokazala da i pored efikasne imobilizacije u korenu, pojedine biljke translociraju i akumuliraju značajne količine Pb u listovima, što u velikoj meri zavisi od koncentracija Pb u podlozi i korenu (Miller & Koeppe 1971). Histohemijska lokalizacija ukazuje na akumulaciju Pb u parenhimskim ćelijama stabla *M. × giganteus*, kao i buliformnim ćelijama lista i ćelijama parenhimske sare (Slika 6). Ovo je u skladu sa dosadašnjim podacima Sharma & Dubey (2005) prema kojima se osim u ćeljskom zidu, Pb najviše nakuplja u ćelijskoj vakuoli, a manje u hloroplastima i mitohondrijama. I ovako niske koncentracije Pb mogu ispoljiti negativna dejstva na funkcionisanje ćelija usled uticaja na biosintezu hlorofila, aktivnost fotosinteze, antioksidativne enzime itd. (Kim et al. 2003).

Pb je jedan od metala koji je veoma slabo mobilan u biljci i njegova koncentracija u korenu se povećavala tokom godine i najviše vrednosti dostigla u periodu pred žetvu. Izraženije povećanje koncentracije Pb u drugoj godini se može objasniti njegovom progresivnom akumulacijom i efikasnom imobilizacijom u korenu tokom vremena (Pourrut et al. 2011), što je uočeno i kod drugih višegodišnjih trava, poput *Phragmites australis* (Kastratović et al. 2013). Ovaj trend je najizraženiji kod BU_{NPK} i RI_{NPK} biljaka što navodi na zaključak da je fertilizacija mineralnim NPK đubrivom povećala stepen usvajanja i akumulacije Pb u korenu. Ovaj trend prate i koncentracije Pb u stablu. U listovima RI_{NPK} biljaka koncentracija Pb se značajno i pravilno povećavala tokom prve godine rasta, dok je u drugoj godini rasta bila slična između biljaka i flotacione jalovine.

Metal koji je takođe akumuliran u visokim koncentracijama u korenu biljaka sa flotacione jalovine je Cu, što je uslovljeno visokim koncentracijama ukupnih i dostupnih formi ovog elementa u podlozi. Poznato je da se Cu apsorbuje ne samo aktivnim već i pasivnim putem, posebno u uslovima izuzetno visokih koncentracija njegove dostupne forme (Kabata-Pendias 2011). Ovim se mogu objasniti više koncentracije Cu u korenu, rizomu i listovima RI biljaka u odnosu na BU . Veoma efikasna imobilizacija Cu već na nivou korena se uočava na osnovu višestruko nižih koncentracija u rizomu, stablu i listu, kao i $TF < 1$ (0,02-0,26). Zahvaljujući slaboj translokaciji u nadzemne organe, koncentracije Cu u stablima i listovima su ispod vrednosti koje kod senzitivnih biljaka ispoljavaju neke od negativnih efekata (20-100 mg/kg; Kabata-Pendias 2011). Poređenjem koncentracije Cu u korenovima tokom dve uzastopne godine i analizom BCF između različitih tretmana se uočava da biljke RI_{NPK} pokazuju veći stepen akumulacije Cu u korenu tokom intenzivnog perioda rasta biljke (avgust) i početka senescencije (novembar) u odnosu na sve ostale. Ovo se može objasniti rastom u jalovini i

direktnim (supstitucija) ili indirektnim uticajem amonijum jona (promena pH) na oslobađanje Cu^{2+} sa površine zemljišnih čestica. U rizomima se tokom dve uzastopne godine primećuje postepeno povećanje sadržaja Cu i pravilna dinamika tokom godine, što se može povezati sa redistribucijom Cu u rizome tokom perioda senescencije nadzemnog dela biljke, kao i akumulacijom Cu tokom vremena (Pidlisnyuk et al. 2016).

I pored veoma visokog ukupnog sadržaja Mn u flotacionoj jalovini, njegova dostupnost na neutralnoj pH flotacione jalovine je relativno niska, što se ogleda u sadržaju Mn u biljkama. Iako su biljke sa flotacione jalovine sadržale 2-4 puta više koncentracije Mn u svojim korenovima u odnosu na kontrolne biljke, koncentracije Mn su uvek bile ispod gornje granične vrednosti iznad koje Mn najčešće ispoljava fitotoksične efekte (>500 mg/kg). Babalonas et al. (1984) su utvrdili da je za usvajanje i akumulaciju Mn u korenu veoma značajna pH vrednost zemljišta. Na neutralnoj pH zemljišnog rastvora, kakva je pH ispitivane flotacione jalovine, Mn uglavnom formira nerastvorne okside, što za rezultat ima smanjenu dostupnost Mn za usvajanje korenom. Koncentracije Mn u korenu su bile više kod biljaka tretiranih NPK đubrivom u odnosu na netretirane biljke, što ukazuje na pozitivan uticaj đubrenja na biodostupnost Mn u rizosferi, usled promene pH ili oslobađanja Mn^{2+} na razmenljivim mestima na zemljišnim česticama pomoću NH_4^+ poreklom iz mineralnog đubriva. Translokacija u listove je bila relativno niska (TF 0,14-1,16), što je u skladu sa istraživanjima Pidlisnyuk et al. (2016). Nasuprot višim koncentracijama Mn u korenovima BU_{NPK} i RI_{NPK} , više koncentracije u listovima su detektovane u BU_0 i RI_0 . Ovo ukazuje na to da, iako je sadržaj Mn u biljci u direktnoj funkciji koncentracije dostupne forme u podlozi (Kabata-Pendias 2011), njegov transport i koncentracije u nadzemnim organima su kontrolisane od strane biljke.

Izuzetno visoke koncentracije Cd koje su u flotacionoj jalovini do 100 puta više u odnosu na kontrolno zemljište se ogledaju i u višestruko višim koncentracijama u korenovima biljaka sa flotacione jalovine u odnosu na kontrolne biljke. S obzirom da apsorpcija i akumulacija Cd u korenu zavisi ne samo od koncentracije već i od mobilnosti ovog elementa u podlozi (Kabata-Pendias & Wiacek 1985; Nsanganwimana et al. 2016) može se smatrati da je na neutralnoj pH flotacione jalovine dostupnost Cd niža (Kitagishi & Yamane 1981). Na visok nivo zadržavanja Cd u korenu ukazuju njegove značajno niže koncentracije u rizomu i nadzemnim delovima biljke, kao i niske vrednosti TF (0,02-0,35). Koncentracije u stablu i listovima odgovaraju onima koje su detektovane kod biljaka poreklom sa podloga zagađenih Cd, ali se još uvek nalaze ispod vrednosti (10 mg Cd/kg) koje kod većine biljaka izazivaju toksične efekte (Kabata-Pendias 2011).

Koncentracije Cr u svim tretmanima i svim biljnim organima se nalaze u okviru uobičajenih vrednosti tipičnih za biljke sa nezagađenih podloga (Kabata-Pendias 2011), a koncentracije Cr u listovima su ispod granične vrednosti od 20 mg/kg koju navode Reeves et al. (1999). Poznato je da je Cr slabo dostupan biljkama, a slične ukupne koncentracije Cr u podlogama su rezultovale nešto višim koncentracijama kod BU i RI biljaka u odnosu na kontrolne biljke. Ove razlike se mogu objasniti nešto višim koncentracijama Cr u flotacionoj jalovini, kao i nedostatkom humusa sa visokim adsorptivnim kapacitetom, kakav imaju prirodna zemljišta. Zbog visokog afiniteta ka vezivanju za ćeljske zidove najveći deo Cr ostaje u korenovom sistemu, na šta ukazuje TF <1 , kao i niže koncentracije detektovane u rizomu i nadzemnim organima u odnosu na koren, što je u saglasnosti sa u literaturnim podacima (Antosiewicz 2004; Mei et al. 2002; Shanker & Pathmanbhan 2004; Zayed et al. 1998).

Koncentracije Ni u korenovima biljaka sa flotacione jalovine su značajno više u odnosu na kontrolne biljke, sa uočljivo većim sadržajem Ni u RI tretmanu tokom intenzivnog perioda rasta (jun). Koncentracije Ni u listovima su niže, ili na donjoj granici vrednosti širokog intervala koncentracija Ni koje kod senzitivnih biljaka izazivaju fitotoksične efekte (10-100 mg/kg, Kabata-Pendias 2011).

Koncentracije Co u korenovima, rizomima i stablima biljaka sa flotacione jalovine su više u odnosu na kontrolne biljke, sa značajno većim sadržajem u korenovima RI u odnosu na BU biljke tokom perioda rasta biljke. Koncentracija Co u biljkama u potpunosti zavisi od vrste (Palit et al. 1994),

tako da njegov sadržaj varira od 0,4 mg/kg za *Trifolium* sp. (Ozanne et al. 1963) do nekoliko mg/kg suve mase kod kupusa (Bollard 1983).

5.3. Fitoremedijacioni potencijal *M. × giganteus*

Efikasnost biljke da ekstrahuje metale iz zemljišta korenom i da ih translocira i akumulira u nadzemnim delovima se može proceniti korišćenjem biokoncentracionog i translokacionog faktora. Prosečne vrednosti BCF za svaki od analiziranih metala u biljkama gajenim na flotacionoj jalovini su veće od 1, izuzev za Pb. Biljke su bile najefikasnije u usvajanju i akumulaciji Fe u korenu (BCF=147). Elementi koji imaju malu pokretljivost u zemljištu, prvenstveno pod uticajem neutralne pH podloge, se slabije usvajaju, poput Pb čiji BCF iznosi 0,58.

Istovremenim korišćenjem BCF i TF može se uporediti sposobnost biljke da usvaja metale iz podloge i da ih translocira u izdanke. Tolerantne neakumulatorske vrste teže da ograniče transfere „zemljište-koren“ i „koren-izdanak“, i kao takve imaju mnogo manju koncentraciju toksičnih metala u svojoj nadzemnoj biomasi, dok akumulatori aktivno usvajaju i translociraju metale u nadzemne delove (Yoon et al. 2006). Biljke koje imaju i BCF i TF <1 su nepodobne za fitoekstrakciju (Fitz & Wenzel 2002), dok biljke sa BCF>1 i TF<1 imaju potencijal za fitostabilizaciju metala u supstratu (Yoon et al. 2006). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da *M. × giganteus* ima sposobnost za fitostabilizaciju svih ispitivanih elemenata izuzev Pb, za koje predstavlja ekskluder (BCF i TF <1), što je u skladu i sa rezultatima drugih istraživača (Nsanganwimana et al. 2014, Nurzhanova et al. 2019, Pidlisnyk et al. 2016, Wanat et al. 2013). Podaci o gornjim graničnim koncentracijama metala u podzemnim organima biljaka su retki i uglavnom se odnose na one organe koji imaju ulogu u ishrani ljudi. Zbog toga se koncentracije metala u korenovima biljaka sa flotacione jalovine često porede sa gornjim graničnim koncentracijama metala u nadzemnim organima. Ipak, smatra se da kritične koncentracije metala u korenovima mogu biti značajno više zbog intenzivne imobilizacije i to putem taloženja u međucelijskom prostoru, vezivanja u ćelijskim zidovima, i kompleksacije u vakuolama unutar korteksa korena (Kabata-Pendias 2011).

Važan pokazatelj osetljivosti biljke na polutante je indeks tolerantnosti koji ukazuje na razlike u postignutoj suvoj biomasi biljke koja je izložena polutantima u odnosu na kontrolne biljke (Yang et al. 2015). Vrednost indeksa tolerantnosti iznad 1 ukazuje na otpornost biljaka na teške metale (Audet & Charest 2007). U svim tretmanima na odlagalištu flotacione jalovine, indeks tolerantnosti *M. × giganteus* je bio <1, što ukazuje na njegovu relativno nisku otpornost na složene nepovoljne edafske uslove flotacionog jalovišta, prvenstveno na toksične koncentracije metala u podlozi i deficijenciju makroelemenata.

5.4. Razmena gasova, fluorescencija hlorofila *a* i oksidativni stres

Komponente procesa fotosinteze su najviše trpe povišene koncentracije metala i/ili deficit nekog od esencijalnih elemenata u listovima, zbog čega promene u parametrima koji su vezani za razmenu gasova predstavljaju veoma dobre indikatore mineralnog stresa (Vernay et al. 2008). Smanjen intenzitet fotosinteze kao i dostizanje maksimuma fotosintetske aktivnosti pri značajno nižim intenzitetima osvetljenosti, koji su detektovani kod biljaka sa flotacione jalovine u odnosu na kontrolu, jasno ukazuje na njihovu smanjenu sposobnost da efikasno iskoriste pristiglu svetlost jačeg intenziteta. Izrazito smanjen intenzitet fotosinteze u avgustu druge godine rasta biljaka na flotacionoj jalovini ukazuje na oštećenja koja ograničavaju fotosintetsku efikasnost biljaka, a posledično i njihov rast. Može biti više razloga za to s obzirom da je poznato da visoke koncentracije metala u listovima negativno utiču na različite aspekte fotosinteze, od količine fotosintetskih pigmenta i apsorpcije svetlosti, preko transporta elektrona, do količine i aktivnosti pojedinih enzima Kalvinovog ciklusa i enzima uključenih u proces disanja (Prasad & Strzalka, 1999). Pored parametara koji opisuju razmenu gasova, u cilju boljeg razumevanja ograničenja fotosinteze koriste se i parametri fluorescencije Chl *a*. Oni daju dobar uvid u eventualna oštećenja i promene u funkcionalnosti delova fotosintetskog aparata, prvenstveno onog koji je vezan za svetlosno-zavisnu fazu fotosinteze.

