

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Milijana Ž. Kovačević

**Adaptabilnost i fitoremedijacioni potencijal  
vrste *Phragmites australis* (Poaceae) sa  
odlagališta jalovine rudnika metala**

doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Milijana Ž. Kovačević

**Adaptability and phytoremediation potential  
of *Phragmites australis* (Poaceae) from mine  
and flotation tailings ponds**

Doctoral Dissertation

Beograd, 2023

Komisija za odbranu doktorske disertacije

Mentor:

---

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

Članovi komisije:

---

dr Gordana Andrejić, naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu,  
Institut za primenu nuklearne energije

---

dr Ksenija Jakovljević, viši naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu,  
Biološki fakultet

---

dr Živko Jovanović, viši naučni saradnik,  
Pharm-Olam International, Beograd

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ***Izjave zahvalnosti***

*Ekperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u laboratorijama Katedre za ekologiju i geografiju biljaka Instituta za botaniku i botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Odeljenja za radioekologiju i agrohemiju Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu. Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije br. 173030 – "Biodiverzitet biljnog sveta Srbije i Balkanskog poluostrva – procena, održivo korišćenje i zaštita."*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Tamari Rakić za bezrezervnu pomoć i podršku tokom pisanja disertacije. Hvala na svim korisnim savetima, razumevanju, poverenju i vremenu posvećenom izradi ove disertacije. Neizmerno sam zahvalna jer sam na ovom putu imala mentora koji je bio oslonac na svakom koraku, a istovremeno podržavao moju samostalnost u naučnom radu.*

*Veliko hvala dr Kseniji Jakovljević, višem naučnom saradniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za sve korisne savete, sugestije i komentare koji su značajno doprineli poboljšanju kvaliteta ove disertacije.*

*Dr Živku Jovanoviću, višem naučnom saradniku, posebno se zahvaljujem na prenesenom znanju o metodama koje su veoma važan deo ove disertacije.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Gordani Andrejić od koje sam mnogo naučila o laboratorijskom radu, metodama i organizaciji. Goca je sada već moj prijatelj na koga mogu da se oslonim i čiji mi komentari i sugestije često izmame osmeh, uz koji se svi izazovi lako prevaziđu.*

*Hvala dr Željku Dželetoviću, višem naučnom saradniku Instituta za primenu nuklearne energije Univerziteta u Beogradu, na stručnim savetima, ali i velikoj pomoći tokom terenskog rada. Takođe, hvala i na onome: „Samo polako i bez panike!“, koje mi je ponekad delovalo suviše.*

*Veliko hvala dr Ivani Vukašinović, asistentu sa doktoratom Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, za veliku pomoć pri detekciji metala u biljkama SEM-EDS metodom.*

*Hvala svim profesorima i kolegama sa Katerde za ekologiju i geografiju biljaka koji su bili podrška na ovom putu i čije razumevanje mi je veoma značilo. Zahvalna sam na prilici da budem član ove Katedre.*

*Hvala mojoj porodici i prijateljima koji su bili podrška tokom čitavog procesa i imali razumevanja za mene u svim trenucima. Hvala i na poverenju koje su mi ukazali.*

*Ogromno hvala mom suprugu Miljanu koji je moja najveća podrška i mom sinu Bogdanu sa kojim je sve dobilo veći smisao. Hvala na bezrezervnoj ljubavi. Ovu disertaciju posvećujem vama.*



## **Adaptabilnost i fitoremedijacioni potencijal vrste *Phragmites australis* (Poaceae) sa odlagališta jalovine rudnika metala**

### **Sažetak**

Jalovina koja nastaje tokom procesa obrade rude sadrži visoke koncentracije potencijalno toksičnih elemenata (PTE) koji lako mogu dospeti u nezagađene ekosisteme erozijom vodom ili vetrom, a kasnije i putem lanaca ishrane na više trofičke nivoe gde ispoljavaju brojne negativne efekte na sve organizme. *Phragmites australis* je vrsta koja se spontano javlja u plitkim vodama rudničkih/flotacionih odlagališta jalovine i odličan je kandidat za ispitivanje fitoremedijacionog potencijala kao i mehanizama koji joj omogućavaju opstanak u ekstremnim edafskim uslovima. Analizom hemijskih osobina biljaka sa odlagališta jalovine pokazan je visok stepen akumulacije metala na nivou korena, a histoheмиjskom lokalizacijom je potvrđena imobilizacija metala u ćelijskom zidu/vakuoli biljnih ćelija, što je jedan od mehanizama tolerancije povišenih koncentracija PTE u biljkama. Analiza bioheмиjskog odgovora pokazala je da povišene koncentracije PTE imaju snažan uticaj na antioksidativni sistem biljaka. Pri veoma visokim koncentracijama metala u korenu biljaka najčešće dolazi do inhibicije aktivnosti enzima, dok niže koncentracije metala, kao one u listovima, mogu uticati na porast aktivnosti enzima. Osim inhibicije aktivnosti enzima, veoma visoke koncentracije metala dovode i do pada ukupnog antioksidativnog kapaciteta, kao i do povećanog stepena lipidne peroksidacije membrana, što ukazuje na to da mehanizmi odbrane biljaka nisu dovoljni na potpuno neutrališu njihove toksične efekte. Ipak, *P. australis* je pokazala visok potencijal za fitostabilizaciju podloga bogatih metalima, a potencijalno i za rizofiltraciju otpadnih voda poreklom iz rudnika.

**Ključne reči:** *Phragmites australis*, potencijalno toksični elementi, antioksidativni enzimi, fitostabilizacija, odlagališta jalovine rudnika

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Ekologija, biogeografija i zaštita životne sredine

## **Adaptability and phytoremediation potential of *Phragmites australis* (Poaceae) from mine and flotation tailings ponds**

### **Abstract**

The tailings resulting from ore processing contain high concentrations of potentially toxic elements (PTEs) that can easily enter unpolluted ecosystems through water or wind erosion and later through the food chain to higher trophic levels, where they have numerous negative effects on all organisms. *Phragmites australis* is a wetland species that occurs spontaneously in the shallow waters of mine/flotation tailings and is an excellent candidate for investigation of its phytoremediation potential and the mechanisms that allow it to survive under extreme edaphic conditions. Analysis of the chemical properties of the plant material showed a high level of metal accumulation in the plant roots, and histochemical localization confirmed the immobilization of metals in the plant cell wall/vacuole, which is one of the tolerance mechanisms to elevated concentrations of PTE. The biochemical response analysis showed the strong effects of elevated metal concentrations on the antioxidant system of plants. At very high metal concentrations in plant roots, enzyme activities are usually inhibited, whereas lower metal concentrations, e.g. in leaves, often lead to increased enzyme activities. High concentrations PTE also lead to a decrease in overall antioxidant capacity as well as increased levels of lipid peroxidation of membranes, suggesting that plant defense mechanisms are insufficient to fully neutralize toxic effects. Nevertheless, *P. australis* showed high potential for phytostabilization of metal-rich substrates and possibly for rhizofiltration of mining wastewater.

**Key words:** *Phragmites australis*, potentially toxic elements, antioxidant enzymes, phytostabilization, mine tailings

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Ecology, biogeography and environmental protection

## Lista skraćenica:

AF	Akumulacioni faktor
APX	Askorbat peroksidaza
ASC	Askorbat
BAF	Bioakumulacioni faktor
BCF	Biokoncentracioni faktor
BHT	Dibutilhidroksitoluen
BSA	Goveđi serumski albimin
CAT	Katalaza
Chl ( <i>a/b</i> )	Odnos hlorofila <i>a</i> i <i>b</i>
Chl ( <i>a+b</i> )	Ukupni hlorofili
DHA	Dehidroaskorbat
DHAR	Dehidroaskorbat reduktaza
DMSO	Dimetilsulfoksid
DPPH	2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil)-hidrazil
EDTA	Etlendiamintetrasirćetna kiselina
GPX	Glutation peroksidaza
GR	Glutation reduktaza
GSH	Redukovani glutation
GSSG	Oksidovani glutation
HO	Hem oksigenaza
HSP	Proteini toplotnog šoka
IAA	Indol-3-sirćetna kiselina
LP	Lipidna peroksidacija membrana
MDA	Malondialdehid
MDHA	Monodehidroaskorbat
MDHAR	Monodehidroaskorbat reduktaza
MDK	Maksimalna dozvoljena koncentracija
MT	Metalotionini
PC	Fitohelatini
pH <sub>H2O</sub>	Aktivna kiselost
pH <sub>KCl</sub>	Supstitucionna kiselost
POD	Gvajakol peroksidaza
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
PTE	Potencijalno toksični elementi
ROS	Reaktivne kiseonične vrste
SEM-EDS	Skenirajuća elektronska mikroskopija sa energo-disperzivnom spektrofotometrijom
SOD	Superoksid dismutaza
SOM	Sadržaj organske materije
TAC	Ukupni antioksidativni kapacitet
TBA	Tiobarbiturna kiselina
TCA	Trihlorsirćetna kiselina
TF	Translokacioni faktor
Tot Carot	Ukupni karotenoidi

## Sadržaj:

1. UVOD .....	1
1.1. Zagađenje životne sredine potencijalno toksičnim elementima.....	1
1.2. Uticaj PTE na biljke .....	2
1.2.1. Uticaj povišenih koncentracija gvožđa na biljke .....	3
1.2.2. Uticaj povišenih koncentracija mangana na biljke.....	4
1.2.3. Uticaj povišenih koncentracija nikla na biljke.....	4
1.2.4. Uticaj povišenih koncentracija cinka na biljke.....	4
1.2.5. Uticaj povišenih koncentracija olova na biljke.....	5
1.2.6. Uticaj povišenih koncentracija bakra na biljke.....	6
1.2.7. Uticaj povišenih koncentracija kadmijuma na biljke .....	6
1.2.8. Uticaj povišenih koncentracija kobalta na biljke .....	7
1.2.9. Uticaj povišenih koncentracija hroma na biljke .....	7
1.3. Metalima indukovani oksidativni stres .....	8
1.3.1. Uticaj ROS na različite ćelijske strukture .....	9
1.4. Antioksidativni sistem biljaka .....	10
1.4.1. Enzimski komponenta antioksidativnog sistema biljaka.....	10
1.4.2. Neenzimski komponenta antioksidativnog sistema biljaka .....	12
1.5. Fitoremedijacija.....	14
1.5.1. Uloga <i>Phragmites australis</i> u fitoremedijaciji .....	16
2. CILJEVI RADA .....	19
3. MATERIJAL I METODE.....	21
3.1. Opis lokaliteta.....	21
3.2. Prikupljanje uzoraka i hemijske analize sedimenta.....	22
3.2.1. Određivanje pH zemljišnog rastvora .....	22
3.2.2. Određivanje sadržaja organskog ugljenika i organske materije.....	22
3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnog azota .....	22