Na osnovu sadržaja metala u listovima *M. × giganteus* samo su Zn i Pb akumulirani u koncentracijama koje su iznad gornjih graničnih vrednosti i mogu izazvati kompleksne poremećaje u biohemijskim procesima lista i uticati na koncentraciju fotosintetskih pigmenta. Poznato je da visoke koncentracije Zn izazivaju smanjenje koncentracije hlorofila u listovima inhibirajući aktivnost ključnog enzima u njegovoj biosintezi - dehidrataze aminolevulininske kiseline (Morsch et al. 2002; Prasad & Prasad 1987). Pored toga, smanjena koncentracija Chl u listu može biti rezultat i povećanja aktivnosti enzima hlorofilaze koji učestvuje u degradaciji Chl. U korist ovome, uočeno je smanjenje Chl *a* u biljkama gajenim na odlagalištu flotacione jalovine i u prvoj godini gajenja je bilo u negativnoj korelaciji sa koncentracijom Zn, i pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama N i P, dok je u drugoj godini bilo u negativnoj korelaciji sa Fe, i pozitivnoj korelaciji sa N i K. Povećan sadržaj karotenoida koji je detektovan kod svih biljaka sa flotacione jalovine u junu, kao i kod RI biljaka u avgustu druge godine gajenja ukazuje na njihovu povećanu aktivnost i značaj u zaštiti fotosintetskog aparata. Karotenoidi predstavljaju veliku grupu pigmenta koji štite hloroplaste od viška energije odajući je u vidu toplote, i učestvuju u zaštiti od fotooksidativnih oštećenja hvatajući singletni kiseonik i različite vrste ROS-a, time štiteći tilakoidne membrane od peroksidacije membranskih lipida (Kenneth et al. 2000; Simancas & Munné-Bosch 2015; Singh et al. 2017; Zhou et al. 2018). U skladu sa ovim ulogama, detektovano povećanje sadržaja ukupnih karotenoida se može smatrati mehanizmom zaštite PSII i fotosintetičkih procesa od oštećenja do kojih može doći usled problema u iskorišćavanju energije u fotohemijskim reakcijama, na koje ukazuju smanjen intenzitet fotosinteze, izmenjeni parametri fluorescencije i viši stepen oksidativnih oštećenja membrana.

Jedan od glavnih ograničavajućih faktora za odvijanje fotosinteze je smanjena stomatna provodljivost lista. Dobijeni rezultati jasno pokazuju da je smanjena provodljivost stoma kod biljaka sa jalovine, posebno izražena u avgustu druge sezone, imala uticaja na ograničenje intenziteta fotosinteze. Niže vrednosti Gs se mogu pripisati prisustvu Pb u listovima za koje je poznato da izaziva zatvaranje stoma, uzrokujući deficit CO₂. Intenzitet respiracije je faktor koji takođe utiče na vrednost neto fotosinteze. Kod rizomski propagiranih biljaka sa flotacione jalovine tokom perioda ispitivanja, respiracija je bila nešto intenzivnija u odnosu na kontrolne biljke i one dobijene iz busenova. Međutim, u avgustu druge sezone kada je zabeležen najintenzivniji pad intenziteta fotosinteze, intenzitet respiracije kod biljaka sa flotacione jalovine je bio niži u odnosu na kontrolu što ukazuje na negativne efekte akumuliranih metala na proces disanja. Toksičnost metala se ogleda u remećenju strukture mitohondrijskih membrana i za njih vezanih procesa. Poznato je da se Zn vezuje za organske kiseline (jabučnu, limunsku kiselinu) čime se formiraju metal-helatni kompleksi kojima se vrši transport Zn u vakuolu i njegova imobilizacija. Ovakvo korišćenje međuprodukata Krebsovog ciklusa u cilju smanjenja toksičnosti metala u ćeliji vodi ka narušavanju procesa disanja (Lösch & Köhl 1999). Pored toga, oba metala prisutna u višku, Zn i Pb, pokazuju visok afinitet za vezivanje za fosfatne grupe membranskih proteina i fosfolipida membrana mitohondrija, čime utiču na smanjenu aktivnost proteina i povećanu permeabilnost membrana. Pored toga, komponentne elektron transportnog lanca mitohondrija, kao i transporteri supstrata u disanju su u kontaktu ne samo sa matriksom već i međumembranskim prostorom pa su samim tim i podložniji uticaju metala, u odnosu na enzime Krebsovog ciklusa.

Toksičnost Zn²⁺ i Pb²⁺ proističe iz činjenice da kada su prisutni u suvišku mogu zameniti jone drugih dvovalentnih metala u metal-proteinskim kompleksima i na taj način dovesti do poremećaja u njihovoj funkciji. Jedan od primera je i supstitucija Mg²⁺ sa Zn²⁺ u molekulu hlorofila, što predstavlja takođe jedan od potencijalnih uzroka inhibicije fotosinteze. Zbog ovako promenjenog [Zn]-hlorofila nije moguć normalan transfer energije iz antena ka hlorofilu reakcionog centra, čime se povećava verovatnoća da će energija apsorbirana pigmentima antena biti izračena u vidu toplote. Poznato je i da supstitucija Mg²⁺ u molekulu Chl dovodi i do smanjene tendencije ka vezivanju proteinskih liganada, za čiju je terciarnu strukturu i pravilnu funkciju neophodno da budu vezani za Chl. Zbog toga se može javiti denaturacija kompleksa pigment-protein i funkcionalna degradacija fotosistema na šta obično ukazuju niže vrednosti Fv/Fm (Küpper et al. 2003). Maksimalni kvantni prinos primarne fotohemije PSII, označen kao Fv/Fm, a koji se određuje nakon perioda koji je list proveo u mraku, je veoma efikasan pokazatelj fotohemijske aktivnosti fotosintetskog aparata i jedan od parametara koji se najčešće

koristi za procenu stresa kod biljaka. I pored povećane koncentracije Mg i Pb u listu, vrednosti Fv/Fm koje su detektovane kod svih biljaka sa flotacione jalovine, sa izuzetkom BU₀, su bile slične onima kod kontrolnih biljaka (0,78-0,85; Björkman & Demmig 1987), i ukazuju na održanje funkcionalnosti PSII i nizak nivo fotoinhibicije (Maxwell & Johnson 2000). Održana funkcionalnost PSII bez obzira na prisustvo toksičnih metala u listu ukazuje da je *M. × giganteus* efikasno imobilizovao Zn i Pb unutar lista, kao i da su komplementarni pigmenti (poput karotenoida) imali značajnu ulogu u zaštiti fotosistema od oksidativnog oštećenja i fotoinhibicije. Kod svih biljaka sa flotacionog jalovišta u avgustu obe godine je i pored optimalnih vrednosti Fv/Fm, došlo do izrazitog smanjenja fotohemijskog gašenja fluorescencije, operativne efikasnosti PSII i nivoa linearnog transporta elektrona, što ukazuje na inhibiciju prenosa energije. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima koja su pokazala da PSII biljaka koje su opterećene Pb ili Zn normalno apsorbuje i odaju energiju, ali da je transport elektrona veoma redukovano (Lazár & Jablonský 2009). Ustanovljeno je da do ovoga dolazi zbog inhibicije transporta elektrona sa kompleksa na kom se oslobađa kiseonik (engl. *oxygen-evolving complex*, OEC) do PSII zbog susstitucije Ca²⁺ ili Mn²⁺ u OEC nekim od metala, kao i od PSII ka PSI usled smanjene produkcije plastokinona koji predstavlja primarni akceptor elektrona sa PSII u elektron transportnom lancu (Strasser et al. 2004; Wu et al. 2008). Pored toga, ustanovljeno je da Pb izaziva poremećaje u ultrastrukturi hloroplasta i lipidnom sastavu tilakoidnih membrana što takođe narušava proces fotosinteze i može se smatrati potencijalnim razlogom detektovanih promena kod *M. × giganteus*.

Dobijeni rezultati ukazuju i na to da je do promena u ostalim parametarima fluorescencije moglo doći ne samo zbog problema na nekoj od komponenti svetle faze fotosinteze, već i zbog inhibicije enzima Kalvinovog ciklusa kao što su RuBisCO, gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza ili ribuloso-5-fosfat-kinaza čije aktivnosti mogu biti poremećene povećanim koncentracijama Zn i Pb. Ranija istraživanja su čak pokazala da fotohemijske reakcije nisu toliko osetljive na povećane koncentracije Zn i Pb u odnosu na reakcije Kalvinovog ciklusa (Ahmad et al. 2011; Sharma & Dubey 2005; Vassilev et al. 2011; Yang et al. 2015; Zhou et al. 2018). U najvećem broju slučajeva, do inhibicije enzima dolazi usled vezivanja Pb i Zn za sulfhidrilne grupe (-SH) u aktivnom centru enzima, ili za one -SH grupe koje su odgovorne za stabilizaciju tercijarne strukture proteina. Pored toga, oba metala se vezuju i za karboksilne i fosfatne grupe proteina onemogućavajući njihovu normalnu strukturu i funkciju. Kao posledica inhibicije aktivnosti enzima se snižava nivo potrošnje NADPH i ATP u Kalvinovom ciklusu, što zauzvrat snižava Φ_{PSII} i qP, a povećava proces rasipanja energije u vidu toplote kojim se reakcioni centri PSII efikasno štite od fotoinhibicije i sprečava izrazita redukcija PSII kinonskih akceptora.

Pored negativnog uticaja metala na komponente fotosintetskog procesa, i izraziti nedostatak fosfora u listovima kakav je detektovan kod biljaka sa flotacione jalovine, a posebno kod RI, može prouzrokovati veliki broj negativnih promena koje kao krajnji rezultat imaju smanjen intenzitet fotosinteze. Poznato je da deficit fosfora izaziva promene u strukturi tilakoida i grana, kao i na antenama kojima se apsorbuje svetlost čime se umanjuje aktivnost PSII (Foyer & Spencer 1986). Pored toga, dovodi do smanjenja aktivnosti nekih ključnih enzima Kalvinovog ciklusa (Rao & Terry 1989), čime se indirektno smanjuje regeneracija NADPH i efikasnost transporta elektrona (Wu et al. 2006). Ovo potvrđuju značajne pozitivne korelacije između koncentracije P u listu i Fm, Fv, Fv/Fm, Φ_{PSII} i ETR tokom prve, odnosno Fo tokom druge godine gajenja, kao i značajna negativna korelacija između koncentracije P i NPQ tokom prve godine, pokazujući da se višak energije sa antena efikasno oslobađa u vidu toplote pre nego što dospe do reakcionih centara PSII (Carstensen et al. 2018; Frydenvang et al. 2015; Heber et al. 1989, Michelet et al. 2013, Xu et al. 2007, Zhang et al. 2014).

Snižena fotosintetska aktivnost biljaka koja je izražena u avgustu obe, a posebno druge godine gajenja na flotacionoj jalovini, se jednim delom može objasniti i povećanim oksidativnim oštećenjima ćelijskih membrana u prisustvu toksičnih metala, na šta ukazuje povišena koncentracija biohemijskog markera lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne biljke. Poznato je da povećane koncentracije Zn i Pb u listu mogu dovesti do inhibicije različitih enzima, a među njima i enzima antioksidativne zaštite, i na indirektan način izazvati povećan sadržaj reaktivnih kiseoničnih vrsta (Kabata-Pendias 2011; Küpper

& Andresen 2016; Verma & Dubey 2003). Oba jona metala, Zn^{2+} i Pb^{2+} , su redoks-inertni joni koji, iako ne učestvuju direktno u redoks reakcijama, izazivaju oksidativni stres koji nije glavni uzrok već posledica njihovog dejstva u ćeliji (Küpper & Andresen 2016). Značajno povećani nivoi peroksidacije membranskih lipida u ćelijama biljaka sa flotacione jalovine ukazuju na oksidativna oštećenja ćelijskih membrana, što vodi ka promeni aktivnosti membranskih proteina, a time i različitim oštećenjima ćelijskih funkcija (Show et al. 2004). Jedan od tih procesa je fotosinteza koja je, zbog apsorpcije svetlosti i značajno smanjenog korišćenja apsorbovane energije u fotohemijskim reakcijama, ključna za stvaranje ROS-a u ćelijama ispitivanih biljaka. Povećana lipidna peroksidacija, i tek nešto više vrednosti ukupnog antioksidativnog kapaciteta listova BU i RI u drugoj godini u odnosu na kontrolu, ukazuju na nepostojanje dovoljno efikasnog sistema uklanjanja generisanih vrsta ROS kod metal-stresiranih *M. × giganteus* biljaka.

5.5. Biometrijske odlike *M. × giganteus*

Na produkciju biomase biljaka utiču svi spoljašnji faktori sredine, od klime i edafskih faktora, do biotičkih odnosa. Poređenjem klimadijagrama za dva lokaliteta na kojima je postavljen eksperiment uočava se da su klimatski uslovi veoma slični, i da su na osnovu poznavanja ekologije miskantusa klimatske prilike za njegov rast čak nešto povoljnije na Rudniku u odnosu na one u Beogradu, prvenstveno zbog veće mesečne količine padavina tokom vegetacionog perioda. Zbog sličnosti klimatskih prilika na ova dva lokaliteta može se smatrati da klimatski faktori nisu imali značajniji negativan uticaj na rast i razvoj *M. × giganteus* na flotacionom jalovištu na Rudniku. Tokom perioda intenzivnog rasta biljke, količina padavina je veoma značajan faktor za prinos biomase. Na Rudniku je ukupna količina padavina u periodu od početka aprila do kraja juna 2016. godine iznosila 373 mm, a tokom 2017. 336 mm, što je tokom obe godine bilo izuzetno povoljno za rast i razvoj miskantusa. Nepovoljniji uslovi su bili tokom jula (66,5 mm u prvoj, i 52 mm padavina u drugoj godini). Istovremeno, u Beogradu je količina padavina bila značajno niža. Prosečna temperatura vazduha tokom obe godine istraživanja na svakom od lokaliteta je bila veoma slična, a razlike u prosečnoj mesečnoj temperaturi su vidljive u srednjim vrednostima, a posebno minimalnim (RHMZ 2019).