3.2.4. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika fosfora.....	23
3.2.5. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika kalijuma .....	23
3.2.6. Određivanje pseudototalnog sadržaja metala.....	23
3.2.7. Određivanje sadržaja pristupačnih metala.....	24
3.3. Prikupljanje i analize biljnog materijala.....	24
3.3.1. Određivanje ukupnog sadržaja metala .....	24
3.3.2. Određivanje fitoremedijacionog potencijala <i>Phragmites australis</i> .....	24
3.3.3. Histoheмиjska detekcija metala u biljnim tkivima .....	25
3.3.4. Detekcija metala u biljnim tkivima pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa energo-disperzivnom spektrofotometrijom (SEM-EDS) .....	25
3.3.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	25
3.3.6. Određivanje sadržaja fenola u listovima.....	26
3.3.7. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta.....	26
3.3.8. Određivanje stepena lipidne peroksidacije .....	26
3.3.9. Određivanje koncentracije ukupnih proteina.....	27
3.3.10. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema.....	27
3.4. Statistička obrada podataka .....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Hemijske odlike ispitivanog sedimenta .....	30
4.2. Hemijski sastav biljnog materijala.....	32
4.2.1. Stehiometrijski odnosi metala u biljci .....	44
4.3. Fitoremedijacioni potencijal <i>Phragmites australis</i> .....	46
4.4. Histoheмиjska lokalizacija i detekcija metala u biljnim tkivima <i>Phragmites australis</i> pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa energo-disperzivnom spektrofotometrijom.....	47
4.5. Bioheмиjski parametri <i>Phragmites australis</i> .....	51
4.5.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata .....	51
4.5.2. Sadržaj fenola .....	53

4.5.3. Ukupan antioksidativni kapacitet.....	54
4.5.4. Stepen lipidne peroksidacije membrana.....	55
4.4.5. Sadržaj ukupnih proteina .....	56
4.4.6. Aktivnost antioksidativnih enzima .....	57
5. DISKUSIJA .....	64
5.1. Hemijske odlike ispitivanog sedimenta i jalovine.....	64
5.2. Hemijske odlike ispitivanog biljnog materijala.....	67
5.3. Fitoremedijacioni potencijal <i>Phragmites australis</i> .....	72
5.4. Biohemijski odgovor <i>P. australis</i> na povišene koncentracije metala.....	73
5.4.1. Uticaj povišenih koncentracija metala na biohemijske parametre u korenu <i>P. australis</i> .....	73
5.4.2. Uticaj povišenih koncentracija metala na biohemijske parametre u listu <i>P. australis</i> .....	76
6. ZAKLJUČCI .....	79
7. LITERATURA .....	80
8. PRILOZI .....	103

## 1. UVOD

### 1.1. Zagađenje životne sredine potencijalno toksičnim elementima

Metali i metaloidi se u prirodi sreću kao sastavni deo minerala stena i kao takvi ulaze u sastav mineralne komponente zemljišta. Hemijskom dezintegracijom minerala se postepeno oslobađaju, rastvaraju i prelaze u organizmima dostupni oblik u zemljištu, površinskim i podzemnim vodama. Ranije su se u naučnoj literaturi koja se bavi zagađenjem životne sredine određeni elementi sa relativnom gustinom većom od  $4 \text{ g/cm}^3$  označavali kao teški metali (Hawkes 1997). Međutim, pošto se radi o veoma heterogenoj grupi elemenata koju čine ne samo metali i metaloidi (npr. As), već i neki nemetali (Se), kao i pojedini elementi čija je gustina manja od  $4 \text{ g/cm}^3$  (Al,  $2,7 \text{ g/cm}^3$ ; Se,  $4,8 \text{ g/cm}^3$ ), u novijoj literaturi se sve češće koristi naziv potencijalno toksični elementi (PTE). Jedan deo PTE čine oni elementi (npr. Zn, Cu, Fe) koji imaju biološku ulogu i organizmima su neophodni u malim količinama, a pri značajnijem povećanju koncentracije u organizmu ispoljavaju toksične efekte. Ovi metali (Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Co) se označavaju kao esencijalni (Reeves & Baker 2000) i veoma su značajni za odvijanje fizioloških procesa budući da su sastavna komponenta mnogih biomolekula, kao što su metalo-proteini i hlorofil (Rakić et al. 2021). Drugu grupu PTE čine i oni elementi koji, koliko je do sada poznato, nemaju nikakvu ulogu u organizmu (npr. Cd, Hg, Pb) i već pri veoma niskim koncentracijama ispoljavaju negativna i toksična dejstva (Gaur & Adholeya 2004).

PTE su u većini tipova stena i zemljišta prisutni u veoma niskim koncentracijama, izuzev pojedinih koji prirodno sadrže povišene koncentracije jednog, a najčešće većeg broja ovih elemenata, kao što su ultramafiti. Međutim, u savremeno doba zbog zagađenja životne sredine brojnim antropogenim aktivnostima, metali se nalaze u povišenim koncentracijama i u onim zemljištima i vodama koje ih u toj količini prirodno ne sadrže. Najvažniji izvori zagađenja PTE su industrija, rudarstvo, saobraćaj, toplane i kućna ložišta, kanalizacioni mulj, kao i intenzivna poljoprivreda koja podrazumeva široku upotrebu pesticida i mineralnih đubriva.

Rudarstvo, koje se smatra jednim od najvećih zagađivača životne sredine PTE, podrazumeva iskopavanje rude iz koje se vrši ekstrakcija metala/metaloida koji se dalje koriste u drugim granama privrede. Nakon obrade rude, koja obuhvata mehaničko usitnjavanje stene i potom njenu hemijsku obradu, preostaje velika količina otpada - jalovine. Jalovina se dalje meša sa vodom u procesu flotiranja i u vidu mulja taloži u blizini rudnika. Tako se postepeno formira i širi flotaciono odlagalište jalovine koje dostiže dubinu od nekoliko desetina do preko stotinu metara, u zavisnosti od dužine i intenziteta rada rudnika. Fizičke i hemijske osobine flotacione jalovine su izuzetno nepovoljne za rast biljaka i razvoj vegetacije. Pored visokih koncentracija većeg broja metala i metaloida, jalovina je nepovoljnog granulometrijskog sastava, odlikuje se velikom sabijenošću na maloj dubini i niskim sadržajem makroelemenata koji su neophodni za rast i razvoj biljaka. Usled visokih koncentracija PTE, nepovoljnog vodnog i mineralnog režima mali broj biljnih vrsta je sposoban da kolonizuje ovakve površine. Zbog specifične strukture i odsustva biljnog pokrivača koji bi fizički vezao podlogu, flotaciona jalovina je izuzetno podložna eolskoj i fluvijalnoj eroziji kojima lako može dospeti u okolne prirodne ekosisteme u kojima predstavlja dugotrajan izvor zagađenja PTE (Andrejić 2021).

Danas su PTE najzastupljenije zagađujuće materije životne sredine i među njima su Cd, Cr, Cu, Hg, Pb i Zn najčešće prisutni u povišenim koncentracijama. Biodostupnost metala, a time i njihova toksičnost zavise ne samo od njihove koncentracije u podlozi, već i od brojnih

fizičko-hemijskih karakteristika podloge kao što su pH zemljišnog rastvora, granulometrijski sastav, udeo gline i huminskih kiselina, interakcije različitih metala u podlozi, kao i od vrste biljaka (Violante et al. 2010). Dostupne metale biljke usvajaju i akumuliraju u različitim delovima biljnog organizma (koren, stablo, list). S obzirom da se ne razgrađuju, oni dospevaju do svih organizama u okviru trofičke mreže, ispoljavajući toksične efekte na svim biološkim sistemima, a na najvišim trofičkim nivoima se akumuliraju u najvišim koncentracijama. U ćelijama u kojima se nađu u povišenim koncentracijama dolazi do čitavog niza procesa koji vode različitim poremećajima, a čak i pri niskim koncentracijama metala moguće je ispoljavanje negativnih efekata (Pehlivan et al. 2009).

## 1.2. Uticaj PTE na biljke

Kako nedostatak, tako i prisustvo povišenih koncentracija esencijalnih metala ima određene posledice u funkcionisanju ćelija i organizma. Esencijalni mikroelementi su štetni tek pri povišenim koncentracijama u biljnom organizmu, a gornje vrednosti koncentracija za različite metale se obično razlikuju između biljnih vrsta, što uveliko zavisi od njihove sposobnosti da umanje štetne efekte povišenih koncentracija metala. S druge strane, pojedini metali i metaloidi kao što su Cd, Hg i As nemaju nikakvu poznatu biološku ulogu i visoko su toksični za metaboličke aktivnosti biljaka čak i u niskim koncentracijama (Reeves & Baker 2000).

Kako je prethodno istaknuto, esencijalni mikronutrijenti su prisutni u malim količinama u ćeliji i imaju brojne značajne uloge. Tako na primer Ni ima ulogu u usvajanju i metabolizmu azota (Siqueira et al. 2018). Fe, Cu i Mo kao komponente različitih metalo-proteina (npr. feredoksin) učestvuju u prenosu elektrona u elektron-transportnim lancima mitohondrija i hloroplasta (Tang & Blankenship 2013). Pojedini metali, kao što su Fe, Mn, Zn, Cu i Ni predstavljaju aktivatore i kofaktore metalo-enzima. Neki od primera su superoksid dismutaza (SOD), katalaza, askorbat oksidaza, citohrom, transferaze i izomeraze, a metali koji ulaze u njihov sastav su nezamenljiva i apsolutno neophodna komponenta koja im omogućava katalitičku aktivnost (Schmidt & Husted 2019; Mydy et al. 2021). Pored toga, brojni metali učestvuju i u procesima osmoregulacije u ćeliji (Rakić et al. 2021).

Međutim, usvajanje metala u povišenim koncentracijama često uzrokuje brojne negativne efekte na rast i razvoj biljaka. Najčešće posledice su smanjen rast i reproduktivna sposobnost biljaka (Küpper & Anderssen 2016). Može doći do oštećenja na nivou korena koja uzrokuju poremećeno usvajanje vode i mineralnih elemenata, disbalansa u sastavu mikroelemenata, poremećaja metabolizma proteina, pigmenata i hormona, promene intenziteta ćelijskog disanja i fotosinteze i narušavanja antioksidativnih mehanizama zaštite kod biljaka (Opdenakker et al. 2012; Cuypers et al. 2016; Küpper & Andresen 2016).

Povećanje koncentracije jednog ili više PTE u podlozi dovodi do promena u usvajanju biljkama neophodnih makro- i mikroelemenata usled antagonističkih odnosa koji postoje između elemenata pri usvajanju korenovim sistemom. Povišene koncentracije PTE u biljnom organizmu izazivaju veliki broj metaboličkih i fizioloških poremećaja koji nastaju kao rezultat njegovog direktnog i indirektnog dejstva. Tako, povišene koncentracije PTE izazivaju inhibiciju biomolekula vezujući se za njihove funkcionalne grupe, bilo u katalitičkom centru enzima umesto njegovog neophodnog metala ili za druge funkcionalne grupe, čime im menjaju osnovnu strukturu i inhibiraju funkciju. Jedna od posledica supstitucije metala koji ulaze u sastav biomolekula je i poremećena signalizacija u ćeliji koja dovodi do neadekvatnih ćelijskih odgovora. Jedna od tipičnih posledica povišenih koncentracija PTE u ćeliji je povećano stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) koje mogu nastati u redoks reakcijama (Fentonova i Haber-Weiss reakcija) u kojima direktno učestvuju tranzicioni (redoks aktivni)



metali, kao i indirektno (redoks neaktivni metali) kroz inhibiciju aktivnosti proteina, na taj način izazivajući metabolički disbalans u ćeliji. Ovako nastale ROS izazivaju dalje oksidativna oštećenja biomolekula i ćelijskih struktura i njihovih funkcija (Slika 1). Kao rezultat ovih dejstava povišenih koncentracija PTE u ćeliji, biljke pokazuju smanjen rast, smanjenu reproduktivnu sposobnost i izraženu senescenciju.