Svaki dugotrajni stres, kao što je stres izazvan visokim koncentracijama metala i istovremenim deficitom makronutrijenata kod ispitivanih biljaka sa flotacione jalovine se obavezno ogleda i u redukciji njihovog rasta i prinosa biomase (Slike 8-16). Razlog tome su brojna strukturna i funkcionalna oštećenja ćelija i tkiva svih organa, koja udruženo vode ka slabom rastu i napredovanju biljke. Pored toga, brojni zaštitni mehanizmi, od antioksidativne zaštite do heliranja metala i reparacije nastalih oštećenja, zahtevaju određeni utrošak energije.

Iako su sve biljke zasađene na odlagalištu flotacione jalovine rasle i razvijale se tokom perioda od dve godine, odlikovala ih je mala produkcija nadzemne biomase, prvenstveno zbog manjeg broja izdanaka po rizomu, manje visine i širine stabla, kraćih internodija i kraćih podvršnih listova. Ovo smanjenje rasta je bilo izraženije u drugoj godini eksperimenta kao posledica niza negativnih efekata metala akumuliranih u korenu i listovima. Na osnovu svih dobijenih rezultata, zaključeno je da je do ograničenja u rastu biljaka sa flotacione jalovine došlo usled (i) nižeg fotosintetskog kapaciteta listova, (ii) visokog nivoa oksidativnih oštećenja membrana i (iii) visokog udela senescentnih listova koji su u drugoj godini činili čak 25-62% čime je značajno smanjena ukupna fotosintetska površina listova po biljci. Istovremeno, ograničeni rast biljaka i izražena senescencija listova takođe mogu biti posledica i veoma slabe dostupnosti fosfora u podlozi i njegovih izrazito niskih koncentracija u listovima. Fosfor kao veoma pokretan element u biljci se lako premešta iz starih u mlade listove koji aktivno rastu što kod biljaka deficitarnih fosforom posledično uzrokuje ozbiljna oštećenja na starijim listovima (Marschner 2012).

Iako prisustvo zemljišta u kombinaciji sa flotacionom jalovinom nije pokazalo pozitivno dejstvo na praćene fiziološke i biohemijske parametre lista, određene značajne razlike u biometrijskim parametrima BU i RI biljaka postoje. Pozitivan efekat prisustva zemljišta se ogleda u većim dimenzijama podvršnog lista, većem ukupnom broju listova, većoj ozelenjenosti, većoj visini stabla,

broju izdanaka iz rizoma, kao i višestruko većoj biomasi BU biljaka. S obzirom na izraziti deficit makronutrijenata u podlozi, biljke iz oba tretmana (BU i RI) su pokazale pozitivan odgovor na fertilizaciju sa jednom dozom NPK u vidu značajno veće produkcije nadzemne biomase u obe godine gajenja, što je u saglasnosti sa istraživanjima Pogrzeba et al. (2018). Pokazalo se da fertilizacija dovodi do veće produkcije biomase kroz povećanje broja izdanaka i smanjenje oksidativnih oštećenja.

6. ZAKLJUČCI

U dvogodišnjem eksperimentu, *M. × giganteus* je pokazao izuzetnu sposobnost da raste na ekstremno nepovoljnim uslovima koji vladaju na odlagalištu flotacione jalovine, kao i da formira održivi biljni pokrivač bez posebnih meliorativnih mera, uz relativno nizak transfer metala u nadzemne organe. Biljke gajene na odlagalištu flotacione jalovine su zadržale najveći deo akumuliranih metala unutar korena i sprečile njihov dalji transport u nadzemne delove, a time i njihov negativni uticaj na biohemijske i fiziološke procese u listovima. Ograničen transport metala u nadzemne delove je od velikog značaja zbog relativno male verovatnoće njihovog ulaska u mrežu ishrane. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je *M. × giganteus* ekskluder za sve ispitivane elemente izuzev Pb, što ukazuje na potencijalnu primenu u fitostabilizaciji. Zahvaljujući višegodišnjem rastu, miskantus potencijalno može da ograniči translokaciju polutanata u životnu sredinu redukcijom (1) ispiranja polutanata iz zone korena i kontaminacije podzemnih voda, (2) oticanja polutanata i zagađenje površinskih vodotokova, (3) raznošenja finih čestica flotacione jalovine vetrom, (4) transfera polutanata u nadzemne delove i njihovog ulaska u mreže ishrane. Stoga, kao neprehrambeni usev, *M. × giganteus* predstavlja potencijalni resurs za fitomenadžment kontaminiranih zemljišnih površina, sa mogućnošću fitostabilizacije toksičnih metala u podlozi što predstavlja priliku za redukovanje rizika i za čoveka i za životnu sredinu.

Koncentracije većine ispitivanih elemenata iznad okvira vrednosti koje su toksične za najveći broj biljaka su indukovale vidljiva oštećenja listova u vidu hloroza i nekroza, najviše na starijim listovima, što ukazuje na akumulaciju oštećenja u ćelijama listova tokom vremena. Postojanje hloroza i nekroza je značajno smanjilo lisnu površinu uključenu u proces fotosinteze. Uprkos negativnim efektima povećanih koncentracija metala na razmenu gasova i smanjenje stomaterne provodljivosti, *M. × giganteus* je pokazao relativno visok fotosintetski kapacitet u prisustvu povišenih koncentracija ispitivanih elemenata, što ukazuje da je ova vrsta veoma tolerantna i sposobna da raste na ovako ekstremnim staništima. Povećane koncentracije metala u listu su dovele do smanjene stomaterne provodljivosti lista, povećanja oksidativnih oštećenja ćelijskih membrana i narušavanja procesa transfera energije u tilakoidima, što je kao rezultat imalo redukovanu fotosintetsku aktivnost i smanjeni rast biljaka. Fertilizacija jednom dozom mineralnog NPK đubriva je ublažila negativne efekte nedostatka fosfora na sadržaj hlorofila *a*, *Fv/Fm* i oksidativni stres, ali je pozitivan uticaj na fotosintetski kapacitet listova izostao. Na osnovu svih dobijenih rezultata, do ograničenja u rastu biljaka sa flotacione jalovine je došlo usled (1) nižeg fotosintetskog kapaciteta listova, (2) visokog nivoa oksidativnih oštećenja membrana i (3) visokog udela senescentnih listova, čime je značajno smanjena ukupna fotosintetska površina listova po biljci.

Biljni pokrivač na odlagalištu flotacione jalovine, formiran samo vrstom *M. × giganteus* ili u kombinaciji sa drugim biljnim vrstama tolerantnim na metale može ublažiti fluvijalnu i eolsku eroziju. Introdokcija *M. × giganteus* kao biljne vrste otporne na višestruki stres bi izazvala različite spore, ali pozitivne promene u površinskim slojevima odlagališta jalovine. Očekuje se da će dugoročno gajenje miskantusa, njegovo prisustvo i biološka aktivnost, kao i postepena akumulacija organske materije poreklom od uginulih delova korena i jednogodišnjih nadyemnih delova postepeno poboljšati hemijske, fizičke i biološke odlike površinskih slojeva podloge napuštenih odlagališta jalovine. Na ovaj način bi se povećala i vododržljivost i katjonski izmenjivački kapacitet podloge, heliranje metala u slabije dostupne frakcije, a time be se redukovali rizici za zagađenje okolnih staništa i zdravstveni rizici. Pored toga, razvoj stabilnog biljnog pokrivača bi omogućio razvoj zemljišnih mikroorganizama, obezbedio skrovište za životinje i estetski unapredio predeo.

I pored oštećenja izazvanih mineralnim stresom, *M. × giganteus* se pokazao pogodnim za bioremedijaciju zemljišnih površina koje su opterećene teškim metalima. Zahvaljujući iznošenju relativno malih količine metala u nadzemne delove može se koristiti za ekorestauraciju veoma zagađenih podloga uz istovremenu proizvodnju biomase sa višestrukou primenom. Može se zaključiti da je adaptivni potencijal *M. × giganteus* da produkuje stabilne prinose na zemljišnim površinama u blizini aktivnih i napuštenih rudnika najbitniji. Male količine teških metala u nadzemnoj biomasi

ukazuju na dobru perspektivu ove energetske biljke za gajenje na zemljišnim površinama u blizini rudnika kojima je potrebna fitoremedijacija. Predloženi pristup predstavlja ekonomski izvodljivu opciju za poboljšanje situacije u životnoj sredini kontaminiranoj metalima u blizini rudnika, kao i za proizvodnju biomase kao sirovine za različite namene.

7. LITERATURA

- Abedin MJ, Feldmann J, Meharg AA. 2002. Uptake kinetics of arsenic species in rice plants. *Plant Physiol.* 128(3):1120–28. Doi: 10.1104/pp.010733
- Adolph EF. 1956. General and specific characteristics of physiological adaptations. *Am J Physiol.* 184(1):18-28. DOI: 10.1152/ajplegacy.1955.184.1.18
- Adriano DC, Wenzel WW, Vangronsveld J, Bolan NS. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma.* 122:121-142. Doi: 10.1016/j.geoderma.2004.01.003
- Adriano DC. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risk of metals. New York: Springer-Verlag.
- Aggarwall A, Sharma I, Tripathi BN, Munjal AK, Baunthiyal M, Sharma V. 2012. Metal toxicity and photosynthesis. In: Itoh S, Mohanty P, Guruprasad KN, editors. *Photosynthesis: overviews on recent progress & future perspective*. IK International Publishing House, New Delhi. pp 229-236.
- Ahmad MS, Ashraf M, Tabassam Q, Hussain M, Firdous H. 2011. Lead (Pb)-induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. *Biol Trace Elem Res.* 144(1-3):1229-1239. DOI: 10.1007/s12011-011-9099-5.
- Akhter MF, Omelon CR, Gordon RA, Moser M, Macfie SM. 2014. Localization and chemical speciation of cadmium in the roots of barley and lettuce. *Environ Exp Bot.* 100:10-19. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.005
- Akopyan K, Petrosyan V, Grigoryan R, Melkomian DM. 2018. Assessment of residential soil contamination with arsenic and lead in mining and smelting towns of northern Armenia. *J Geochem Explor* 184:97–109. Doi: 10.1016/j.gexplo.2017.10.010
- Allen HE. 1993. The significance of trace metal speciation for water, sediment and soil quality criteria and standards. *Sci Total Environ.* 134(1):23–45. Doi: 10.1016/S0048-9697(05)80004-X
- Ammar WB, Nouairi I, Zarrouk M, Ghorbel MH, Jemal F. 2008. Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. *Biol Plantarum.* 52:727-731. Doi: 10.1007/s10535-008-0140-2
- Andrade AFM, Amaral Sobrinho NMB, Santos FS, Magalhães MOL, Tolón-Becerra A, Lima LS. 2014. EDTA-induced phytoextraction of lead and barium by brachiaria (*B. decumbens* cv. Basilisk) in soil contaminated by oil exploration drilling waste. *Acta Sci-Agron.* 36(4):495-500. Doi: 10.4025/actasciagron.v36i4.18172
- Andrade SAL, Gratão PL, Azevedo RA, Silveira APD, Schiavinato MA, Mazzafera P. 2010. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environ Exp Bot.* 68(2):98-207. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.11.009
- Andrejić G, Gajić G, Prica M, Dželetović Ž, Rakić T. 2018. Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll *a* fluorescence in Zn-stressed *Miscanthus* × *giganteus* plants. *Photosynthetica.* 56(4):1249-1258. Doi: 10.1007/s11099-018-0827-3
- Andresen E, Peiter E, Küpper H. 2018. Trace metal metabolism in plants. *J Exp Bot.* 69(5):909-954. Doi: 10.1093/jxb/erx465
- Antosiewicz DM. 2004. Study of calcium-dependent lead tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. *Environ Pollut.* 134(1):23-34. Doi: 10.1016/j.envpol.2004.07.019
- Arif N, Yadav V, Singh S, Singh S, Ahmad P, Mishra RK, Sharma S, Tripathi DK, Dubey NK, Chauhan DK. 2016. Influence of high and low levels of plant-beneficial heavy metal ions on plant growth and development. *Front Environ Sci.* 4:69. Doi: 10.3389/fenvs.2016.00069
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant physiology.* 24: 1-15. Doi: 10.1104/pp.24.1.1
- Audet P, Charest C. 2007. Heavy metal phytoremediation from a metaanalytical perspective. *Environ Pollut.* 147(1):231–237. Doi: 10.1016/j.envpol.2006.08.011
- Babalonas D, Karataglis S, Kabassakalis V. 1984. The ecology of plant populations growing on serpentine soils. *Phyton.* 24(2): 225–238.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.* 1:81-126.

- Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour Conserv Recy.* 11(1-4):41-49. Doi: 10.1016/0921-3449(94)90077-9
- Baker AJM. 1981. Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals. *J Plant Nutr.* 3:643-654. Doi: 10.1007/s12010-012-9657-0
- Baker AJM. 1987. Metal tolerance. *New Phytol.* 106:93-111. Doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb04685.x
- Barbosa B, Boléo S, Sidella S, Costa J, Duarte MP, Mendes B, Cosentino SL, Fernando AL. 2015a. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils using the perennial energy crops *Miscanthus* spp. and *Arundo donax* L. *Bioenerg Res.* 8(4):1500–1511. Doi: 10.1007/s12155-015-9688-9
- Barbosa B, Costa J, Fernando AL, Papazoglou EG. 2015b. Wastewater reuse for fiber crops cultivation as a strategy to mitigate desertification. *Ind Crop Prod.* 68:17–23. Doi: 10.1016/j.indcrop.2014.07.007
- Barbosa B, Fernando AL. 2018. Aided phytostabilization of mine waste. In: Prasad MNV, Favas PJC, Maiti SK, editors. *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. Elsevier Inc. p. 147-157
- Barcelo J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2(3):333-344.
- Bareen EF. 2012. Chelate assisted phytoextraction using oilseed brassicas. In: Anjum NA, Ahmad I, Pereira ME, Duarte AC, Umar S, Khan NA, editors. *The plant family Brassicaceae - contribution towards phytoremediation*. Springer Netherlands. p. 289-311.
- Bartlett RJ, Kimble JM. 1976. Behavior of chromium in soils: I. Trivalent forms. *J Environ Qual.* 5(4): 379-383. Doi: 10.2134/jeq1976.00472425000500040009x
- Bartlett RJ. 1986. Soil redox behavior. In: Sparks DJ, editor. *Soil physical chemistry*. CRC Press, Boca Raton, p. 179.
- Bazzaz FA, Carlson RW, Rolfe GL. 1974. The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in sunflower by Pb, Cd, Ni and Tl. *Environ Pollut.* 7(4):241-246. Doi: 10.1016/0013-9327(74)90032-9
- Beale CV, Long SP. 1997. Seasonal dynamics of nutrient accumulation and partitioning in the perennial C4-grasses *Miscanthus giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Biomass Bioenerg.* 12(6):419–428. Doi: 10.1016/S0961-9534(97)00016-0
- Beale CV, Morison JIL, Long SP. 1999. Water use efficiency of C-4 perennial grasses in a temperate climate. *Agr Forest Meteorol.* 96(1-3):103–115. Doi: 10.1016/S0168-1923(99)00042-8
- Belay A, Claassens A, Wehner F. 2002. Effect of direct nitrogen and potassium and residual phosphorus fertilizers on soil chemical properties, microbial components and maize yield under long-term crop rotation. *Biol Fertil Soils.* 35:420–427. Doi: 10.1007/s00374-002-0489-x
- Björkman O, Demmig B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta.* 170(4):489-504. Doi: 10.1007/BF00402983
- Boardman NK. 1975. Trace elements in photosynthesis. In: Nicholas PJD, Egan AR, editors. *Trace elements in soil-plant-animal systems*. Academic Press, New York p. 199-212.
- Bolan NS, Park JH, Robinson B, Naidu R, Huh KY. 2011. Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. In: Donald LS, editor. *Advances in agronomy*, vol. 112. Academic Press. p 145–204.
- Bollard EG. 1983. Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. In: Läuchli A, Bieleski RL, editors. *Encyclopedia of plant physiology, new series*, vol. 15B. SpringerVerlag, Berlin and New York. p. 695–755.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Bremner JM. 1996. Nitrogen-total. In: Sparks DL, editor. *Methods of soil analysis, Part 3. Chemical methods*. Soil Science Society of America -Book Series 5.3, Madison, p. 1085-1121.
- Bussler W. 1981. Microscopical possibilities for the diagnosis of trace element stress in plants. *Journal of plant nutrition.* 3(1-4):115-128. Doi: 10.1080/01904168109362822.
- Cakmak I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.* 146(2):185-205. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00630.x

- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *J Biol Inorg Chem.* 11:2-12. Doi: 10.1007/s00775-005-0056-7
- Carstensen A, Herdean A, Birkelund Schmidt S, Sharma A, Spetea C, Pribil M, Husted S. 2018. The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant Physiol.* 177(1):271-284. Doi: 10.1104/pp.17.01624
- Chaney RL, Li YM, Brown SL, Homer FA, Malik M, Angle JS, Baker AJM, Reeves RD, Chin M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Banuelos GS, Terry N, editors. *Proceedings of the Symposium on phytoremediation, 4th International conference on the biogeochemistry of trace elements.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p. 129–158.
- Clayton WD, Vorontsova MS, Harman KT, Williamson H. 2006 onwards. *GrassBase—The Online World Grass Flora.* [accessed 08 Februar 2019; 15:30 GMT] <http://www.kew.org/data/grasses-db.html>.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie.* 88(11):1707-1719. Doi: 10.1016/j.biochi.2006.07.003.
- Clifton-Brown JC, Breuer J, Jones MB. 2007. Carbon mitigation by the energy crop, *Miscanthus*. *Global Change Biol.* 13(11):2296–2307. Doi: 10.1111/j.1365-2486.2007.01438.x
- Colzi I, Doumett S, Del Bubba M, Fornaini J, Arnetoli M, Gabbrielli R, Gonnelli C. 2011. On the role of the cell wall in the phenomenon of copper tolerance in *Silene paradoxa* L. *Environ Exp Bot.* 72(1):77-83. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.02.006
- Confalonieri R, Jones B, Van Diepen K, Van Orshoven J. 2014. Scientific contribution on combining biophysical criteria underpinning the delineation of agricultural areas affected by specific constraints. In: Terres JM, Hagyo A, Wania A, editors. *JRC science and policy reports, EUR-26940 EN, Luxembourg, 2014, Publications Office of the European Union.* 81 p.
- Cooke SJ, Suski CD. 2008. Ecological restoration and physiology: an overdue integration. *BioScience.* 58(10):957-968. Doi: 10.1641/B581009
- Costa J, Barbosa B, Fernando AL. 2016. Wastewaters reuse for energy crops cultivation. In: Camarinha-Matos LM, Falcão AJ, Vafaei N, Najdi S, editors. *Technological innovation for cyber-physical systems, IFIP advances in information and communication technology, vol. 470.* Switzerland, 2016, Springer International Publishing, pp 507–514.
- Crane RA, Sinnott DE, Cleall PJ, Sapsford DJ. 2017. Physicochemical composition of wastes and co-located environmental designations at legacy mine sites in the south west of England and Wales: implications for their resource potential. *Resour Conserv Recy.* 123:117–134. Doi: 10.1016/j.resconrec.2016.08.009
- Crowley DE, Wang YC, Reid CPP, Szaniszló PJ. 1991. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant Soil.* 130(1-2):179-198. Doi: 10.1007/BF00011873
- Čurlík L, Forgač J. 1996. Acid sulfate weathering and its impact on soil acidification and pollution in area of Banská Stavnica. *Proc Soil Fertility Res Inst Bratislava.* 21:103.
- Cuyppers A, Hendrix S, Amaral Dos Reis R, De Smet S, Deckers J, Gielen H, Jozefczak M, Loix C, Vercampt H, Vangronsveld J, Keunen E. 2016. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Front Plant Sci.* 25:7:470. Doi: 10.3389/fpls.2016.00470.
- Czarnecki S, Düring RA. 2015. Influence of long-term mineral fertilization on metal contents and properties of soil samples taken from different locations in Hesse, Germany. *Soil,* 1:23-33. Doi: 10.5194/soil-1-23-2015
- Dahmani-Muller M, Van Oort HF, Gelie B, Balabane M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ Pollut.* 109(2):231-238. Doi: 10.1016/S0269-7491(99)00262-6
- Dale VH, Kline KL, Buford MA, Volk TA, Smith CT, Stupak I. 2016. Incorporating bioenergy into sustainable landscape designs. *Renew Sust Energy Rev.* 56:1158–1171. Doi: 10.1016/j.rser.2015.12.038
- Dalenberg JW, van Driel W. 1990. Contribution of atmospheric deposition to heavy metal concentration in field crops. *Neth J Agr Sci.* 38:369-379. Doi: 10.18174/njas.v38i3A.16594

- Davies BE. 1995. Lead. In: Alloway BJ, editor. Heavy metals in soils. Blackie Acad., London. p. 206–223.
- Diez T, Rosopulo A. 1976. Schwermetallgehalte in Boden und Pflanzen nach extrem hohen Klarschlammgaben, Sonderdruck Landwirt Forsch. 33:236.
- Dohleman FG, Heaton EA, Leakey ADB, Long SP. 2009a. Does greater leaf-level photosynthesis explain the larger solar energy conversion efficiency of *Miscanthus* relative to switchgrass? Plant Cell Environ. 32(11):1525–1537. Doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02017.x
- Dohleman FG. 2009b. Seasonal dynamics of productivity and photosynthesis of three biofuel feedstocks: Field comparisons of *Miscanthus giganteus*, *Panicum virgatum* and *Zea mays*. University of Illinois, USA.
- Duo L, Gao Y, Zhao S. 2005. Heavy metal accumulation and ecological responses of turfgrass to rubbish compost with EDTA addition. J Integr Plant Biol. 47(9):1047-1054. Doi: 10.1111/j.1744-7909.2005.00135.x
- Džamić R, Stevanović D, Jakovljević M. 1996. Određivanje ukupnog azota u zemljištu semimikro-Kjeldahl-ovom metodom – modifikacija po Bremneru – 1960. Praktikum iz agrohemije. Poljoprivredni fakultet Beograd – Zemun, Univerzitet u Beogradu. pp. 31-33.
- Dželetović Ž, Andrejić G, Mihailović N. 2015. Potencijal marginalnih zemljišnih površina u Srbiji za gajenje travnih bioenergetskih useva druge generacije. Univerzitet u Beogradu, Institut za primenu nuklearne energije, Beograd, Srbija.
- Dželetović Ž, Mihailović N, Glamočlija Đ, Dražić G. 2011. Morfološke osobine vrste *Miscanthus × giganteus* u fazi nicanja. U: XVI savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem (zbornik radova, 4-5. mart 2011, Čačak), 153–158, Agronomski fakultet, Čačak.
- Dželetović Ž. 2010. Uticaj azota i gustine zasada na morfološke osobine i prinos biomase vrste *Miscanthus × giganteus* Greef et Deu [doktorska disertacija]. Poljoprivredni fakultet, Zemun, 122 str.
- Egner H, Riehm H, Domingo WR. 1960. Untersuchungen über die chemische bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Boden. II. Chemische Extraktionsmethoden zu Phosphor – und Kaliumbestimmung kungl. Lantbrukshögsk. Ann. 26:204-209.
- Eskew DL, Welch RM, Cary EE 1983. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possible all higher plants. Science. 222:621–623. Doi: 10.1126/science.222.4624.621.
- Ettler V. 2016. Soil contamination near non-ferrous metal smelters: A review. Appl Geochem 64:56-74. Doi: 10.1016/j.apgeochem.2015.09.020
- Evangelou MWH, Conesa HM, Robinson BH, Schulin R. 2012. Biomass production on trace element-contaminated land: a review. Environ Eng Sci. 29(8):823-839. Doi: 10.1089/ees.2011.0428
- FAO (Food and Agriculture Organization). 1983. Guidelines: land evaluation for rainfed agriculture. Soils bulletin No 52. pp. 237. FAO, Rome.
- FAO, ITPS, 2015. Status of the World's Soil Resources (SWSR) – main report. Food and agriculture organization of the United Nations and intergovernmental technical panel on soils, Rome, Italy 650.
- Fernando AL, Boléo S, Barbosa B, Costa J, Duarte MP, Monti A. 2015. Perennial grass production opportunities on marginal mediterranean land. Bioenerg Res. 8:1523–1537. Doi: 10.1007/s12155-015-9692-0
- Fernando AL, Costa J, Barbosa B, Monti A, Rettenmaier N. 2018. Environmental impact assessment of perennial crops cultivation on marginal soils in the mediterranean region. Biomass Bioenergy. 111:174-186. Doi: 10.1016/j.biombioe.2017.04.005
- Fitz WJ, Wenzel WW. 2002. Arsenic transformation in the soil-rhizosphere-plant system: fundamentals and potential application of phytoremediation. J Biotechnol. 99(3):259–78. Doi: 10.1016/S0168-1656(02)00218-3
- Flechas FW, Latady M. 2003. Regulatory evaluation and acceptance issues for phytotechnology projects. In: Tsao DT, editor. Phytoremediation. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Vol 78. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 171-185.
- Foyer C, Spencer C. 1986. The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. Planta 167(3):369–375. Doi: 10.1007/BF00391341
- Fraústro da Silva JJR, Williams RJP. 2001. The biological chemistry of the elements, 2nd ed., Oxford University Press, New York.