Koncentracije metala pri kojima dolazi do nepovoljnih efekata na biljne ćelije zavise od vrste metala, vrste biljke i njenog mineralnog statusa (N, P), kao i od toga da li je biljka istovremeno izložena još nekom tipu stresa na staništu. Danas su za sve metale postavljene gornje granice koncentracije u nemetalifernim zemljištima (maksimalno dozvoljena koncentracija, MDK) koje su bazirane na prosečnim koncentracijama pojedinačnih metala u ovim podlogama, kao i na poznavanju njihovog praga toksičnosti. Ove vrednosti treba da posluže kao reper za određivanje stepena zagađenosti zemljišta metalima, a nakon njihovog uključivanja u lance ishrane i na potencijalni rizik za zdravlje životinja i ljudi. Neki od metala koji se danas najčešće sreću kao zagađujuće supstance u zemljištu su Zn, Cd, Cu, Cr, Pb, Co, Ni i Mn.



Slika 1. Uticaj PTE na biljke.

### 1.2.1. Uticaj povišenih koncentracija gvožđa na biljke

Gvožđe kao esencijalni element za biljke ima mnogo važnih uloga u biološkim procesima. Neki od njih su proces fotosinteze, razvoj hloroplasta i biosinteza hlorofila. Glavni je konstituent ćelijskog redoks sistema, budući da hem proteini uključuju citochrome, katalazu, peroksidazu i leghemoglobin, kao i Fe-S proteine uključujući feredoksin, akontijazu i superoksid dismutazu (SOD) (Marschner 1995). Granica fitotoksičnosti, iznad koje kod osetljivih biljaka dolazi do pojave nekrotičnih mrlja i drugih vidljivih znakova oštećenja, iznosi 1000 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011). Iako je većina minerala bogata gvožđem, toksični simptomi na listovima se javljaju u uslovima plavljenja u kojima dolazi do redukcije nerastvorljivog Fe<sup>3+</sup> do rastvorljivog i biljkama lako dostupnog Fe<sup>2+</sup>, pod uticajem mikroorganizama (Becker & Asch 2005). Povišene koncentracije Fe<sup>2+</sup> deluju kao katalizator Fentonove reakcije u kojoj nastaju ROS i remete ćelijsku strukturu dovodeći do ireverzibilnih oštećenja membrana, DNA i proteina (Arora et al. 2002; De Dorlodot et al. 2005; Zahra et al. 2021). Toksičnost Fe kod duvana, uljane repice, soje i *Hydrilla verticillata* ispoljava se smanjenjem fotosinteze i prinosa, rastom aktivnosti askorbat peroksidaze i povećanjem oksidativnog stresa (Sinha et al. 1997).

### 1.2.2. Uticaj povišenih koncentracija mangana na biljke

Mangan je jedan od biljkama neophodnih elemenata koji je ključan za različite fiziološke procese u biljci kao što su fotosineza, ublažavanje negativnih efekata povećane produkcije ROS i učestvovanje u redoks reakcijama. Mangan se lako transportuje transpiracionim tokom od korena do listova, ali se nakon što dospe u listove nešto slabije retranslocira putem floema do drugih delova biljke (Loneragan 1988). Smatra se da je granica fitotoksičnosti za ovaj element  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kabata-Pendias 2011). Najčešći simptomi toksičnosti ogledaju se u pojavi braon pega na listovima, lisnim drškama i čitavom nadzemnom delu biljke, što je posledica procesa taloženja oksida mangana u apoplastu, kao i nekroze tkiva (Wu 1994). Korenovi izloženi povišenim koncentracijama Mn su često braon boje i povremeno sa prisutnim pukotinama (Foy et al. 1995). Višak Mn u biljkama dovodi do smanjenja apsorpcije drugih esencijalnih elemenata kao što su Ca, Mg, Fe i P, usled pojave antagonizma pri usvajanju, negativno utiče na proces fotosinteze (Nable et al. 1988; Amao & Ohashi 2008), inhibira sintezu hlorofila (Clairmont et al. 1986; Subrahmanyam & Rathore 2001) i izaziva inhibiciju enzima uključenih u antioksidativnu zaštitu ćelije (StClai & Lynch 2004; Fernando & Lynch 2015).

### 1.2.3. Uticaj povišenih koncentracija nikla na biljke

Nikl je jedan od elemenata koji je neophodan biljkama u niskim koncentracijama, ali štetne i toksične efekte ispoljava kada njegova koncentracija u biljci pređe optimalan nivo. Nikl je tranzicioni element i u prirodnim zemljištima se nalazi u tragovima, izuzev ultramafitskih u kojima je prisutan u daleko višim koncentracijama. Danas, koncentracija Ni raste u zemljištima svih oblasti koje su pod uticajem čovekovih aktivnosti kao što su rudarstvo, emisija čestica poreklom iz topionica, sagorevanje uglja i nafte, ispuštanje otpadnih kanalizacionih voda, zatim zbog upotrebe fosfatnih đubriva i pesticida (Gimeno-Garcia et al. 1996). Koncentracije Ni u zagađenim zemljištima dostižu vrednosti od 20 do 30 puta veće od prosečnih koncentracija za prirodna zemljišta ( $10\text{--}1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Izosimova 2005). Međutim, fitotoksične koncentracije za većinu biljaka kreću se u opsegu od  $10\text{--}100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kabata-Pendias 2011). Višak Ni u biljci uzrokuje različite fiziološke promene i simptome u vidu hloroza i nekroza (Rahman et al. 2005). Biljke koje rastu pri povišenim koncentracijama jona nikla imaju narušen mineralni balans, što rezultuje u poremećaju funkcija ćelijske membrane. Tako Ni utiče na sastav lipida i aktivnost H-ATP-aze plazmamembrana kod nadzemnih delova pirinča (Ros et al. 1992). Budući da je redoks-aktivan metal, nikl izaziva povećanu produkciju ROS što, između ostalog, izaziva i oksidativna oštećenja lipida i nukleinskih kiselina (Pandolfini et al. 1992). Ovakve promene remete funkcionalnost membrane i jonski balans unutar citoplazme, naročito jona K koji je najmobilniji jon kroz membrane biljnih ćelija. Drugi simptomi toksičnosti nikla kod tretiranih biljaka povezani su sa promenama u vodnom balansu, pa se smanjeno usvajanje vode koristi kao indikator u progresiji toksičnosti nikla kod biljaka (Pandey & Sharma 2002; Gajewska et al. 2006). Pored toga, negativno utiče na aktivnost enzima i time izaziva redukciju metaboličkih procesa, probleme sa klijanjem, rastom i razvojem biljke (Hassan et al. 2019).

### 1.2.4. Uticaj povišenih koncentracija cinka na biljke

Cink je esencijalni element koji kao sastavni deo metalo-enzima učestvuje u nekoliko metaboličkih procesa u biljkama. Cink ima dugačak biološki poluzivot, što može predstavljati problem u slučaju kada je biljka izložena povišenim koncentracijama Zn jer je potrebno duže vreme za njegovu eliminaciju i smanjenje aktivnosti na mestima akumulacije (Cakmak & Marshner 1993).

Koncentracije Zn u zagađenim zemljištima su najčešće u opsegu 150–300 mg kg<sup>-1</sup>, što prevazilazi potrebe biljaka za ovim nutrijentom i izaziva kod njih toksične efekte (Devries et al. 2002; Warne et al. 2008). Fitotoksičnost Zn se ogleda u poremećenom metabolizmu i indukovanju oksidativnih oštećenja u ćelijama, promenama u razvoju, smanjenom rastu i ubrzanom starenju, što je pokazano kod većeg broja biljnih vrsta kao što su *Phaseolus vulgaris* (Van Assche et al. 1988; Somasekharaiah et al. 1992; Cakmak & Marshner 1993), *Brassica juncea* (Prasad et al. 1999), *Pisum sativum* (Romero-Puertas et al. 2004) ili *Miscanthus × giganteus* (Andrejić et al. 2018). Takođe, uočava se pojava hloroza na mladim listovima koje se nakon produženog izlaganja visokim koncentracijama Zn mogu proširiti i na starije listove (Ebbs & Kochian 1997). Hloroze nastaju delimično usled nedostatka Fe<sup>2+</sup> indukovanoj kompeticijom sa jonima Zn<sup>2+</sup> koji imaju sličan radijus i naelektrisanje (Marschner 1986), a jednim delom i kao rezultat oksidativnih oštećenja ćelije. Višak Zn takođe često dovodi i do nedostatka Mn i Cu u biljkama koji nastaje usled poremećenog usvajanja i transporta ovih mikroelemenata od korena do nadzemnih delova biljke zbog međusobne kompeticije jona ovih metala koji se vezuju za ista mesta na transmembranskim transporterima (Ebbs & Kochian 1997). Drugi tipičan efekat toksičnosti Zn je pojava purpurno-crvene boje listova usled nedostatka fosfora (Lee et al. 1996), a nastaje zbog akumulacije antocijanina u listovima, kao odgovor na stres usled nedostatka datog makroelementa (Nakabayashi et al. 2014). Poznato je da visoke koncentracije Zn u biljkama redukuju usvajanje P, odnosno ova dva elementa se ponašaju kao antagonisti, pa je tako i usvajanje Zn redukovano pri povišenim koncentracijama P u zemljištu (Marschner et al. 1990; Das et al. 2005; Salimpour et al. 2010).

#### 1.2.5. Uticaj povišenih koncentracija olova na biljke

Olovo je jedan od najzastupljenijih potencijalno toksičnih elemenata u zemljištima, budući da se koristi u brojnim industrijskim oblastima (kao komponenta baterija, različitih boja, pesticida itd.), ali je i dugo vremena bio sastavni deo katalizatora goriva zbog čega se vremenom akumulirao u značajnim koncentracijama u površinskim slojevima zemljišta u blizini saobraćajnica. Olovo nema niti jednu poznatu ulogu u funkcionisanju ćelije i organizma, zbog čega predstavlja visoko toksičan element koji štetne efekte ispoljava već pri relativno niskim koncentracijama u biljnom organizmu. Opseg fitotoksičnosti za većinu biljaka kreće se od 30–300 mg kg<sup>-1</sup> (Ross 1994). Negativni efekti se ogledaju u poremećenoj morfologiji i rastu biljke. Poznato je da inhibira klijanje semena kod određenih vrsta biljaka (*Pinus halepensis*, *Spartiana altemiflora*) (Morzck & Funicelli 1982), što može biti posledica interferencije ovog elementa sa važnim enzimima. U većini slučajeva dolazi do interakcije metala sa enzimskim -SH grupama čime se menja njihova struktura i izaziva inhibicija aktivnosti enzima. Takođe, aktivnosti metaloenzima mogu biti smanjene usled zamene esencijalnog metala olovom na aktivnom mestu enzima (Sengar et al. 2008). Ovaj fenomen je potvrđen kod velikog broja biljaka. Tako su Mukherji & Maitra (1976) našli da olovo inhibira proteazu i amilazu za oko 50% u endospermu pirinča. Slično je nađeno kod soje, kukuruza, ječma, paradajza i određenih mahunarki. Visok nivo olova u podlozi uzrokuje poremećaje u morfologiji mnogih vrsta biljaka. Pb inhibira izduživanje korena i stabla, kao i ekspanziju listova kod vrsta iz roda *Allium* (Gruenhagen & Jager 1985) i ječma (Juwarkar & Shende 1986). Kod graška dolazi do nepravilnog zrakastog zadebljavanja korenova, ćelijskih zidova endodermisa i lignifikacije parenhima kore (Paivoke 1983). Pokazano je da Pb indukuje proliferativni efekat u procesu reparacije kod vaskularnih biljaka (Kaji et al. 1995), dok inhibitorni efekat Pb<sup>2+</sup> na rast i produkciju biomase verovatno proizilazi iz uticaja na metaboličke procese kod biljaka (Van Assche & Clijsters 1990). Primarni uzrok inhibicije rasta ćelija potiče od oksidacije indol-3 sirćetne kiseline (IAA) indukovane olovom.