- Frei M. 2013. Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J.* 14;2013:436517. Doi: 10.1155/2013/436517
- Frydenvang J, van Maarschalkerweerd M, Carstensen A, Mundus S, Schmidt SB, Pedas PR, Laursen KH, Schjoerring JK, Husted S. 2015. Sensitive detection of phosphorus deficiency in plants using chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Physiol.* 169(1):353–361. Doi: 10.1104/pp.15.00823
- Gajić GM, Pavlović PŽ. 2018. The role of vascular plants in the phytoremediation of fly ash deposits. In: Matichenkov V. *Phytoremediation: methods, management and assessment.* Nova Science Publishers, Inc. p. 151-236
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppa MD, Benavides MP. 2012. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ Exp Bot.* 83:33-46. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.006
- Gee A, Domingues LP, Deitz VR. 1954. Determination of inorganic constituents in sucrose solutions. *Anal Chem.* 26(9): 1487-1491. Doi: 10.1021/ac60093a024
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92. Doi: 10.1016/S0304-4165(89)80016-9
- Gibbs HK, Salmon JM. 2015. Mapping the world's degraded lands. *Appl Geogr.* 57:12–21. Doi: 10.1016/j.apgeog.2014.11.024
- Gichner T, Žnidar I, Száková J. 2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 652(2):186-190. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.02.009
- Ginocchio R, León-Lobos PL, Arellano EC, Anic V, Ovalle JF, Baker AJM. 2017. Soil physicochemical factors as environmental filters for spontaneous plant colonization of abandoned tailings dumps. *Environ Sci Pollut R.* 24:13484-13496. Doi: 10.1007/s11356-017-8894-8
- Glass DJ. 1999. *U.S. and International markets for phytoremediation, 1999–2000.* Needham, MA: D. Glass Assoc.
- Godo GH, Reisenauer HM. 1980. Plant effects on soil manganese availability. *Soil Sci Soc Am J.* 44(5):993-995. Doi: 10.2136/sssaj1980.03615995004400050024x
- Gough LP, Shacklette HT, Case AA. 1979. Element concentrations toxic to plants, animals, and man, U.S. Geol Surv Bull. 1466, 80.
- Gratão PL, Monteiro CC, Tezotto T, Carvalho RF, Alves LR, Peters LP, Azevedo RA. 2015. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals.* 28(5):803-816. Doi: 10.1007/s10534-015-9867-3
- Gratão PL, Prasad MNV, Cardoso PF, Lea PJ, Azevedo RA. 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz J Plant Physiol.* 17(1):53-64. Doi: 10.1590/S1677-04202005000100005
- Greef JM, Deuter M. 1993. Syntaxonomy of *Miscanthus* × *giganteus* Greef et Deu. *Angew Bot.* 67:87–90.
- Guidi L, Degl'Innocenti E. 2011. Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: a tool to study abiotic stress in plants. In: Shanker A, editor. *Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations.* In Tech Europe. p. 1-20.
- Guo H, Hong C, Chen X, Xu Y, Liu Y, Jiang D, Zheng B. 2016. Different growth and physiological responses to cadmium of the three miscanthus species. *PLoS One.* 11(4):e0153475. Doi: 10.1371/journal.pone.0153475
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot.* 53:1-11. Doi: 10.1093/jexbot/53.366.1
- Halstead RL, Finn BJ, MacLean AJ. 1969. Extractability of nickel added to soils and its concentration in plants. *Can J Soil Sci.* 49(3):335-342. Doi: 10.4141/cjss69-046
- Hanc A, Szakova J, Svehla P. 2012. Effect of composting on the mobility of arsenic, chromium and nickel contained in kitchen and garden waste. *Bioresour Technol.* 126:444-452. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.053
- Haydon MJ, Cobbett CS. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* 174(3):499-506. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02051.x

- He Z, Yang X, Stoffella P. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Bio.* 19(2-3):125-140. Doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.010.
- Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 125:189-198.
- Heaton EA, Dohleman FG, Fernando Miguez A, Juvik JA, Lozovaya V, Widholm J, Zabortina OA, McIsaac GF, David MB, Voigt TB, Boersma NN, Long SP. 2010. Miscanthus: a promising biomass crop. *Adv Bot Res.* 56:75-137. Doi: 10.1016/B978-0-12-381518-7.00003-0
- Heber U, Viil J, Neimanis S, Mimura T, Dietz KJ. 1989. Photoinhibitory damage to chloroplasts under phosphate deficiency and alleviation of deficiency and damage by photorespiratory reactions. *Zeitschrift für Naturforschung.* 44(5-6):524–536. Doi: 10.1515/znc-1989-5-629
- Hill KA, Lion LW, Ahner BA. 2002. Reduced Cd accumulation in *Zea mays*: a protective role for phytosiderophores. *Envir Sci Tech.* 36(24):5363-5368. Doi: 10.1021/es020695z
- Himken M, Lammel J, Neukirchen D, Czypionka-Krause U, Olf HW. 1997. Cultivation of *Miscanthus* under West European conditions: Seasonal changes in dry matter production, nutrient uptake and remobilization. *Plant Soil.* 189:117–126. Doi: 10.1023/A:1004244614537
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta.* 207:604-611.
- Hodkinson TR, Chase MW, Lledo MD, Salamin N, Renvoize SA. 2002a. Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *J Plant Res.* 115:381–392. Doi: 0.1007/s10265-002-0049-3
- Hodkinson TR, Chase MW, Renvoize SA. 2002b. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. *Ann Bot.* 89(5):627-636. Doi: 10.1093/aob/mcf091
- Hughes MK, Lepp NW, Phipps DA. 1980. Aerial heavy metal pollution and terrestrial ecosystems. *Adv Ecol Res.* 11:217-327. Doi: 10.1016/S0065-2504(08)60268-8
- Hutchinson TC. 1979. Copper contamination of ecosystem caused by smelter activities. In: Nriagu JO, editor. *Copper in the Environment. Part I: Ecological Cycling.* Wiley, New York. p. 451-502
- Isermann K. 1977. A method to reduce contamination and uptake of lead by plants from car exhaust gases. *Environ Pollut.* 12(3):199-203. Doi: 10.1016/0013-9327(77)90053-2
- Islam E, Liu D, Li T, Yang X, Jin X, Mahmood Q, Tian S, Li J. 2008. Effects of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsoltzia argyi*. *J Hazard Mater.* 154(1-3):914-926. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.10.121.
- ISO 10390/1994 Soil quality – determination of pH.
- IUSS Working Group WRB. 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome
- Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M. 2009. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Bot Rev.* 75:339-364. Doi: 10.1007/s12229-009-9036-x
- Jackson ML. 1959. Soil chemical analysis. Verlag: Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ. 1958, 498 S. DM 39.40. *Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.*, 85: 251-252. Doi: 10.1002/jpln.19590850311
- Jenkins BM, Baxter LL, Miles TR. 1998. Combustion properties of biomass. *Fuel Process Technol.* 54(1-3):17-46. Doi: 10.1016/S0378-3820(97)00059-3
- Jiang W, Liu D. 2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biol.* 10:40. Doi: 10.1186/1471-2229-10-40.
- Jiang Y, Lei M, Duan L, Longhurst P. 2015. Integrating phytoremediation with biomass valorisation and critical element recovery: A UK contaminated land perspective. *Biomass Bioenerg.* 83:328-339. Doi: 10.1016/j.biombioe.2015.10.013
- Johnstone TC, Nolan EM. 2015. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Trans* 44(14):6320-6339. Doi:10.1039/c4dt03559c

- Jones JB Jr, Case VW. 1990. Sampling, handling and analyzing plant tissue samples. U: Soil testing and plant analysis, 3. izdanje (RL Westernman, ed.). Soil Science Society of America Inc - Book series No. 3, Madison, Wisconsin, pp 389-427.
- Kabala C, Wilk J. 2004. Sequential extraction of iron and zinc in soils irrigated with municipal wastewater. *Ann Nat Inst Hygiene Suppl.* 55:133–141 (in Polish).
- Kabata-Pendias A, Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Kabata-Pendias A, Wiacek K. 1985. Excessive uptake of heavy metals by plants from contaminated soil. *Soil Science Annals.* 36(4):33-42.
- Kabata-Pendias A. 2011. Trace elements in soils and plants. 4th ed. Boca Raton: CRC Press.
- Kabata-Pendias A, Sadurski W. 2004. Trace elements and compounds in soil. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M, editors. *Elements and Their Compounds in the Environment 2.* Wiley-VCH, Weinheim. p. 79-99.
- Kastratović V, Krivokapić S, Đurović D, Blagojević N. 2013. Seasonal changes in metal accumulation and distribution in the organs of *Phragmites australis* (common reed) from Lake Skadar, Montenegro. *J Serb Chem Soc.* 78(8):1241-1258. Doi: 10.2298/JSC121026153K
- Kenneth K, Pallett KE, Young AJ (2000) Carotenoids. In: Ruth GA, Hess JL, editors. *Antioxidants in Higher Plants.* CRC Press, Boca Raton
- Kim IS, Kang KH, Johnson-Green P, Lee EJ. 2003. Investigation of heavy metal accumulation in *Polygonum thunbergii* for phytoextraction. *Environ Pollut.* 126(2):235-243. Doi: 10.1016/s0269-7491(03)00190-8
- Kitagishi K, Yamane H. 1981. Heavy metal pollution in soils of Japan. CRC Press, Tokyo, 19-26.
- Kloke A, Sauerbeck DR, Vetter H. 1984. The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains. In: Nriagu JO, editor. *Changing Metal Cycles and Human Health.* Dahlem, Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin. p. 113-141.
- Kocoń A, Jurga B. 2017. The evaluation of growth and phytoextraction potential of *Miscanthus × giganteus* and *Sida hermaphrodita* on soil contaminated simultaneously with Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Environ Sci Pollut Res.* 24:4990-5000. Doi: 10.1007/s11356-016-8241-5
- Kołodziej B, Stachyra M, Antonkiewicz J, Bielińska E, Wiśniewski J. 2016. The effect of harvest frequency on yielding and quality of energy raw material of reed canary grass grown on municipal sewage sludge. *Biomass Bioenergy* 85:363–370. Doi: 10.1016/j.biombioe.2015.12.025
- Korzeniowska J, Stanisławska-Głubiak E. 2015. Phytoremediation potential of *Miscanthus × giganteus* and *Spartina pectinata* in soil contaminated with heavy metals. *Environ Sci Pollut Res* 22:11648-11657. Doi: 10.1007/s11356-015-4439-1
- Kozdrój J, Piotrowska-Seget Z, Krupa P. 2007. Mycorrhizal fungi and ectomycorrhiza associated bacteria isolated from an industrial desert soil protect pine seedlings against Cd(II) impact. *Ecotoxicology* 16:449–456 (2007). Doi: 10.1007/s10646-007-0149-x
- Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE. 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi species*. *Plant Physiol.* 122:1343–1354. Doi: 10.1104/pp.122.4.1343
- Krämer U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61:517-534. Doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156
- Kumpiene J, Lagerkvist A, Naurice C. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendements - a review. *Waste Manag.* 28(1):215-225. Doi: 10.1016/j.wasman.2006.12.012.
- Küpper H, Andresen E. 2016. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics.* 8:269-285. Doi: 10.1039/c5mt00244c
- Küpper H, Šetlík I, Šetlíková E, Ferimazova N, Spiller M, Küpper FC. 2003. Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Funct Plant Biol.* 30(12):1187-1196. Doi: 10.1071/FP03129
- Küpper H, Zhao F, McGrath SP. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 119(1):305-312. Doi: 10.1104/pp.119.1.305
- Lafferty J, Lelley T. 1994. Cytogenetic studies of different *Miscanthus* species with potential for agricultural use. *Plant Breeding.* 113(3):246-249. Doi: 10.1111/j.1439-0523.1994.tb00730.x

- Lage-Pinto F, Oliveira JG, Da Cunha M, Souza CMM, Rezende CE, Azevedo RA, Vitória AP. 2008. Chlorophyll *a* fluorescence and ultrastructural changes in chloroplast of water hyacinth as indicators of environmental stress. *Environ Exp Bot.* 64(3):307-313. Doi: 10.1016/j.envexpbot.2008.07.007
- Lange W. 1992. Die Extraktstoffe von Riesengras (*Miscanthus sinensis* Anderss.). Ein Vergleich der sommergrünen und der wintertrockenen Pflanze. *Holzforschung.* 46:277–282.
- Lazár D, Jablonský J. 2009. On the approaches applied in formulation of a kinetic model of photosystem II: different approaches lead to different simulations of the chlorophyll *a* fluorescence transients. *J Theor Biol.* 257(2):260-269. Doi:10.1016/j.jtbi.2008.11.018
- Lewandowski I, Clifton-Brown JC, Scurlock JMO, Huisman W. 2000. Miscanthus: European experience with a novel energy crop. *Biomass Bioenerg.* 19:209-227. Doi: 10.1016/S0961-9534(00)00032-5
- Lewandowski I, Kicherer A. 1997. Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus giganteus*. *Eur J Agron.* 6(3-4):163-177. Doi: 10.1016/S1161-0301(96)02044-8
- Li GY, Hu N, Ding DX, Zheng JF, Liu YL, Wang YD, Nie XQ. 2011. Screening of plant species for phytoremediation of uranium, thorium, barium, nickel, strontium and lead contaminated soils from a uranium mill tailings repository in South China. *Bull Environ Contam Toxicol.* 86: 646-652.
- Liang HM, Lin TH, Chiou JM, Yeh KC. 2009. Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and nonhyperaccumulators. *Environ Pollut.* 157(6):1945-1952. Doi: 10.1016/j.envpol.2008.11.052
- Lindsay WL. 1972. Zinc in soils and plant nutrition. *Adv Agron.* 24:147-186. Doi: 10.1016/S0065-2113(08)60635-5
- Loneragan JF, Grunes DL, Welch RM, Aduayi EA, Tengah A, Lazar VA, Cary EE 1982. Phosphorus accumulation and toxicity in leaves in relation to zinc supply. *Soil Sci Soc Am J.* 46(2):345-352. Doi: 10.2136/sssaj1982.03615995004600020027x
- Long SP. 1999. Environmental responses. In: Sage RF, Monson RK, editors. *C4 Plant Biology.* Academic Press, London. p. 215-249.
- Lösch R, Köhl KI. 1999. Plant respiration under the influence of heavy metals. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, editors. *Heavy metal stress in plants.* Springer, Berlin, Heidelberg. p. 139-156. Doi: 10.1007/978-3-662-07745-0_7
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ. 2011. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot.* 62(1):21-37. Doi: 10.1093/jxb/erq281
- Macnicol RD, Beckett PHT. 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant Soil.* 85:107-129. Doi: 10.1007/BF02197805
- Magdoff F, Lanyon L, Liebhardt B. 1997. Nutrient cycling, transformations, and flows: implications for a more sustainable agriculture. *Advances in Agronomy* 60:1-73. Doi: 10.1016/S0065-2113(08)60600-8
- Malone G, Koeppe DE, Miller RJ. 1974. Localization of lead accumulated by corn plants. *Plant Physiol.* 53:388-394. Doi: 10.1104/pp.53.3.388
- Manikandan R, Ezhili N, Venkatachalam P. 2016. Phosphorus supplementation alleviation of the cadmium-induced toxicity by modulating oxidative stress mechanisms in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty]. *J Environ Eng.* 142(9):C4016003. Doi: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001112
- Mantineo M, D'Agosta GM, Copani V, Patane C, Cosentino SL. 2009. Biomass yield and energy balance of three perennial crops for energy use in the semi-arid Mediterranean environment. *Field Crop Res.* 114(2):204-213. Doi: 10.1016/j.fcr.2009.07.020
- Markert B. 1992. Presence and significance of naturally occurring chemical elements of the periodic system in the plant organism and consequences for future investigations on inorganic environmental chemistry in ecosystems. *Vegetatio.* 103(1):1-30.
- Marschner H. 1986. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, London.
- Marschner H. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed. Academic Press, London
- Maxwell K., Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot.* 345, 659-668.

- McBride MB, Blasiak JJ. 1976. Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil. *Soil Sci Soc Am J.* 43(5):866-870. Doi: 10.2136/sssaj1979.03615995004300050009x
- Mei B, Puryear JD, Newton RJ. 2002. Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. *Plant Soil*, 247: 223-231. Doi: 10.1023/A:1021509115343
- Memon AR, Schröder P. 2006. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res Int.* 16:162-175. Doi: 10.1007/s11356-008-0079-z.
- Mendez MO, Maier RM. 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 7:47–59. Doi: 10.1007/s11157-007-9125-4
- Meyers DER, Auchterlonie GJ, Webb RI, Wood B. 2008. Uptake and localization of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environ Pollut.* 153(2):323-332. Doi: 10.1016/j.envpol.2007.08.029
- Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P, Lemaire SD. 2013. Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci.* 4:470. Doi: 10.3389/fpls.2013.00470
- Miller RJ, Koeppe DE. 1971. Accumulation and physiological effects of lead in corn. In: *Proceedings of University of Missouri, Columbia* 4, pp. 186-193
- Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV. 2013. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *J Exp Bot.* 64(1): 369-381. Doi: 10.1093/jxb/ers315
- Mirza N, Pervez A, Mahmood Q, Shah M, Shafqat M. 2011. Ecological restoration of arsenic contaminated soil by *Arundo donax* L. *Ecol Eng.* 37(12):1949–1956. Doi: 10.1016/j.ecoleng.2011.07.006
- Monti A, Zatta A. 2009. Root distribution and soil moisture retrieval in perennial and annual energy crops in Northern Italy. *Agr Ecosyst Environ.* 132(3-4):252–259. Doi: 10.1016/j.agee.2009.04.007
- Morsch VM, Schetinger MRC, Martins AF, Rocha JBT. 2002. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on α -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. *Biologia Plantarum* 45:85-89. DOI: 10.1023/A:1015196423320.
- Negri MC, Gatliff EG, Quinn JJ, Hinchman RR. 2003. Root development and rooting at depths. In: McCutcheon SC, Schnoor JL, editors. *Phytoremediation: transformation and control of contaminants*. New York: Wiley. p. 233–62.
- Neukirchen D, Himken M, Lammel J, Czipionka Krause U, Olf HW. 1999. Spatial and temporal distribution of the root system and root nutrient content of an established *Miscanthus* crop. *Eur J Agron.* 11(3-4):301–309.
- Newman LA, Reynolds CM. 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Curr Opin Biotech.* 15:225-230. Doi: 10.1016/j.copbio.2004.04.006
- Nriagu JO. 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature* 279:409-411. Doi: 10.1038/279409a0
- Nsanganwimana F, Pourrut B, Mench M, Douay F. 2014. Suitability of *Miscanthus* species for managing inorganic and organic contaminated land and restoring ecosystem services. A review. *J Environ Manage.* 143:123-134. Doi: 10.1016/j.jenvman.2014.04.027
- Nsanganwimana F, Pourrut B, Waterlot C, Louvel B, Bidar G, Labidi S, Fontaine J, Muchembled J, Sahraoui ALH, Fourrier H, Douay F. 2015. Metal accumulation and shoot yield of *Miscanthus* \times *giganteus* growing in contaminated agricultural soils: Insights into agronomic practices. *Agric Ecosyst Environ.* 213:61-71. Doi: 10.1016/j.agee.2015.07.023
- Nsanganwimana F, Waterlot C, Louvel B, Pourrut B, Douay F. 2016. Metal, nutrient and biomass accumulation during the growth cycle of *Miscanthus* established on metal-contaminated soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* 179(2):257-269. Doi: 10.1002/jpln.201500163
- Nurzhanova A, Pidlisnyuk V, Abit K, Nurzhanov C, Kenessov B, Stefanovska T, Erickson L. 2019. Comparative assessment of using *Miscanthus* \times *giganteus* for remediation of soils contaminated by heavy metals: a case of military and mining sites. *Environ Sci Pollut Res.* 26:13320-13333. Doi: 10.1007/s11356-019-04707-z
- Nwoko CO. 2010. Trends in phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Afr J Biotechnol.* 9:6010-6016. Doi: 10.5897/AJB09.061

- Opdenakker K, Remans T, Keunen E, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Mitogen-activated protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci.* 13(6):7828-7853. Doi: 10.3390/ijms13067828
- Ozanne PG, Greenwood EAN, Shaw TC. 1963. The cobalt requirement of subterranean clover in the field. *Aust J Agric Res.* 14:39-50. Doi: 10.1071/AR9630039
- Padmavathiamma PK, Li LY. 2007. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. *Water Air Soil Poll.* 184:105-126. Doi: 10.1007/s11270-007-9401-5
- Palit S, Sharma A, Talukder G. 1994. Effects of cobalt on plants. *Bot Rev.* 60:149-181. Doi: 10.1007/BF02856575
- Pansu M, Gautheyrou J. 2006. *Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods.* Springer Science & Business Media.
- Peganova S, Eder K. 2004. Zinc. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M, editors. *Elements and their compounds in the environment*, 2nd edn. Wiley-VCH, Weinheim. p. 1203–1239. Doi: 10.1002/9783527619634.ch50
- Peuke AD, Rennenberg H. 2005. Phytoremediation. *EMBO Rep.* 6(6):497-501. Doi: 10.1038/sj.embor.7400445
- Pidlisnyuk V, Erickson L, Trögl, J, Shapoval PY, Popelka J, Davis LC, Stefanovska T, Hettiarachchi GM. 2018. Metals uptake behaviour in *Miscanthus × giganteus* plant during growth at the contaminated soil from the military site in Sliač, Slovakia. *Pol J Chem Tech.* 20(2):1-7. Doi: 10.2478/pjct-2018-0016
- Pidlisnyuk V, Stefanovska T, Lewis EE, Erickson LE, Davis LC. 2014. *Miscanthus* as a productive biofuel crop for phytoremediation. *Crit Rev Plant Sci.* 33(1):1-19. Doi: 10.1080/07352689.2014.847616
- Pidlisnyuk V, Trögl J, Stefanovska T, Shapoval P, Erickson L. 2016. Preliminary results on growing second generation biofuel crop *Miscanthus × giganteus* at the polluted military site in Ukraine. *Nova Biotechnologica et Chimica* 15 (1): 77-84. Doi: 10.1515/nbec-2016-0008
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol.* 56:15-39. Doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214
- Pogrzeba M, Rusinowski S, Krzyżak J. 2018. Macroelements and heavy metals content in energy crops cultivated on contaminated soil under different fertilization - case studies on autumn harvest. *Environ Sci Pollut Res.* 25:12096-12106. Doi: 10.1007/s11356-018-1490-8
- Ponizovsky AA, Thakali S, Allen HE, Di Toro DM, Ackerman AJ. 2006. Effect of soil properties on copper release in soil solutions at low moisture content. *Environ Toxicol Chem.* 25(3):671–682. Doi: 10.1897/04-621R.1
- Porter GS, Bajita-Locke JB, Hue NV, Strand D. 2004. Manganese solubility and phytotoxicity affected by soil moisture, oxygen levels, and green manure additions. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 35(1-2):99-116. Doi: 10.1081/CSS-120027637
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E. 2011. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam T.* 213:113-136. Doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6_4
- Prasad DDK, Prasad ARK. 1987. Altered δ - aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Bajra (*Pennisetum typhoides*). *J Plant Physiol.* 127(3-4):241-249. Doi: 10.1016/S0176-1617(87)80143-8
- Prasad MNV, Strzalka K. 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, editors. *Heavy metal stress in plants.* Springer, Berlin, Heidelberg. p. 117-138. Doi: 10.1007/978-3-662-07745-0_6
- Prasad MNV. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ Exp Bot.* 35(4):525–545. Doi: 10.1016/0098-8472(95)00024-0
- Prasad MNV. 2006a. Plants that accumulate and/or exclude toxic trace elements play an important role in phytoremediation. In: Prasad MNV, Sajwan KS, Naidu R, editors. *Trace elements in the Environment (Biogeochemistry, Biotechnology and Bioremediation).* Boca Raton: CRC, Taylor & Francis. p. 523-548
- Prasad MNV. 2006b. Stabilization, remediation, and integrated management of metal-contaminated ecosystems by grasses (Poaceae). In: Prasad MNV, Sajwan KS, Naidu R, editors. *Trace elements in*

- the Environment (Biogeochemistry, Biotechnology and Bioremediation). Boca Raton: CRC, Taylor & Francis. p. 405-424.
- Prasad MNV. 2015. Bioremediation and bioeconomy. 1st edition. Elsevier Inc.
- Prica M, Andrejić G, Šinžar-Sekulić J, Rakić T, Dželetović Ž. 2019. 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. Doi: 10.2298/BOTSERB1901085PA
- Rabêlo FHS, Azevedo RA, Monteiro FA. 2017. Proper supply of S increases GSH synthesis in the establishment and reduces tiller mortality during the regrowth of Tanzania guinea grass used for Cd phytoextraction. *J Soils Sediments*. 17(5):1427-1436. Doi: 10.1007/s11368-016-1429-y
- Randelović D. 2015. Geobotanička i biogeoheimijska karakterizacija rudničke otkrivke u Boru i mogućnost primene rezultata u remedijaciji (disertacija). Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Rao IM, Terry N. 1989. Leaf phosphate status, photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet: 1. Changes in growth, gas exchange, and Calvin cycle enzymes. *Plant Physiol*. 90(3):814-819. Doi: 10.1104/pp.90.3.814
- Raskin I, Kumar PBAN, Dushenkov S, Salt DE. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr Opin Biotech*. 5(3):285-290. Doi: 10.1016/0958-1669(94)90030-2
- Raskin I, Smith RD, Salt DE. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr Opin Biotech*. 8(2):221-226. Doi: 10.1016/S0958-1669(97)80106-1
- Rauser WE. 1981. Entry of sucrose into minor veins of bean seedlings exposed to phytotoxic burdens of Co, Ni or Zn. *J Plant Nutr*. 3(1-4):319-328. Doi: 10.1080/01904168109362840
- Rayburn AL, Crawford J, Rayburn CM, Juvik JA. 2009. Genome size of three *Miscanthus* species. *Plant Mol Biol Rep*. 27(2):184-188. Doi: 10.1007/s11105-008-0070-3
- Reck BK, Müller DB, Rostkowski K, Graedel TE. 2008. Anthropogenic nickel cycle: insights into use, trade, and recycling. *Environ Sci Technol*. 42(9):3394-3400. Doi: 10.1021/es072108l
- Reeves RD, Baker AJM, Borhidi A, Berazain R. 1999. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Annals of Botany* 83(1):29-38. Doi: 10.1006/anbo.1998.0786
- RHMZ. 2019. Republički hidrometeorološki zavod. http://www.hidmet.gov.rs/ciril/meteorologija/klimatologija_godisnjaci.php 13.06.2019.
- Riche AB, Christian DG 2001. Estimates of rhizome weight of *Miscanthus* with time and rooting depth compared to switchgrass. *Biomass and Energy Crops II. Aspects of Applied Biology* 65 . p. 147-152
- Ricklefs RE, Wikelski M. 2002. The physiology-life history nexus. *Trends Ecol Evol*. 17(10):462-468.
- Rocha ACS, Almeida CMR, Basto MCP, Vasconcelos MTSD. 2014. Antioxidant response of *Phragmites australis* to Cu and Cd contamination. *Ecotoxicol Environ Saf*. 109:152-160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.027>
- Rodríguez-Celma J, Rellán-Álvarez R, Abadía A, Abadía J, López-Millán A. 2010. Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato plants. *J Proteomics*. 73(9):1694-1706. Doi: 10.1016/j.jprot.2010.05.001
- Ruby MV, Schoof R, Brattin W, Goldade M, Post G, Harnois M, Mosby DE, Casteel SW, Berti W, Carpenter M, Edwards D, Cragin D, Chappell W. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environ Sci Technol*. 33(21):3697-3705. Doi: 10.1021/es990479z
- Rüdel H, Wenzel A, Terytze K. 2001. Quantification of soluble chromium (VI) in soils and evaluation of ecotoxicological effects. *Environ Geochem Hlth*. 23:219-224. Doi: 10.1023/A:1012253504440
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nat Biotechnol*. 13:468-474. Doi: 10.1038/nbt0595-468
- Scally L, Hodkinson TR, Jones MB. 2001. Origins and taxonomy of *Miscanthus*. In: Jones MB, Walsh M, editors. *Miscanthus for energy and fibre*. James & James, London. p. 1-10.
- Scabba F, Arduini I, Ercoli L, Sebastiani L. 2006. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities on *Miscanthus sinensis*. *Biol Plant* 50(4):688-692. Doi: 10.1007/s10535-006-0107-0
- Schalk IJ, Hannauer M, Braud A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ Microbiol*. 13(11):2844-2854. Doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x