U procesu fotosinteze Pb inhibira aktivnost enzima koji učestvuju u karboksilaciji (Stiborova et al. 1987). Pored inhibicije aktivnosti različitih enzima, visok nivo Pb dovodi i do

poremećaja u vodnom balansu i u propustljivosti membrana, kao i do disbalansa u mineralnoj ishrani biljaka (Sharma & Dubey 2005). Visoke koncentracije olova takođe dovode do povećane produkcije ROS i time indukuju oksidativni stres kod biljaka (Reddy et al. 2005).

#### 1.2.6. Uticaj povišenih koncentracija bakra na biljke

Bakar je mikroelement koji ima važnu ulogu u asimilaciji CO<sub>2</sub> i sintezi ATP (Thomas et al. 1998). Ulazi u sastav nekoliko ključnih enzima (superoksid dismutaza (SOD), citohrom oksidaza, askorbat peroksidaza, polifenol oksidaza) i ima važne funkcije u procesima kao što su fotosinteza i respiracija, metabolizam nitrata, ugljenih hidrata, proteina i dr. Esencijalna je komponenta proteina kao što su plastocijanini fotosintetskog sistema i citohrom oksidaze respiratornog elektron transportnog lanca (Demirevska-Kepova et al. 2004). Višak Cu u biljkama dovodi do brojnih promena na nivou ćelije koje uzrokuju pojavu stresa, poremećen rast biljke i hlorozu listova (Lewis et al. 2001). Opseg fitotoksičnosti za većinu biljaka kreće se od 25–40 mg kg<sup>-1</sup> (Chaney 1989). Stres izazvan viškom Cu u ćeliji, između ostalog, nastaje kao rezultat promjenjenih molarnih odnosa između Cu i drugih mikroelemenata (Fe, Zn, Mn), čime se ometa normalna sinteza biomolekula kao što su nikotinamin ili hlorofil (Bosnić et al. 2019; Joseph et al. 2019). Višak Cu narušava integritet ćelijskog zida i izaziva promene u strukturi hloroplasta, mitohondrija, peroksizoma i endoplazmatičnog retikuluma (Minkina et al. 2020). Dolazi do povećane produkcije ROS usled metaboličkog disbalansa i povećane produkcije malondialdehida (Stadtman & Oliver 1991; Kurt-Gür et al. 2018). Oksidativni stres dodatno remeti metaboličke puteve i uzrokuje oštećenja makromolekula (Hegedus et al. 2001). U kombinaciji sa kadmijumom, bakar nepovoljno utiče na klijanje, dužinu klijanaca i broj bočnih korenova kod vrste *Solanum melongena* (Neelima & Reddy 2002; Ambrosini et al. 2018; Aghajanzadeh et al. 2020).

#### 1.2.7. Uticaj povišenih koncentracija kadmijuma na biljke

Kadmijum je jedan od elemenata za koji nije poznato da ima bilo kakvu biološku ulogu i smatra se da već pri veoma niskim koncentracijama izaziva negativne posledice u metabolizmu ćelija i čitavog biljnog organizma. Kadmijum je danas jedna od tipičnih zagađujućih materija poljoprivrednih zemljišta u koja se unosi redovnom primenom fosfatnih mineralnih đubriva proizvedenih od sedimenata koji u sebi sadrže Cd. Iako je u samom mineralnom đubrivu njegova koncentracija veoma niska, redovna primena na poljoprivrednim površinama dovodi do akumulacije u površinskim slojevima zemljišta, gde se nalazi najveći deo korenovog sistema kulturnih biljaka. Zbog toga je Pravilnikom o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja („Službeni glasnik RS”, br. 23/94) određena maksimalna dozvoljena koncentracija Cd u poljoprivrednim zemljištima koja iznosi 3 mg kg<sup>-1</sup>, dok je u Evropi ta vrednost 1–3 mg kg<sup>-1</sup>. Biljke koje rastu na zemljištima sa povišenom koncentracijom Cd pokazuju simptome toksičnosti kao što su hloroza, inhibicija rasta, tamni vrhovi korenova i u krajnjem ishodu dolazi do smrti biljke (Di Toppi & Gabbrielli 1999; Wojcik & Tukiendorf 2004; Mohanpuria et al. 2007; Guo et al. 2008). Neki od negativnih efekata povišenih koncentracija Cd na biljku su:

- Cd-indukovana inhibicija Fe (III) reduktaze na nivou korena što dovodi do nedostatka Fe<sup>2+</sup>. Deficit gvožđa inhibira biosintezu hlorofila, izaziva delimičnu dezintegraciju membrane hloroplasta, inhibira rad elektron transportnog lanca i umanjuje fotosintezu (Alcántara et al. 1994; Li et al. 2021),

- poremećeno usvajanje, transport i iskorišćavanje Zn, Mn, Fe i Ca u ćeliji, usled kompeticije između Cd i ovih elemenata za iste receptore (Rascio & Navari-Izzo 2011),

- redukcija aktivnosti nitratne reduktaze u nadzemnom delu biljke i smanjenje apsorpcije i transporta nitrata od korena do nadzemnog dela (Tran & Popova 2013),
- smanjeno formiranje korenskih nodula usled nižeg nivoa usvajanja amonijaka i fiksacije azota u zoni rizosfere (Balestrasse et al. 2003),
- pojava vodnog deficita do kog dolazi zbog strukturnih promena usled smanjenja ukupne površine korenskih dlaka i izduživanja primarnog korena (Gallego et al. 2012). Ovim se smanjuje površina preko koje se odvija interakcija između korena i zemljišta,
- narušena difuzija kroz ćelijsku membranu zbog promene u ekspresiji gena za akvaporine i supresije njihove funkcije (Gall et al. 2015),
- redukovana ATP-azna aktivnost membrana koja je pokazana kod korena pšenice i suncokreta (Fodor et al. 1995),
- povišen nivo oksidativnog stresa, indukcija peroksidacije membranskih lipida i poremećen metabolizam unutar hloroplasta, što inhibira biosintezu hlorofila i aktivnost enzima uključenih u fiksaciju CO<sub>2</sub> (De Filippis & Ziegler 1993).

#### 1.2.8. Uticaj povišenih koncentracija kobalta na biljke

Kobalt predstavlja jedan od mikroelemenata koji biljke sadrže u izuzetno niskim koncentracijama (Kukier et al. 2004; Li et al. 2004; Bakkaus et al. 2005). Međutim, usled preterane i redovne upotrebe đubriva, sagorevanja fosilnih goriva, povećanog iskopavanja i obrada ruda koje sadrže Co, dolazi do zagađenja zemljišta i voda ovim elementom. Za razliku od drugih metala, veoma malo informacija je dostupno u smislu njegovih fitotoksičnih efekata. Prema Kabata-Pendias (2001), opseg fitotoksičnosti za ovaj element je od 15–50 mg kg<sup>-1</sup>. Poznato je da višak Co limitira koncentraciju hlorofila, proteina i katalaznu aktivnost. S druge strane, povećana koncentracija Co u biljci izaziva povećanje aktivnosti peroksidaza, kisele fosfataze, enzima ribonukleaze, kao i povećan udeo ugljenih hidrata u biljci. Takođe, smanjuje translokaciju Fe, P, S, Mn, Zn i Cu od korena do vršnih delova biljke čime izaziva njihovu deficijenciju (Chatterjee & Chatterjee 2003). Nasuprot višku Cu ili Cr, Co značajno smanjuje vodni potencijal i stopu transpiracije zbog čega sadržaj vode raste u listovima karfiola pri izlaganju njegovom višku (Chatterjee & Chatterjee 2000; Nagajyoti et al. 2010). Kao rezultat ovih promena, pokazan je negativan efekat Co na rast nadzemnog dela i akumulaciju biomase kod ječma, uljane repice i paradajza (Li et al. 2009).

#### 1.2.9. Uticaj povišenih koncentracija hroma na biljke

Za sada ne postoje podaci da Cr ima bilo kakvu ulogu u metabolizmu biljaka. Zbog toga su jedinjenja hroma visoko toksična za biljke i štetna za njihov rast i razvoj. Za većinu viših biljaka toksični efekti se ispoljavaju pri koncentracijama od 100 mg kg<sup>-1</sup> Cr u zemljištu (Davies et al. 2002). Budući da je klijanje semena prvi fiziološki proces pogođen toksičnim koncentracijama hroma, sposobnost klijanja u medijumu koji sadrži Cr bi bila indikator nivoa tolerancije ovog metala od strane biljne vrste (Peralta et al. 2001). Tako je klijanje semena vrsta *Echinochloa colona* redukovano za 25% pri koncentraciji hroma od 200 μM (Rout et al. 2000), a klijanje semena *Phaseolus vulgaris* i lucerke do 48%, odnosno 23% pri koncentracijama šestovalentnog Cr od 500 mg kg<sup>-1</sup> (Parr & Taylor 1982) i 40 mg kg<sup>-1</sup> (Peralta et al. 2001). Pokazano je i da do smanjenog klijanja semena dolazi zbog rasta aktivnosti proteaze raste pri tretmanu hromom (Zeid 2001). Povišena koncentracija Cr redukuje usvajanje esencijalnih elemenata kao što su Fe, Mg, P, S, Cu i Ca, čime narušava balans elemenata u biljnom organizmu (Dube et al. 2003). Pored toga, Cr spada u grupu tranzicionih ili redoks metala koji direktno učestvuju u povećanom stvaranju ROS u ćelijama kroz Haber-

Weiss i Fentonovu reakciju (Shanker et al. 2005). Takođe, kao i ostali PTE, kada se nađe u višku i Cr može inhibirati aktivnost čitavog niza enzima vezujući se za katalitičko ili neko drugo mesto na enzimu i time narušiti procese u kojima učestvuju. Kao rezultat, nastaje čitav niz problema u odvijanju osnovnih procesa u ćelijama. Hrom može da izazove tri tipa metaboličkih poremećaja i fizioloških odgovora biljke: (i) smanjenu produkciju pigmenta (hloforil, antocijanini) usled deficijencije esencijalnih elemenata ili povećane aktivnosti nekih enzima kao što je hlorofilaza (Boonyapookana et al. 2002), (ii) povećanu produkciju metabolita koji mogu učestvovati u otporu ili toleranciji prema ovoj vrsti stresa (glutation, askorbinska kiselina, prolin) i aktivnosti enzima (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaze) koji učestvuju u odgovoru biljke na stres (Shanker et al. 2004; Sharma et al. 2020) i (iii) izmene u produkciji hormona (etilen) (Schmferger 2001). Kao rezultat ovih promena u metabolizmu na fiziološkom nivou dolazi do promena u procesu fotosinteze, u smislu fiksacije CO<sub>2</sub>, transporta elektrona, fosforilacije i aktivnosti enzima (Clijsters & Van Assche 1985), što se ogleda u smanjenom rastu biljaka (Tang et al. 2001).