- Schmohl N, Pilling J, Fisahn J, Horst WJ. 2000. Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiol Plant*. 109(4):419-427. Doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.100408.x
- Science Communication Unit. 2013. Science for Environment Policy In-depth Report: Soil Contamination: Impacts on Human Health. Report produced for the European Commission DG Environment. Available at: <http://ec.europa.eu/scienceenvironment-policy>.
- Seregin I, Kozhevnikova A, Gracheva V, Bystrova E, Ivanov V. 2011. Tissue zinc distribution in maize seedling roots and its action on growth. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(1): 109-117. Doi: 10.1134/S1021443711010171
- Seregin IV, Shpigun LK, Ivanov VB. 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ J Plant Physiol* 51:525-533. Doi: 10.1023/B:RUPP.0000035747.42399.84
- Seth CS. 2012. A review on mechanisms of plant tolerance and role of transgenic plants in environmental clean-up. *Bot Rev*. 78:32-62. Doi: 10.1007/s12229-011-9092-x
- Shanker AK, Pathmanabhan G. 2004. Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr(III) and Cr(VI) stress. *Plant Soil*. 265:141-151. Doi: 10.1007/s11104-005-0332-x
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol*. 17:1-19. Doi: 10.1590/s1677-04202005000100004
- Shen Y, Nagaraj DR, Farinato R, Somasundaran P. 2016. Study of xanthate decomposition in aqueous solutions. *Minerals Engineering* 93:10-15. Doi: 10.1016/j.mineng.2016.04.004
- Sheoran V, Sheoran AS, Poonia P. 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Crit Rev Env Sci Tec*. 41:168-214. Doi: 10.1080/10643380902718418
- Shibagaki N, Rose A, McDermott JP, Fujiwara T, Hayashi H, Yoneyama T, Davies JP. 2002. Selenate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify Sultr1;2, a sulfate transporter required for efficient transport of sulfate into roots. *Plant J*. 29(4):475-486. Doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01232.x
- Shkolnik MJ. 1974. Microelements in plant life. Nauka, Leningrad.
- Shotyk W, Le Roux G, 2005. Biogeochemistry and cycling of lead. *Met Ions Biol Syst*. 43:239-275. Doi: 10.1201/9780824751999.ch10
- Siedlecka A, Krupa Z. 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Bioch*. 34, 833-841.
- Simancas B, Munné-Bosch S. 2015. Interplay between vitamin E and phosphorus availability in the control of longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*. 116(4):511-518. Doi: 10.1093/aob/mcv033
- Singh SK, Reddy VR, Fleisher DH, Timlin DJ. 2017. Relationship between photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in soybean under varying phosphorus nutrition at ambient and elevated CO₂. *Photosynthetica* 55:421-433. Doi: 10.1007/s11099-016-0657-0
- Skinner WM, Martin RR, Naftel SJ, et al. 2005. Multi-technique studies of the distribution of metals between the soil, rhizosphere and roots of *Populus tremuloides* growing in forest soil. *ICOBTE, 8 Int. Conf. Book Abstr.* 488–489, Adelaide.
- Službeni glasnik Republike Srbije, 30/18.
- Smolders E, Degryse F. 2006. Fixation of cadmium and zinc in soils: implication for risk assessment. In: Hamon R, McLaughlin M, Lombi E, editors. *Natural attenuation of trace element availability in soils*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL. p. 157–171
- Souza LA, Camargos LS, Carvalho MAE. 2018. Toxic metal phytoremediation using high biomass non-hyperaccumulator crops: new possibilities for bioenergy resources. In: Matichenkov V, editor. *Phytoremediation: methods, management and assessment*. Nova Science Publishers, Inc. p:1-25.
- Souza LA, de Andrade SAL, de Souza SCR, Schiavinato MA. 2011. Arbuscular mycorrhiza confers pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiol Plant*. 34:523-31. Doi: 10.1007/s11738-011-0849-y
- Stewart JR, Toma Y, Fernández FG, Nishiwaki A, Yamada T, Bollero GA. 2009. The ecology and agronomy of *Miscanthus sinensis*, a species important to bioenergy crop development, in its native range in Japan: a review. *GCB Bioenergy*. 1(2):126-153. Doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01010.x

- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. 2004. Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Govindjee PG, editor. Advances in photosynthesis and respiration. Chlorophyll *a* fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht, p. 321-362
- Suresh B, Ravishankar GA. 2004. Phytoremediation - a novel and promising approach for environmental clean-up. Crit rev biotechnol. 24(2-3):97-124. Doi: 10.1080/07388550490493627
- Taiz L, Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer.
- Tinker PB. 1981. Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants, Phil Trans R Soc Lond B. 294:41-55. Doi: 10.1098/rstb.1981.0088
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG. 2004. Vacuolar compartmentalization: a second - generation approach to engineering plants for phytoremediation. Trends Plant Sci. 9(1):7-9. Doi: 10.1016/j.tplants.2003.11.009
- Touceda-González M, Álvarez-López V, Prieto-Fernández Á, Rodríguez-Garrido B, Trasar-Cepeda C, Mench M, Puschenreiter M, Quintela-Sabarís C, Macías-García F, Kidd PS. 2017. Aided phytostabilisation reduces metal toxicity, improves soil fertility and enhances microbial activity in Cu-rich mine tailings. J Environ Manage. 186(2):301-313. Doi: 10.1016/j.jenvman.2016.09.019.
- Tyurin IV. 1965. Agrochemical methods of soil analysis. Nauka, Moscow.
- Van Goor BJ, Wiersma D. 1976. Chemical form of manganese and zinc in phloem exudates. Physiol. Plant. 36(2):213-216. Doi: 10.1111/j.1399-3054.1976.tb03938.x
- Vassilev A, Nikolova A, Koleva L, Lidon F. 2011. Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. J. Phytol. 3(6):58-62.
- Verma S, Dubey RS. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci. 164(4):645-655. Doi: 10.1016/S0168-9452(03)00022-0
- Vernay P, Gauthier-Moussard C, Jean L, Bordas F, Faure O, Ledoigt G, Hitmi A. 2008. Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. Chemosphere. 72(5):763-771. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.03.018
- Vig K, Megharaj M, Sethunathan N, Naidu R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. Adv Environ Res. 8(1):121-135. Doi: 10.1016/S1093-0191(02)00135-1
- Violante A, Cozzolino V, Perelomonov L, Caporale AG, Pigna M. 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloides in soil environments. J Soil Sci Plant Nut. 10(3):268-292. Doi: 10.4067/S0718-95162010000100005
- Wanat N, Austruy A, Joussein E, Soubrand M, Hitmi A, Gauthier-Moussard C, Lenain JF, Vernay P, Munch JC, Pichon M. 2013. Potentials of *Miscanthus* × *giganteus* grown on highly contaminated technosols. J Geochem Explor. 126-127:78-84. Doi: 10.1016/j.gexplo.2013.01.001
- Wang D, Naidu SL, Portis AR, Moose SP, Long SP. 2008a. Can the cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus giganteus* relative to *Zea mays* be explained by differences in activities and thermal properties of Rubisco? J Exp Bot. 59(7):1779-1787. Doi: 10.1093/jxb/ern074
- Wang DF, Portis AR, Moose SP, Long SP. 2008b. Cool C4 photosynthesis: pyruvate Pi dikinase expression and activity corresponds to the exceptional cold tolerance of carbon assimilation in *Miscanthus* × *giganteus*. Plant Physiol. 148(1):557-567. Doi: 10.1104/pp.108.120709
- Welch RM, Cary EE. 1975. Concentration of chromium, nickel, and vanadium in plant materials. J Agr Food Chem. 23(3):479-482. Doi: 10.1021/jf60199a017
- Wellburn AR. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution. J Plant Physiol. 144: 307-313. Doi: 10.1016/S0176-1617(11)81192-2
- Whiting SN, Reeves RD, Baker AJM. 2002. Conserving biodiversity: mining, metallophytes and land reclamation. Mining Environmental Management 10:11-16.
- Wiersma D, Van Goor BJ. 1979. Chemical forms of nickel and cobalt in phloem of *Ricinus communis*. Physiol Plant. 45(4):440-442.
- Wierzbicka M. 1987. Lead accumulation and its translocation in roots of *Allium cepa* L. - autoradiographic and ultrastructural studies. Plant Cell Environ. 10(1):17-26. Doi: 10.1111/j.1365-3040.1987.tb02075.x

- Wińska-Krysiak M, Koropacka K, Gawroński S. 2015. Determination of the tolerance of sunflower to lead-induced stress. *J Elem* 20(2):491–502. Doi: 10.5601/jelem.2014.19.4.721
- Wu C, Wang Z, Sun H, Guo S. 2006. Effects of different concentrations of nitrogen and phosphorus on chlorophyll biosynthesis, chlorophyll *a* fluorescence, and photosynthesis in *Larix olgensis* seedlings. *Front Forest China*. 1(2):170–175. Doi: 10.1007/s11461-006-0019-3
- Wu X, Hong F, Liu C, Mingyu S, Zheng L, Gao F, Yang F. 2008. Effects of Pb²⁺ on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast. *Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*. 69(3):738–742. Doi: 10.1016/j.saa.2007.05.047
- Wuana RA, Okieimen FE. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network*. Article ID: 402647. Doi: 10.5402/2011/402647
- Xu HX, Weng XY, Yang Y. 2007. Effect of phosphorus deficiency on the photosynthetic characteristics of rice plants. *Russ J Plant Physiol*. 54(6):741–748. Doi: 10.1134/S1021443707060040
- Yang W, Ding Z, Zhao F, Wang Y, Zhang X, Zhu Z, Yang X. 2015. Comparison of manganese tolerance and accumulation among 24 *Salix* clones in a hydroponic experiment: application for phytoremediation. *J Geochem Explor*. 149:1-7. Doi: 10.1016/j.gexplo.2014.09.007
- Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol*. 18(4):339-353. Doi: 10.1016/j.jtemb.2005.02.007.
- Yang Y, Han X, Liang Y, Ghosh A, Chen J, Tang M. 2015. The combined effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and lead (Pb) stress on Pb accumulation, plant growth parameters, photosynthesis, and antioxidant enzymes in *Robinia pseudoacacia* L. *PLoS One*. 10(12):e0145726. Doi: 10.1371/journal.pone.0145726
- Yao Z, Li J, Xie H, Yu C. 2012. Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environ Sci*. 16:722-729. Doi: 10.1016/j.proenv.2012.10.099
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci Total Environ*. 368(2-3):456-464. Doi:10.1016/j.scitotenv.2006.01.016
- Zayed A, Lytle CM, Qian JH, Terry N. 1998. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*. 206:239-299. Doi: 10.1007/s004250050403
- Zhang K, Liu H, Tao P, Chen H. 2014. Comparative proteomic analyses provide new insights into low phosphorus stress responses in maize leaves. *PLoS One* 9(5):e98215. Doi: 10.1371/journal.pone.0098215
- Zheng SJ, Ma JF, Matsumoto H. 1998. High aluminium resistance in buckwheat. I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol*. 117(3):745-751. Doi: 10.1104/pp.117.3.745
- Zhou J, Yhang Z, Zhang Y, Wei Y, Jiang Z. 2018. Effects of lead stress on the growth, physiology, and cellular structure of privet seedlings. *PloS One*. 13(3):e0191139. Dio: 10.1371/journal.pone.0191139
- Zimdahl RL. 1976. Entry and movement in vegetation of lead derived from air and soil sources. *J Air Pollut Control Assoc*. 26(7):655-660. Doi: 10.1080/00022470.1976.10470298

8. PRILOZI

Prilog 1. Spirmanov koeficijent korelacije (ρ) ispitivanih hemijskih elemenata, parametara fotosinteze i fluorescencije hlorofila *a* sa biohemijskim parametrima za prvu godinu gajenja.

	MDA	DPPH	Cha	CHb	a+b	a/b	TC
Pb	0,113	-0,298	-0,026	-0,062	-0,038	-0,048	-0,001
Zn	-0,733	-0,107	-0,788	-0,668	-0,781	0,581	-0,731
Cu	-0,110	-0,577	-0,496	-0,503	-0,503	0,274	-0,544
Fe	-0,239	0,085	-0,275	-0,099	-0,232	0,025	-0,167
Mn	-0,514	-0,315	-0,724	-0,699	-0,730	0,675	-0,816
Ni	-0,624	-0,151	-0,795	-0,689	-0,788	0,599	-0,768
Cr	0,329	0,055	0,661	0,491	0,615	-0,277	0,602
Co	0,383	-0,162	0,585	0,613	0,614	-0,331	0,503
Cd	-0,562	0,016	-0,686	-0,570	-0,677	0,403	-0,550
N	0,737	-0,026	0,612	0,527	0,623	-0,504	0,500
P	0,575	0,122	0,415	0,387	0,424	-0,340	0,394
K	-0,361	0,071	-0,534	-0,444	-0,517	0,422	-0,514
A2000	0,702	0,103	0,172	0,152	0,198	-0,395	0,191
A0	-0,120	0,548	0,176	0,294	0,183	-0,261	0,328
E	-0,158	0,027	-0,180	-0,239	-0,208	0,212	-0,218
Gs	0,037	0,047	-0,093	-0,155	-0,108	0,076	-0,038
Fo	0,454	0,199	0,099	0,073	0,112	-0,315	0,191
Fm	0,738	0,104	0,153	0,213	0,200	-0,487	0,187
Fv	0,698	0,012	0,173	0,255	0,225	-0,474	0,157
Fv/Fm	0,218	-0,297	0,046	0,157	0,086	-0,188	-0,040
Φ_{PSII}	0,617	0,254	0,646	0,605	0,645	-0,428	0,664
qP	-0,301	0,105	-0,011	0,116	-0,011	0,076	0,036
ETR	0,563	0,186	0,531	0,513	0,541	-0,347	0,598
NPQ	-0,661	-0,389	-0,515	-0,530	-0,539	0,484	-0,578
MDA	1,000	0,176	0,600	0,557	0,630	-0,612	0,648
DPPH	0,176	1,000	0,207	0,336	0,240	-0,479	0,414
Cha	0,600	0,207	1,000	0,891	0,989	-0,598	0,901
CHb	0,557	0,336	0,891	1,000	0,943	-0,808	0,908
a+b	0,630	0,240	0,989	0,943	1,000	-0,679	0,923
a/b	-0,612	-0,479	-0,598	-0,808	-0,679	1,000	-0,740
TC	0,648	0,414	0,901	0,908	0,923	-0,740	1,000
Za:	<i>p</i> <0,05;	<i>p</i> <0,01;	<i>p</i> <0,001				

Prilog 2. Spirmanov koeficijent korelacije (ρ) ispitivanih hemijskih elemenata, parametara fotosinteze i fluorescencije hlorofila *a* sa biohemijskim parametrima za drugu godinu gajenja.