### 1.3. Metalima indukovani oksidativni stres

Tokom normalnog metabolizma aerobnih organizama proizvodi se relativno nizak nivo reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u simplastičnom i apoplastičnom delu ćelije, a njihove koncentracije se pažljivo kontrolišu i pomoću antioksidativnih mehanizama zaštite održavaju na za ćeliju prihvatljivom nivou (Mittler 2002). ROS su veoma važne za biljke jer neke od njih predstavljaju signalne molekule i učestvuju u regulaciji širokog spektra bioloških procesa koji su uključeni u rastenje i razviće biljke, kao i njen adaptivni odgovor na stres (Gapper & Dolan 2006; Tores 2010; Mittler et al. 2011; Ray et al. 2012). Stvaraju se tokom aerobnih metaboličkih procesa, kao što su fotosinteza i respiracija, i stoga se najveći deo proizvodi u mitohondrijama, hloroplastima, peroksisomima, plazmamembrani i apoplastu (Ahmad et al. 2008). Enzimi kao što su NADPH oksidaze, amin oksidaze i peroksidaze ćelijskog zida predstavljaju glavne izvore unutarćelijskih i vanćelijskih ROS (Cona et al. 2006; Kámán-Tóth et al. 2019; Hu et al. 2020). U uslovima abiotičkog ili biotičkog stresa produkcija ROS ponekad prevazilazi mehanizme ćelijske odbrane, što rezultuje u nekontrolisanim oksidativnim procesima i oštećenjima na nivou ćelije i tkiva. Stoga, dugotrajni oksidativni stres dovodi do promena u fiziološkim procesima biljke i vidljivih oštećenja. Odgovor biljke na povećanu produkciju ROS u velikoj meri zavisi od vrste biljke, faze u razviću, vrste stresa i perioda izloženosti.

Reaktivne vrste kiseonika nastaju od molekularnog kiseonika u redoks reakcijama ili prilikom ekscitacije elektronom i obuhvataju singletni kiseonik (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksidni anjonski radikal (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>) i hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>) (Das & Roychoudhury 2014; Sies & Jones 2020).

Tabela 1. Najvažniji tipovi ROS.

Singletni kiseonik	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	radikal	visoko reaktivan
Superoksid	O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	radikal	umereno reaktivan
Vodonik peroksid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	neradikalni ROS	nisko reaktivan
Hidroksilni radikal	OH <sup>•</sup>	radikal	veoma visoko reaktivan

Singletni kiseonik se najvećim delom proizvodi u hloroplastima u okviru Fotosistema II prilikom prebacivanja energije sa tripletnog hlorofila na molekularni kiseonik, ali može biti i rezultat aktivnosti lipogenaze (Foyer et al. 1994; Ballottari et al. 2013). Visoko je reaktivna vrsta koja ima kratak poluživot od oko 3μs (Hatz et al. 2007), može preći put od 100 nm i pri tome naneti štetu čitavom spektru biomolekula. U biljnoj ćeliji singletni kiseonik se uklanja pomoću β- karotena, tokoferola, plastokinona (Krieger-Liszakay & Trebst 2006; Ramel et al. 2012). Pored negativnih dejstava u ćeliji singletni kiseonik ima ulogu i u povećanju aktivnosti

gena koji su zaduženi za obezbeđenje zaštite od foto-oksidativnog stresa (Krieger-Liszkay et al. 2008).

Superoksidni radikal nastaje u hloroplastima (PSI i PSII) i mitohondrijama kao sekundarni proizvod, kao i u peroksizomima zbog parcijalne redukcije  $O_2$  ili transfera energije na  $O_2$  i obično je prvi tip ROS koji se na ovim mestima formira (Del Rio et al. 2006; Moller et al. 2007). Ima poluživot od 2-4  $\mu s$  i ne prolazi fosfolipidnu membranu (Garg & Manchanda 2009) pa je bitno da ćelija ima adekvatne mehanizme za njegovo uklanjanje. Takođe može biti produkovan od strane NADPH oksidaze u plazma membrani (Moller et al. 2007). Superoksidni radikal može učestvovati u Fentonovoj reakciji i formiranju drugih mnogo reaktivnijih i toksičnih vrsta ROS, kao što su hidroksilni radikal i singletni kiseonik (Halliwell 2006).

Vodonik peroksid je umereno reaktivan i nastaje univalentnom redukcijom kao i protonacijom superoksidnog radikala. Može nastati neenzimski, dismutacijom pri niskim pH vrednostima, ili u reakciji katalizovanoj SOD.  $H_2O_2$  se najvećim delom proizvodi u peroksizomima, elektron-transportnom lancu hloroplasta i mitohondrija, u procesu fotorespiracije, ali nastaje i na drugim mestima kao što su endoplazmatični retikulum i membrane. Nije radikal i lako prolazi kroz akvaporine membrane, sa poluživotom od oko 1 ms (Garg & Manchanda 2009). U niskim dozama ima povoljan efekat na ćeliju delujući kao regulatorni signal za osnovne fiziološke procese.

Hidroksilni radikal je najreaktivnija i najtoksičnija vrsta ROS koja nastaje od vodonik peroksida kroz Fenton i Fenton-slične reakcije i za razliku od dva prethodna ROS nema poznatih enzimskih sistema sposobnih da ga razgrade (Freinbichler et al. 2011). Nastaje u Fentonovoj reakciji, između  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ , katalizovanoj gvožđem (Fe). Ova ROS dovodi do peroksidacije lipida, oštećenja proteina i destrukcije membrana (Das & Roychoudhury 2014).

Iako superoksidni radikal i vodonik peroksid nisu reaktivni koliko i ostale vrste ROS, proizvode se u velikim količinama u ćeliji i iniciraju druge reakcije koje dovode do stvaranja opasnijih vrsta radikala (Noctor & Foyer 1998). Ustvari, superoksidni radikal se pomoću određenih enzima prevodi u vodonik peroksid, što dalje inicira pokretanje Fentonove reakcije (Moller et al. 2007).

### 1.3.1. Uticaj ROS na različite ćelijske strukture

Različite vrste stresa dovode do povećane produkcije ROS, često u količinama koje mogu izazivati oksidativna oštećenja biomolekula (proteina, lipida, ugljenih hidrata, DNK), zbog čega je veoma važno da ćelija održava ravnotežu između produkovanih ROS i njihovog uklanjanja. U suprotnom, može doći do narušavanja ćelijske homeostaze i smrti ćelije.

Nezasićene masne kiseline koje grade lipide ćelijskih membrana su naročito osetljive na oksidaciju usled koje dolazi do oštećenja i povećane propustljivosti membrana. Lipidna peroksidacija se odvija kroz niz lančanih reakcija koje počinju kada ROS, kao što je hidroksilni radikal, ukloni jedan atom vodonika vezan za ugljenik iz masnih kiselina (pretežno nezasićenih). Kiseonik se tada lako može vezati za to mesto i formirati lipidni peroksil radikal koji dalje propagira slične reakcije na membrani (Gill & Tuteja 2010).

Proteini su takođe osetljivi na oksidaciju pod uticajem ROS koji dovode do gubitka katalitičke aktivnosti određenih enzima. Najosetljiviji delovi proteina su zapravo tiolne grupe čija oksidacija dovodi do denaturacije proteina i gubitka funkcionalne konformacije (Moller et al. 2007). Takođe, oksidacija proteina vodi ka stvaranju karbonilnih grupa i povećanoj stopi proteolize oštećenih proteina od strane proteolitičkih enzima (Palma et al. 2002). Promene na nivou količine i sastava proteina u ćeliji često mogu biti posledica stresa izazvanog toksičnim metalima. Tako je u listovima *Lupinus luteus* zabeležen značajno viši sadržaj proteina nakon izloženosti određenim koncentracijama bakra tokom 11 dana, u poređenju sa kontrolom. Ovaj

porast koncentracije proteina može biti posledica uspostavljanja balansa zbog inaktivacije drugih vrsta proteina unutar ćelije, a predstavlja jedan od mehanizama zaštite ćelije od stresa budući da novonastali proteini ispoljavaju brojne uloge u ćeliji, uključujući i antioksidativnu zaštitu (Mourato & Martins 2012). Takođe, posmatrajući proteinski profil nakon izloženosti bakru uočena je pojava novih proteina, što se takođe može objasniti ćelijskim odbrambenim mehanizmima.

Kod DNK, ROS uzrokuju brojne mutacije i genske poremećaje (Tuteja et al. 2001). Dovode do razdvajanja lanaca DNK, uklanjaju i/ili izmenjuju nukleotide i vrše oksidaciju dezoksiriboze, kao i azotnih baza. Ove oksidacije DNK vode ka nekoliko hromozomskih aberacija. Takođe, hidroksilni radikal napada DNK i DNK-vezujuće proteine, što dovodi do kros-reakcija između proteina i DNK koje mogu biti letalne za ćeliju (Choudhary et al. 2020).

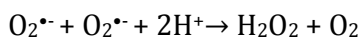
Ugljeni hidrati, slobodni i vezani u polisaharidima ćelijskog zida, lako stupaju u reakciju sa visoko reaktivnim hidroksil radikalom, što takođe može biti jedan od potencijalnih ćelijskih mehanizama odbrane pre uništavanja biološki značajnijih molekula (Moller et al. 2007). Istovremeno, u uslovima oksidativnog stresa dolazi do redoks modifikacija enzima koji učestvuju u procesu glikolize i Krebsovom ciklusu, odnosno do inhibicije enzima puta pentozofosfata sa povećanjem nivoa ROS (Hasanuzzaman et al. 2020).

## 1.4. Antioksidativni sistem biljaka

Mehanizmi odbrane biljaka od oksidativnog stresa izazvanog potencijalno toksičnim elementima veoma zavise od vrste metala i same biljke i uglavnom uključuju enzime askorbat-glutation ciklusa i druge antioksidativne enzime. U glavne antioksidativne enzime spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutation reduktaza (GR) i gvajakol peroksidaza (POD) (Das & Roychoudhury 2014). Sa druge strane, antioksidativna svojstva imaju i neenzimske komponente kao što su askorbat, glutation, alkaloidi, fenolna jedinjenja, neproteinske aminokiseline i karotenoidi.

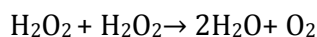
### 1.4.1. Enzimskom komponenta antioksidativnog sistema biljaka

Enzimski mehanizmi i enzimi uključeni u specifične metaboličke puteve su jedan od glavnih antioksidativnih mehanizama odbrane biljaka od prekomerne količine ROS. Superoksid dismutaza (SOD) katalizuje dismutaciju superoksidnog radikala do vodonik peroksida i kiseonika (Alscher et al. 2002) u sledećoj reakciji:



SOD se u zavisnosti od metala koji predstavlja kofaktor za ovaj enzim klasifikuje u tri različita tipa koji su lokalizovani u različitim delovima ćelije: FeSOD u hloroplastima, MnSOD u mitohondrijama i peroksizomima i Cu/ZnSOD u hloroplastima i citosolu. Pošto se vodonik peroksid nastao pod dejstvom SOD kasnije prevodi do molekula vode pomoću peroksidaze i katalaze, aktivnosti sva tri enzima treba da budu fino izbalansirane.

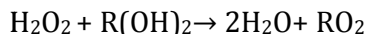
Katalaza (CAT) je najvećim delom zastupljena u peroksizomima i pošto je važna za detoksikaciju  $H_2O_2$ , koji u peroksizome dospeva difuzijom iz drugih delova ćelije, broj ovih organela tokom stresa raste (Mittler 2002). CAT prevodi vodonik peroksid do molekula vode u sledećoj reakciji:



Peroksidaze su član velike familije enzima koji sadrže Fe (osim glutation peroksidaze koja sadrži Se). Prisutne su u svim delovima ćelije kao i u apoplastu, u kojima imaju brojne

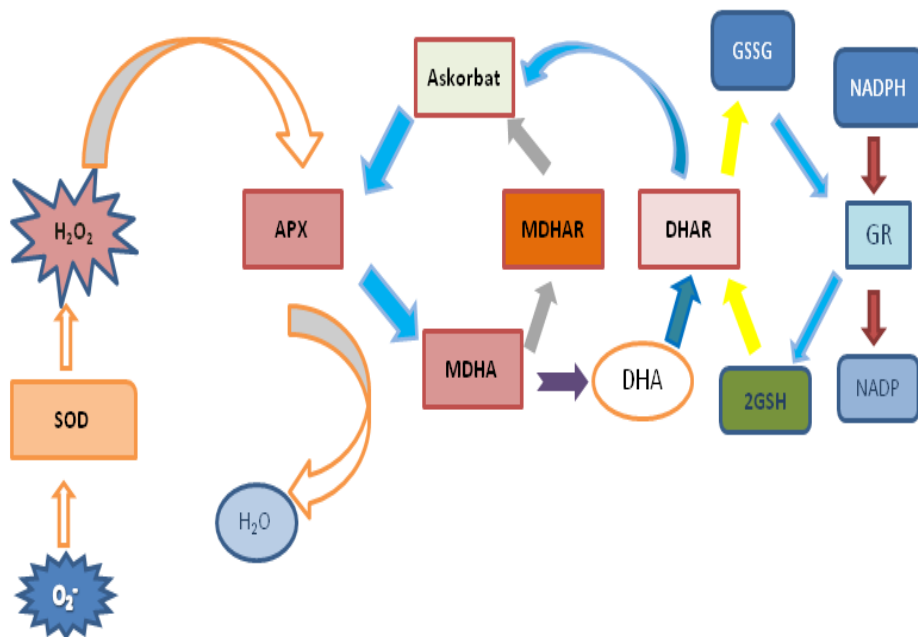


metaboličke uloge. Učestvuju u metabolizmu auksina, izgradnji lignina i suberina, povezivanju komponenti ćelijskog zida, kao i u odbrani od patogenih i izduživanju ćelija (Passardi et al. 2005). Uklanjaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nastao uslovima stresa pomoću različitih redukujućih agenasa tokom sledeće reakcije:



R(OH)<sub>2</sub> predstavlja različita organska jedinjenja koja predstavljaju elektron-donore. Gvajakol peroksidaza (POD) koristi uglavnom fenolna jedinjenja, askorbat peroksidaza (APX) koristi askorbinsku kiselinu (AsA), a glutation peroksidaza (GPX) koristi redukovani glutation (GSH). Pored uloge u uklanjanju vodonik peroksida, peroksidaze ćelijskog zida imaju oksidativnu funkciju, pa su takođe uključene u produkciju vodonik peroksida. Produkovani H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> učestvuje u odbrani od biotičkog stresa, a kao regulatorni molekul redoks signalizacije ćelije učestvuje u procesima rastezanja i razvića, ali i u odbrani od abiotičkog stresa, dovodeći do aktivacije odbrambenih mehanizama (Mika et al. 2004). APX ima mnogo veći afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na CAT, što ukazuje na to da imaju različite uloge u uklanjanju ovog jedinjenja. Askorbat peroksidaza je odgovorna za održavanje niskog nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je uloga CAT da ukloni njegov višak (Mittler 2002).

Askorbat-glutation ciklus je važna grupa enzimski katalizovanih reakcija uključenih u detoksikaciju ROS. Uključuje APX, GPX, kao i druge enzime kao što su monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) koji imaju ulogu u regeneraciji redukovanih formi askorbata, kao i glutation reduktazu (GR) koja je važna za održavanje ukupne količine redukovanog glutationa.



Slika 2. Askorbat-glutation ciklus.

Drugi enzimi, kao hem oksigenaza (HO) koja katalizuje specifično prevođenje hema do biliverdina (Balestrasse et al. 2005), takođe imaju ulogu u odbrani biljaka od oksidativnog stresa.

Aktivnost enzima uključenih u uklanjanje ROS nastalih pod uticajem PTE je intenzivno istraživana u okviru brojnih studija (Rubino 2015; Guo et al. 2019; Singh et al. 2020). Različiti metali indukuju drugačije mehanizme odbrane kod biljaka. U zavisnosti od vrste biljke, metala i njegove koncentracije, biljnog dela, dužine izloženosti stresu, starosti biljke i drugih faktora odgovor ćelije će biti drugačiji (Gratão et al. 2005). U nekim situacijama aktivnost enzima raste pri nižim koncentracijama metala, a zatim pada pri visokim koncentracijama, kada odbrambeni mehanizam prestaje da funkcioniše (Farid et al. 2017). Ovo pokazuje da su različite komponente antioksidativnog sistema aktivne pod različitim uslovima. Porast aktivnosti enzima ukazuje na to da je enzim aktiviran, odnosno njegova ekspresija stimulirana. S druge strane, nekada je negativan efekat metala toliki da je sama struktura enzima narušena, pa dolazi do pada aktivnosti. Takođe, neki od enzima imaju metale kao kofaktore, što ukazuje na postojanje veze između ekspresije aktivnosti enzima i dostupnosti potrebnog metala (Cohu & Pilon 2007). Sve ovo čini enzimski odgovor biljaka izuzetno kompleksnim.

#### 1.4.2. Neenzimska komponenta antioksidativnog sistema biljaka

Postoji veliki broj supstanci za koje je potvrđeno da imaju antioksidativnu ulogu kod biljaka. Neke od njih, kao što su askorbat i glutation, dobro su poznate, dok se za druge smatra da učestvuju u antioksidativnoj zaštiti iako njihova uloga još uvek nije do kraja razjašnjena. Većina studija ukazuje na povećanje koncentracije ovih supstanci tokom izloženosti stresu, ali takva korelacija nije dovoljna da objasni konkretan uticaj na metabolizam biljke. Nekoliko organskih molekula ima sposobnost da formira komplekse sa metalima. Takvi su fitohelatini, organske kiseline i neke aminokiseline (npr. prolin). Askorbat i glutation su antioksidanti koji postoje u relativno visokim koncentracijama u ćeliji i uključeni su u askorbat-glutation ciklus. U tom ciklusu, askorbat predstavlja supstrat za APX, a GSH supstrat za dehidroaskorbat reduktazu, koje katalizuju reakcije uključene u uklanjanje vodonik peroksida.

Askorbat (ASC) je elektron-donor koji može biti oksidovan do radikala monodehidroaskorbata (MDHA), a zatim i do dehidroaskorbata (DHA). Pored toga, ASC može direktno reagovati sa singletnim kiseonikom i superoksidnim radikalom i važan je za regeneraciju  $\alpha$ - tokoferola i određenih karotenoida (Potters et al. 2002).

Glutation je tripeptid koji može postojati u redukovanoj (GSH) i oksidovanoj formi (GSSG) (Noctor & Foyer 1998). Uključen je u metabolizam sumpora i u antioksidativnu zaštitu. Takođe vodi ka sintezi fitohelatina koji su važni za sekvencijalnu sekvestraciju određenih metala (Cobbett & Goldsbrough 2002).

Proteini toplotnog šoka (HSP) su proteini čija ekspresija raste pod uticajem stresa, ali takođe imaju ulogu u zaštiti drugih proteina od oštećenja u stresnim uslovima (Feder & Hofmann 1999). Omogućavaju održavanje ili oporavak native konformacije proteina i uklanjanje potencijalno opasnih polipeptida. Ekspresija ovih proteina povezana je sa visokim temperaturama, hladnoćom, sušom, metalima, solima, itd. (Timperio et al. 2008).

Karotenoidi imaju važnu zaštitnu ulogu tokom procesa fotosinteze kao molekuli pomoću kojih se izbegava produkcija ROS ( $^1O_2$ ) tokom pobuđenih stanja hlorofila. Posledica toga je da sami molekuli postaju ekscitirani, što ne predstavlja problem jer u ovom slučaju nema dovoljno energije koja bi omogućila stvaranje ROS (Taiz & Zeiger 2002).

Terpenoidi su velika klasa organskih jedinjenja poreklom od izoprena koji takođe imaju antioksidativnu ulogu, ali ona nije potpuno razjašnjena.

Flavonoidi su organski molekuli za koje je potvrđeno da imaju zaštitnu ulogu od nekoliko vrsta stresa (Jaakola et al. 2004) kako sami, tako i udruženi sa peroksidazama (Mika et al. 2004). Antocijanini predstavljaju vrstu flavonoida prisutnih u vakuolama, koji imaju

antioksidativni kapacitet (Kahkonen & Heinonen 2003). Međutim, njihova pozicija u ćeliji ih sprečava da dođu u direktan kontakt sa mestima produkcije ROS, iako se njihov nivo povećava pri izloženosti stresu PTE (Naing & Kim 2021).

Tioli mogu imati važnu antioksidativnu ulogu štiteći lipide membrana. Lipoina kiselina takođe ima ulogu u uklanjanju ROS, ali je sposobna i da gradi helatna jedinjenja sa nekoliko jona metala koji indukuju antioksidativni stres i stoga ima važnu ulogu u zaštiti ćelije (Navari-Izzo et al. 2002).

Tokoferoli su klasa jedinjenja sintetisana od strane fotosintetskih organizama.  $\alpha$ -tokoferol je najčešća forma u listovima, dok je  $\gamma$ -tokoferol najzastupljeniji u korenu (Abbasi et al. 2007). Imaju ulogu u zaštiti od ROS jer uklanjaju singletni kiseonik i prekidaju lanac reakcija pokrenut tokom lipidne peroksidacije (Garg & Manchanda 2009).

Pojedine aminokiseline, kao što su prolin i histidin, pored brojnih drugih uloga igraju i značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija. Prolin je osmoprotektant koji omogućava balansiranje vodnog stresa u biljnim ćelijama. Za prolin je pokazano da vrši direktno uklanjanje ROS ( $^1O_2$ ,  $OH\bullet$ ), povećava aktivnost antioksidativnih enzima, održava redoks homeostazu (Matysik et al. 2002) i učestvuje u signalnim putevima koji regulišu ekspresiju odgovarajućih gena tokom stresa (Khedr et al. 2003). Pokazano je da koncentracija prolina raste tokom stresa PTE kod određenih vrsta biljaka (Martins et al. 2011). Međutim, njegova uloga nije sasvim jasna u njihovoj detoksifikaciji, budući da to može da bude samo odgovor na narušen vodni balans (Schat et al. 1997). Istovremeno, histidin je aminokiselina koja je najviše povezivana sa hiperakumulatorima nikla (Sharma & Dietz 2006).

Glicin betain je još jedan osmoprotektant uključen u kontrolu vodnog balansa i odbranu biljaka od stresa izazvanog solima (Banu et al. 2009). Pored toga, veoma je važan za pokretanje antioksidativnog sistema biljaka aktiviranjem antioksidativnih enzima (CAT, POD, SOD), čime pomaže u održavanju strukture proteina i membrana ćelija u stresu (Zhang et al. 2008; Rasheed et al. 2017; Ali et al. 2020).