	MDA	TAK	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a+b</i>	Chl <i>a/b</i>	Carrot
Pb	-0,327	0,254	-0,273	-0,266	-0,257	-0,115	-0,006
Zn	-0,294	-0,089	-0,163	-0,201	-0,163	0,261	-0,110
Cu	0,102	-0,016	-0,141	-0,290	-0,196	0,113	-0,595
Fe	-0,508	0,199	-0,419	-0,569	-0,467	0,245	-0,257
Mn	-0,139	0,037	0,074	-0,251	-0,028	0,212	-0,259
Ni	-0,481	-0,258	-0,412	-0,369	-0,397	0,188	-0,263
Cr	0,385	0,243	-0,137	0,140	-0,048	-0,422	0,012
Co	0,433	-0,203	0,271	0,311	0,294	0,140	-0,011
Cd	-0,329	-0,538	0,002	-0,019	-0,003	0,403	0,093
N	0,530	-0,241	0,600	0,621	0,605	-0,050	0,190
P	-0,185	-0,691	0,197	0,113	0,163	0,497	-0,020
K	0,690	-0,084	0,493	0,730	0,580	-0,455	0,541
A2000	0,735	0,043	0,523	0,756	0,613	-0,493	0,419
A0	-0,286	0,125	-0,351	-0,169	-0,330	-0,181	-0,030
E	0,215	0,199	0,348	0,207	0,331	0,073	0,121
Gs	0,383	0,177	0,465	0,522	0,517	-0,260	0,368
Fo	0,441	-0,385	0,432	0,513	0,452	0,017	0,275
Fm	0,556	-0,281	0,466	0,659	0,516	-0,203	0,418
Fv	0,576	-0,221	0,471	0,679	0,523	-0,270	0,454
Fv/Fm	0,437	0,205	0,186	0,500	0,267	-0,504	0,437
Φ_{PSII}	0,671	-0,191	0,621	0,700	0,668	-0,150	0,347
qP	0,604	-0,294	0,789	0,728	0,771	0,040	0,395
ETR	0,700	-0,180	0,613	0,635	0,635	-0,133	0,281
NPQ	-0,727	-0,324	-0,339	-0,578	-0,437	0,509	-0,393
MDA	1,000	0,210	0,441	0,649	0,523	-0,530	0,426
TAK	0,210	1,000	-0,165	-0,030	-0,131	-0,443	0,185
Chl <i>a</i>	0,441	-0,165	1,000	0,856	0,983	0,069	0,695
Chl <i>b</i>	0,649	-0,030	0,856	1,000	0,924	-0,347	0,838
Chl <i>a+b</i>	0,523	-0,131	0,983	0,924	1,000	-0,076	0,757
Chl <i>a/b</i>	-0,530	-0,443	0,069	-0,347	-0,076	1,000	-0,401
Carrot	0,426	0,185	0,695	0,838	0,757	-0,401	1,000
Za:	<i>p</i> <0,05;	<i>p</i> <0,01;	<i>p</i> <0,001				

Prilog 3. Spirmanov koeficijent korelacije (ρ) ispitivanih hemijskih elemenata i parametara fotosinteze i fluorescencije hlorofila *a* za prvu godinu gajenja.

	A2000	A0	E	Gs	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Φ_{PSII}	qP	ETR	NPQ
Pb	-0,355	-0,288	-0,469	-0,669	0,409	0,167	0,104	-0,180	-0,331	-0,163	-0,306	0,260
Zn	-0,604	-0,253	-0,216	-0,471	-0,056	-0,246	-0,223	-0,154	-0,623	0,167	-0,550	0,476
Cu	-0,221	-0,564	-0,297	-0,499	0,273	0,213	0,214	0,059	-0,518	-0,196	-0,457	0,425
Fe	-0,473	-0,258	-0,612	-0,722	0,307	-0,044	-0,056	-0,275	-0,376	0,173	-0,295	0,244
Mn	0,050	-0,073	0,523	0,254	-0,349	-0,097	-0,044	0,187	-0,313	0,041	-0,256	0,182
Ni	0,050	0,116	0,327	0,416	-0,380	-0,264	-0,173	0,139	-0,153	0,198	-0,096	0,160
Cr	-0,178	0,063	-0,036	-0,156	0,157	0,020	-0,063	-0,137	0,045	-0,158	-0,027	-0,150
Co	-0,272	-0,259	-0,468	-0,477	0,120	0,056	0,080	0,100	0,029	-0,025	-0,009	-0,075
Cd	-0,490	0,030	-0,040	-0,141	-0,172	-0,334	-0,309	-0,147	-0,578	0,316	-0,506	0,547
N	0,672	-0,018	0,181	0,217	0,223	0,619	0,639	0,400	0,653	-0,448	0,611	-0,617
P	0,664	0,303	0,504	0,687	0,011	0,397	0,379	0,363	0,677	-0,087	0,612	-0,718
K	0,119	0,065	0,422	0,125	-0,086	0,096	0,054	-0,009	-0,036	-0,059	0,029	-0,151
A2000	1,000	-0,059	0,262	0,462	0,398	0,685	0,609	0,190	0,542	-0,287	0,521	-0,603
A0	-0,059	1,000	0,239	0,317	-0,328	-0,273	-0,273	-0,052	0,328	0,281	0,311	-0,240
E	0,262	0,239	1,000	0,627	-0,349	-0,031	-0,038	0,260	0,025	-0,019	-0,050	-0,114
Gs	0,462	0,317	0,627	1,000	-0,229	-0,028	-0,070	0,159	0,332	-0,029	0,361	-0,351
Fo	0,398	-0,328	-0,349	-0,229	1,000	0,602	0,390	-0,482	0,094	-0,238	0,162	-0,274
Fm	0,685	-0,273	-0,031	-0,028	0,602	1,000	0,936	0,271	0,302	-0,427	0,291	-0,460
Fv	0,609	-0,273	-0,038	-0,070	0,390	0,936	1,000	0,526	0,275	-0,377	0,248	-0,367
Fv/Fm	0,190	-0,052	0,260	0,159	-0,482	0,271	0,526	1,000	0,113	-0,137	0,045	-0,057
Φ_{PSII}	0,542	0,328	0,025	0,332	0,094	0,302	0,275	0,113	1,000	0,091	0,950	-0,820
qP	-0,287	0,281	-0,019	-0,029	-0,238	-0,427	-0,377	-0,137	0,091	1,000	0,062	0,143
ETR	0,521	0,311	-0,050	0,361	0,162	0,291	0,248	0,045	0,950	0,062	1,000	-0,777
NPQ	-0,603	-0,240	-0,114	-0,351	-0,274	-0,460	-0,367	-0,057	-0,820	0,143	-0,777	1,000

Za: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$

Prilog 4. Spirmanov koeficijent korelacije (ρ) ispitivanih hemijskih elemenata i parametara fotosinteze i fluorescencije hlorofila *a* za drugu godinu gajenja.

	A2000	A0	E	Gs	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm	Φ_{PSII}	qP	ETR	NPQ
Pb	-0,637	0,184	-0,093	-0,318	-0,556	-0,573	-0,521	-0,136	-0,560	-0,555	-0,563	0,223
Zn	-0,574	0,173	0,091	-0,458	-0,209	-0,403	-0,437	-0,302	-0,331	-0,358	-0,385	0,179
Cu	-0,350	-0,086	0,046	-0,224	-0,251	-0,391	-0,345	-0,266	-0,258	-0,202	-0,250	0,080
Fe	-0,788	0,170	-0,048	-0,372	-0,630	-0,751	-0,719	-0,330	-0,667	-0,653	-0,684	0,342
Mn	-0,515	0,096	-0,156	-0,244	-0,224	-0,409	-0,393	-0,435	-0,352	-0,256	-0,282	0,243
Ni	0,215	-0,002	-0,392	0,243	0,117	0,200	0,193	0,052	-0,072	-0,092	-0,052	0,256
Cr	-0,067	0,058	-0,399	0,002	0,106	0,003	0,021	0,014	-0,111	-0,200	-0,172	-0,130
Co	0,022	-0,253	0,194	-0,129	0,395	0,025	-0,037	-0,294	0,081	0,187	0,010	-0,110
Cd	-0,648	0,112	-0,130	-0,557	0,029	-0,118	-0,160	-0,150	-0,356	-0,182	-0,428	0,375
N	0,646	-0,234	0,097	0,293	0,564	0,741	0,738	0,387	0,730	0,755	0,743	-0,457
P	-0,256	0,131	-0,233	-0,241	0,280	0,216	0,171	-0,020	0,106	0,185	0,088	0,170
K	0,151	-0,002	-0,130	-0,011	0,544	0,466	0,440	0,161	0,284	0,373	0,244	-0,240
A2000	1,000	-0,261	0,170	0,706	0,496	0,588	0,588	0,289	0,756	0,657	0,709	-0,614
A0	-0,261	1,000	-0,391	-0,229	-0,174	-0,042	0,008	0,249	-0,298	-0,274	-0,264	0,155
E	0,170	-0,391	1,000	0,213	-0,213	-0,294	-0,309	-0,133	0,238	0,174	0,207	-0,338
Gs	0,706	-0,229	0,213	1,000	0,203	0,237	0,262	0,108	0,496	0,366	0,464	-0,509
Fo	0,496	-0,174	-0,213	0,203	1,000	0,764	0,665	-0,066	0,450	0,633	0,446	-0,173
Fm	0,588	-0,042	-0,294	0,237	0,764	1,000	0,983	0,520	0,577	0,689	0,586	-0,349
Fv	0,588	0,008	-0,309	0,262	0,665	0,983	1,000	0,616	0,580	0,652	0,592	-0,398
Fv/Fm	0,289	0,249	-0,133	0,108	-0,066	0,520	0,616	1,000	0,322	0,229	0,354	-0,390
Φ_{PSII}	0,756	-0,298	0,238	0,496	0,450	0,577	0,580	0,322	1,000	0,696	0,951	-0,727
qP	0,657	-0,274	0,174	0,366	0,633	0,689	0,652	0,229	0,696	1,000	0,698	-0,323
ETR	0,709	-0,264	0,207	0,464	0,446	0,586	0,592	0,354	0,951	0,698	1,000	-0,622
NPQ	-0,614	0,155	-0,338	-0,509	-0,173	-0,349	-0,398	-0,390	-0,727	-0,323	-0,622	1,000
Za:	<i>p</i> <0,05;	<i>p</i> <0,01;	<i>p</i> <0,001									

Biografija autora

Gordana Z. Andrejić je rođena 18.06.1988. godine u Beogradu gde je završila osnovnu školu i srednju Zubotehničku školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Ekologija je upisala 2007. godine. Osnovne akademske studije je završila 2011. godine sa prosečnom ocenom 7,81, a master studije je završila 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,23. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu je upisala 2013. godine, smer Ekologija, studijski program Ekologija biljaka i fitogeografija. Zvanje istraživač saradnik stiče 17.07.2017. godine.

U Institutu za primenu nuklearne energije (INEP) je kao stručni saradnik učestvovala u izradi tri projekta Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprava za poljoprivredno zemljište, pod nazivom: „Zaštita, uređenje i održivo korišćenje poljoprivrednog zemljišta na teritoriji Republike Srbije gajenjem bioenergetske trave *Miscanthus × giganteus*“ (od jula do decembra 2014. godine); „Potencijal marginalnih zemljišnih površina u Srbiji za gajenje travnih bioenergetskih useva druge generacije“ (od avgusta do oktobra 2015. godine); i „Korišćenje marginalnih zemljišnih površina za gajenje višegodišnje bioenergetske trave *Miscanthus × giganteus*“ (od septembra do oktobra 2016. godine)

Od januara 2018. godine je učesnik projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz programa osnovnih istraživanja pod nazivom: „Biodiverzitet biljnog sveta Srbije i Balkanskog poluostrva - procena, održivo korišćenje i zaštita“ (OI173030). Zaposlena je u Institutu za primenu nuklearne energije kao istraživač saradnik u Odeljenju za radioekologiju i agrohemiju. Autor ili koautor je 11 naučnih radova u međunarodnim časopisima, 10 saopštenja na skupovima od međunarodnog, kao i 9 od nacionalnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Гордана З. Андрејић _____

Број индекса _____ Е3001/2013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање фиторемедијационог и адаптивног потенцијала *Miscanthus × giganteus* (Poaceae) гајеног на одлагалишту флотационе јаловине на планини Рудник

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Гордана З. Андрејић _____

Број индекса _____ Е3001/2013 _____

Студијски програм _____ Екологија; Екологија биљака и фитогеографија _____

Наслов рада Испитивање фиторемедијационог и адаптивног потенцијала *Miscanthus × giganteus* (Poaceae) гајеног на одлагалишту флотационе јаловине на планини Рудник

Ментор _____ др Тамара Ракић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним станицама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање фиторемедијационог и адаптивног потенцијала *Miscanthus × giganteus* (Роасае) гајеног на одлагалишту флотационе јаловине на планини Рудник

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.