Rastvorljivi šećeri, iako su povezani sa metaboličkim putevima koji stvaraju ROS, mogu imati ulogu i u njihovom uklanjanju. Naime, povećani nivo glukoze dovodi do povećanog stvaranja NADPH koji je primarni elektron-donor u askorbat-glutation ciklusu i obezbeđuje unutarćelijski redoks status (Couée et al. 2006). Van den Ende & Valluru (2009) smatraju da saharoza takođe ima zaštitnu ulogu od stresa zbog svog kapaciteta da uklanja ROS. Trehaloza je neredukujući disaharid koji takođe učestvuje u stabilizaciji membrana i zaštiti proteina pod abiotičkim stresom (Luo et al. 2008). Ona se kod biljaka nalazi uglavnom u niskim koncentracijama (Wingler 2002), ali neke studije povezuju dostupnost ovog disaharida sa odgovorima na stres. Almeida et al. (2005) su našli da transgene biljke duvana koje pokazuju prekomernu ekspresiju trehaloza-6-fosfata imaju veću otpornost prema različitim tipovima abiotičkog stresa (npr. suša i temperatura). Takođe trehaloza štiti ćelije od vodonik peroksida, sprečavajući oksidaciju proteina i membrana.

#### *1.4.2.1. Druge neenzimske supstance uključene u toleranciju PTE*

Metali su retko dostupni u jonskoj formi jer su najčešće vezani sa različitim vrstama organskih molekula sa kojima formiraju metalne ligande. Ovo uključuje organske kiseline kao što su limunska i maleinska, kao i neke aminokiseline (Haydon & Cobbett 2007). Organske kiseline povećavaju rastvorljivost i biodostupnost metala u rizosferi za usvajanje korenovim sistemom. Istovremeno, mnoge organske kiseline kao što su limunska, jabučna, oksalna, malonska, akonitat i tartarat heliraju metale vezujući ih za karboksilne grupe jakim vezama čime nastaju metalni ligandi (Anjum et al. 2015). U ovom obliku se metali transportuju kroz biljku do mesta na kome se koriste ili sekvstriraju, čime se smanjuje mogućnost njihovog vezivanja za komponente ksilema kao i nekontrolisan transport kroz biljku (Anjum et al.

2015; Zhang et al. 2020). Za neke organske kiseline, kao što je jabučna kiselina, pokazano je da umanjuju oksidativni stres kod biljaka reguliranjem neenzimske i enzimske komponente antioksidativnog sistema (Guo et al. 2017). Takođe su citrati i malati opisani kao ligandi Ni i Zn (Haydon & Cobbett 2007).

Metabolizam nekoliko fenolnih jedinjenja se menja pod stresom izazvanim metalima, što indikuje potencijalnu ulogu ovih jedinjenja u njihovoj detoksifikaciji. Naime, utvrđeno je da se smanjuje količina slobodnih jona metala (Kováčik et al. 2009; Jiang et al. 2017; Chen et al. 2019). Akumulacija lignina je takođe opisana kao posledica toksičnosti Cu (Lequeux et al. 2010).

Fitohelatini (PC) su mali peptidi koji vezuju metale, sa strukturom ( $\gamma$ -Glu-Cys) $_n$ -Gly, gde je  $n$  između 2 i 11 (Cobbett & Goldsbrough 2002). Njihova sinteza je katalizovana fitohelatin sintazom, koja koristi glutation kao supstrat (Clemens 2006). Formiraju komplekse sa metalima kao što je Cd, vrše njihovu sekvencijaciju u vakuoli i stoga predstavljaju važan mehanizam za izbegavanje toksičnosti metala u ćeliji.

Poznato je još peptida sa strukturom sličnom onoj kod fitohelatina koji takođe učestvuju u detoksifikacionim mehanizmima biljaka u slučaju izloženosti Cd, ali i As (Vázquez et al. 2009) i Pb (Zhang et al. 2008). Metalotionini (MT) su takođe mali peptidi koji sadrže obično između 60 i 85 aminokiselina (Freisinger 2009). Između ostalog sadrže i cistein u različitim količinama u zavisnosti od vrste MT. Imaju drugačiji sintetski put od fitohelatina (Cobbett & Goldsbrough 2002) i važnu ulogu u kompleksaciji metala, ali i u uklanjanju ROS (Hassinen et al. 2011). Pokazano je da su kod određenih vrsta biljaka mnogo bitniji u toleranciji Cu u odnosu na fitohelatine (Mijovilovich et al. 2009).

## 1.5. Fitoremedijacija

Remedijacija zemljišta opterećenih metalima i metaloidima podrazumeva niz fizičko-hemijskih metoda kojima se postiže njihovo brzo i efikasno uklanjanje iz podloge. Neke od metoda podrazumevaju delimično ili potpuno uklanjanje zagađenog zemljišta i njegovu zamenu nezagađenim zemljištem, tretiranje visokim temperaturama u cilju uklanjanja isparljivih elemenata iz zemljišta (90 °C–500 °C) ili veoma visokim temperaturama (1400 °C–2000 °C) do potpunog sagorevanja organske mase, imobilizaciju metala/metaloida dodavanjem neorganskih ili organskih helatnih jedinjenja, ispiranje zemljišta vodom i različitim reagensima itd. Međutim, ove metode često nisu prikladne za uklanjanje metala sa većih površina jer je neophodno iskopavanje i transport zagađenog površinskog sloja zemljišta, što je tehnički i finansijski zahtevno. Osim toga, neophodna je i primena dodatne mehanizacije čime se povećava upotreba fosilnih goriva što dodatno doprinosi zagađenju životne sredine. Danas se, zato, mnogo ulaže u razvoj ekološki prihvatljivih tehnika remedijacije koje podrazumevaju upotrebu mikroorganizama i biljaka koje efikasno vrše uklanjanje ili imobilizaciju metala kroz niz različitih procesa (Rakić et al. 2021).

Fitoremedijacija je postala efikasno i dostupno rešenje za uklanjanje metala iz zagađenog zemljišta, sedimenta i vode. Ona koristi prednost selektivnog usvajanja zagađujućih materija putem korenovog sistema biljke, zajedno sa translokacijom, bioakumulacijom i sposobnošću razgradnje pojedinih materija unutar biljnih ćelija (Hinchman et al. 1995). Sam naziv metode sastoji se od grčkog prefiksa "*phyto*"- biljka, dodatog na latinski koren "*remedium*"- lek, pomoć. Većina istraživača je definiše kao "*green clean*" tehnologiju koja koristi odabrane vrste biljaka da ukloni zagađujuće supstance iz životne sredine i na taj način poboljša njen kvalitet (Salt et al. 1998; Pilon-Smits 2005).

Osnovne tehnike fitoremedijacije su fitostabilizacija, fitoekstrakcija, rizofiltracija, fitovolatilizacija i fitotransformacija/fitodegradacija (Pilon-Smits 2005; Prasad 2005). Osim

metala i metaloida, fitoremedijacionim tehnikama mogu se uklanjati radionuklidi, nemetali i organski kontaminanti u zemljištu, sedimentima i muljevitom medijumu. Najčešće korišćene tehnike fitoremedijacije su fitoekstrakcija i fitostabilizacija.

Fitostabilizacija je remedijaciona tehnika koja koristi biljke ekskludere kako bi smanjila mobilnost toksičnih elemenata u podlozi i njihovu biodostupnost. To su biljke koje vrše imobilizaciju metala/metaloida u supstratu ili korenu biljke (Prasad & Freitas 2006). Fitostabilizacija se postiže kroz procese kompleksacije sa organskim kiselinama koje biljka izlučuje preko korena u rizosferu (eksudati korena), njihove precipitacije u zoni rizosfere, adsorpcije na površini korena, apsorpcije i akumulacije u korenovima (vezivanjem za ćelijske zidove ili sekvencijom najčešće u vakuoli). Dobrim fitostabilizatorima se smatraju biljke koje su otporne na visoke koncentracije metala, a koje imaju dobro razvijenu podzemnu biomasu (kojom vezuju metale/metaloida) i nadzemnu biomasu, kojima umanjuju eroziju podloge vetrom ili vodom. Najčešće su to zeljaste vrste iz porodice Fabaceae (*Medicago*, *Lotus*, *Trifolium*), Poaceae (*Lolium*, *Festuca*, *Agrostis*, *Typha*, *Phragmites*, *Miscanthus*, *Arundo*), i drvenaste biljke iz rodova *Populus*, *Salix*, *Acer*, *Pinus*, *Leucaena* (Prasad 2005).

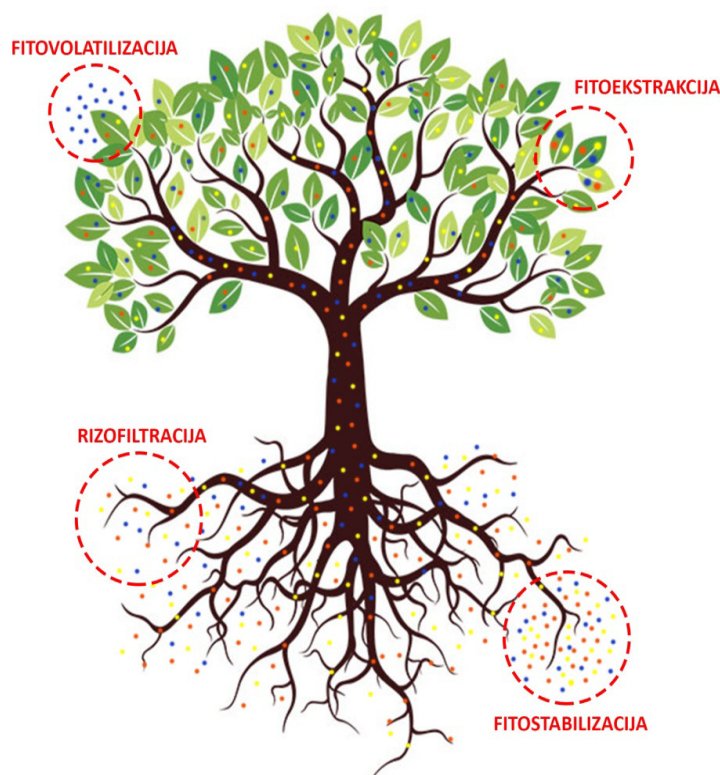
Fitoekstrakcija, sa druge strane, koristi biljke sposobne da apsorbuju i akumuliraju metale i metaloida u visokim koncentracijama u nadzemnom delu biljke. Postiže se izraženim usvajanjem i translokacijom elemenata u nadzemni deo biljke i njihovom sekvencijom u vakuoli ćelija. Transport metala iz korena u nadzemni deo biljke se obavlja prvenstveno putem ksilema, a ređe floema. Ćelijski zidovi ksilemskih elemenata odlikuju se velikom sposobnošću vezivanja jona metala na svojoj površini, pa se zato metali ksilemom prenose vezani za helatna jedinjenja kao što su jabučna, limunska kiselina i histidin. Kada metal uđe u ćeliju, preko transmembranskih transportera prolazi kroz plazmalemu i vezuje se za određeno helatno jedinjenje. U tom obliku se transportuje do vakuole, gde su za prolaz kroz tonoplast opet potrebni transmembranski transporteri, da bi se na kraju u vakuoli inaktivirao vezivanjem za neki od fitohelatina (Jabeen et al. 2009). Posebnu grupu akumulatora čine biljke hiperakumulatori. Hiperakumulatori su podgrupa akumulatorskih vrsta, koja akumulira ekstremno visoke koncentracije metala u listovima i drugim nadzemnim delovima. To su one vrste biljaka koje su sposobne da akumuliraju metale u koncentracijama koje su i do 100 puta više od onih koje su normalno prisutne u biljakama (Antonijević et al. 2012; Alagić et al. 2013; Marić et al. 2013). Pokazano je da mogu koncentrovati metale i do 0,1% suve mase u svom lišću za Ni, Co, Cr, Cu, Al i Pb, 1% za Zn i Mn i 0,01% za Cd i Se (Bhargava et al. 2012). Biljke koje su se pokazale kao dobri fitoekstraktori metala su *Brassica juncea* (Pb, Cu, Ni) (Purakayastha et al. 2008), *Heliathus annuus* (Pb) (Alaboudi et al. 2018), *Zea mays* (Pb) (Ahmad et al. 2011), *Rumex crispus* (Cd, Zn, Pb) (Barrutia et al. 2009), *Sinapis alba* (Pb) (Vasile et al. 2021), *Raphanus sativus* (Zn) (Marchiol et al. 2004), *Amaranthus hypochondriacus* i *Amaranthus mangostanus* (Cd) (Yuan et al. 2014) i hiperakumulatori, kao što su pojedine vrste rodova *Thlaspi* (Zn, Cd) (Assunção et al. 2003), *Alyssum* (Ni) (McGrath & Zhao 2003), *Viola* (As) (Wan et al. 2017) i *Pteris* (As) (Xie et al. 2009).

Rizofiltracija je tehnika u kojoj se koriste vodene biljke i alge za uklanjanje kontaminanata iz otpadnih voda. Takođe, podrazumeva i upotrebu terestričnih biljaka u hidroponskom rastvoru za filtriranje zagađene vode. Korenov sistem biljaka koje su pogodne za rizofiltraciju je veoma dobro razvijen, pa obuhvata veliku površinu vode. Remedijacija se postiže kroz procese rizosferne adsorpcije, apsorpcije, akumulacije i precipitacije polutanata. Primeri algi i vodenih biljaka koje se koriste u rizofiltraciji su *Sargassum* sp., *Myriophyllum* sp., *Elodea* sp., *Azolla* sp., *Lemna* sp., *Eichhornia crassipes*. Terestrične biljke koje su se pokazale pogodne za rizofiltraciju su *Brassica juncea* (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn), *Helianthus annuus* (Pb, U, Cs, St, Cu, Co, Zn), *Typha latifolia* (Pb, Zn) (Pilon-Smits 2005).

Fitovolatilizacija je tehnika koja koristi biljke sposobne da apsorbuju Se, As i Hg iz zemljišta, pretvaraju ih u organska isparljiva jedinjenja unutar ćelija nadzemnog dela biljke i postepeno oslobađaju u atmosferu transpiracijom (Raskin et al. 1997; Pilon- Smits 2005). Glavni proces u biljci je biometilacija do forme gasovitog molekula. Isparljiva metilovana jedinjenja selena su detektovana kod *Astragalus bisculatus*, *Medicago sativa*, *Brassica juncea*, *Typha latifolia* (De Souza et al. 2000). Međutim, biljke ne mogu da izvrše direktnu metilaciju Hg i As, već usvajaju metilovane forme produkovane od strane mikroorganizama.

Fitotransformacija/fitodegradacija je remedijaciona tehnika koja koristi biljke koje pomoću svojih enzima razgrađuju kontaminante kroz metaboličke procese. Ovim procesom mogu biti tretirani organski polutanti koji se razgrađuju na jednostavne neorganske molekule ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}_2$ ) ili stabilna organska jedinjenja koja se akumuliraju u vakuoli i apoplastu korena i lista, pa se označavaju kao vezani rezidualni produkti.

Rizodegradacija/fitostimulacija je vid remedijacije koji podrazumeva degradaciju polutanata u zoni rizosfere delovanjem mikroorganizama koji žive u mutualističkom odnosu sa biljkom. Zasniva se na sposobnosti biljaka da modifikuju zonu rizosfere (Rainbird et al. 2018), oslobađajući jedinjenja koja stimulišu mikrobijalnu aktivnost, odnosno razgradnju polutanata (Truu et al. 2015). Biljne vrste i alge koje se koriste u svrhu biodegradacije su hibridi u okviru rodova *Populus* i *Salix*, *Chara* sp., itd.



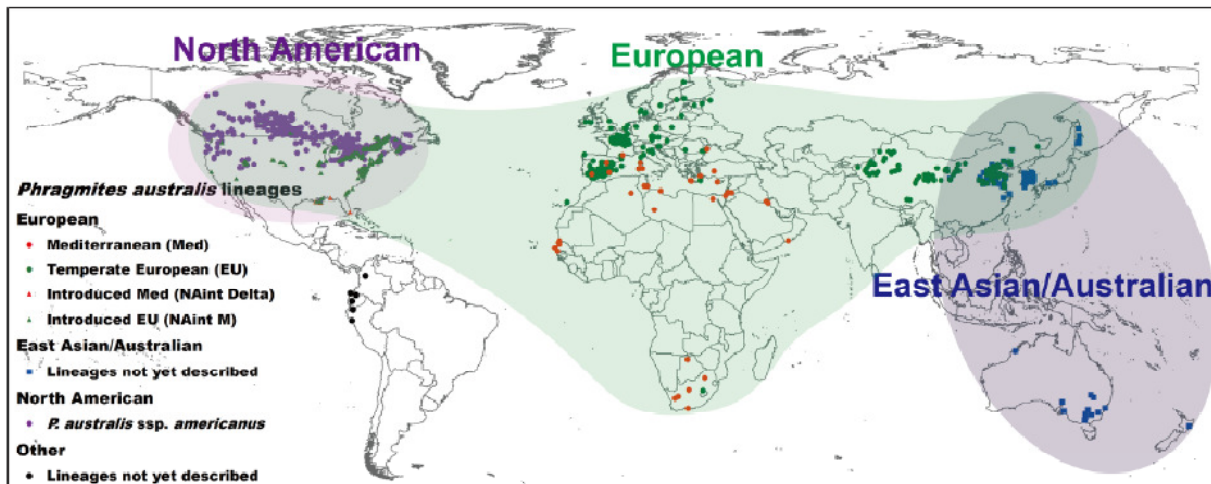
Slika 3. Osnovne tehnike fitoremedijacije.

### 1.5.1. Uloga *Phragmites australis* u fitoremedijaciji

Geografska distribucija trske (*Phragmites australis*) (Slika 4) obuhvata prvenstveno Evropu i Aziju, ali je široko rasprostranjena i u Severnoj Americi i različitim regionima Južne Amerike i Australije (Srivastava et al. 2014; Mykleby et al. 2016). Vezana je za vlažna staništa od hladnih i umerenih oblasti, do toplih i vlažnih tropskih oblasti na gotovo svim



kontinentima, a naročito u Aziji i Evropi (Vymazal 2013). *Phragmites australis* je višegodišnja trava iz familije Poaceae, sa nadzemnim izdancima koji dostižu visinu od 2–6 m, dok podzemni izdanci (rizomi) mogu ići u dužinu od 6–10 m. Njen ekstenzivan sistem rizoma može ići u dubinu od 0,6–1 m (Vymazal 2013).



Slika 4. Geografska distribucija *P. australis* (preuzeto iz Eller et al. 2017).

Poznato je da ova vrsta ima široku ekološku valencu prema brojnim ekološkim faktorima, kao što su nadmorska visina, temperatura, salinitet, koncentracija nutrijenata, organskih i neorganskih polutanata, itd. (Eller et al. 2017). Međutim, ekstremne vrednosti pojedinih ekoloških faktora dovode do promena u morfologiji i fiziologiji vrste. Tako su Hurry et al. (2013) našli da visok salinitet u Gippsland jezerima (oko 3%) ima negativan efekat na rast trske. Pri takvim uslovima dužina izdanka se smanjuje, kao i dužina i širina listova. Nasuprot tome, povećana koncentracija nutrijenata dovodi po povećanja relativne stope rasta. Tako na primer, dodavanje nitrata i fosfata pozitivno utiče na produkciju biomase ove vrste (Uddin & Robinson 2018). Oscilacije nivoa vode takođe imaju efekta na rast biljke u terestričnim ekosistemima budući da su prosečne dužine stabla i njihov dijametar bili veći nego kod biljaka u plavljenim zonama (Zhao et al. 2013). Faktori kao što su pH zemljišnog rastvora, dostupnost azota, mesto na kome raste trska imaju značajan uticaj na prinos biomase. Nadzemna biomasa u prirodnim eutrofnim ekosistemima dostiže svoj maksimum kroz 3–5 godina (Vymazal & Krópfelová 2005). Sposobnost trske za uklanjanje nutrijenata iz otpadnih voda procenjuje se od 70-ih godina prošlog veka. Tako je utvrđeno da je akumulacija nutrijenata i metala najveća između aprila i novembra zbog intenzivnog rasta biljaka (Mulkeen et al. 2017). Prema Bhatia & Goyal (2014) trska se može koristiti u tretmanu primarnih, sekundarnih i tercijernih otpadnih voda poreklom iz domaćinstava ili industrije. Jednostavno gajenje i visok potencijal za uklanjanje otpadnih materija čini ovu vrstu pogodnom za korišćenje u navedenim procesima. U sistemu sa dovoljno kiseonika, trska može da imobilizuje velike količine fosfora u kratkom vremenskom periodu (Lan et al. 2018). Fountoulakis et al. (2017) su određivali sposobnost trske za uklanjanje nutrijenata iz otpadnih voda poreklom iz domaćinstava. Koncentracija organskih polutanata (COD) u otpadnim vodama je višestruko smanjena (sa  $224 \pm 41$  na  $47 \pm 12$  mg l<sup>-1</sup>) upotrebom trske. Izraženo u procentima, efikasnost remedijacije iznosila je 78–79%. Sadržaj azota je takođe smanjen, sa efikasnošću remedijacije od 20–30% tokom perioda od 8 meseci (mart–oktobar). Liang et al. (2017) su ustanovili da kombinacija trske i drugih emerznih vrsta može da ukloni između 40 i 80% organskih zagađujućih supstanci iz otpadnih voda sa visokim koncentracijama rastvorenih soli.

Zahvaljujući razvijenim mehanizmima tolerancije, trska je sposobna da usvoji velike količine metala (Huang et al. 2018) i da ih akumulira u biljnim delovima u različitim koncentracijama, najčešće na sledeći način: koren> rizom> list> stablo (Vymazal & Březinová 2016). Najveća količina metala se zadržava na nivou korena, što ovu vrstu čini dobrim kandidatom za fitostabilizaciju. Rzymiski et al. (2014) su opisali da se Cr, Cd, Cu, Co, Fe, Pb, Mn, Ni i Zn akumuliraju na nivou korena, dok je za Cd i Pb primećena i značajna translokacija u listove. Generalno niska translokacija metala u nadzemne delove biljke i visok bioakumulacioni kapacitet čine trsku atraktivnom za fitostabilizaciju metala kao što su Zn, Mn, Pb i Cu (Klink 2017). Kombinacija *Phragmites australis*, *Typha angustifolia* i *Eichornia crassipes* koristi se za uklanjanje 60–80% Fe, Cu, Mn, Zn, Ni i Cd iz otpadnih voda industrije celuloze i papira (Arivoli et al. 2015). Marchand et al. (2014) su našli da je kombinacija *P. australis*, *J. articulatus* i *P. arundinacea* u sklopu veštačkih vlažnih ekosistema uspešno uklonila od 7 do 90% ukupnog bakra. Takođe, trska je pokazala odličan potencijal za uklanjanje metala iz sedimenta i to Co, Ni, Mo, Cd, Pb, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn i Zn pre svega podzemnom biomasom tokom perioda od 10 godina, dok As i Se zahtevaju još duže periode za remedijaciju zemljišta (Cicero-Fernández et al. 2017). U smislu akumulacionog faktora (AF), koji predstavlja odnos koncentracije datog metala u biljnom delu i ukupne koncentracije tog metala u podlozi, za metale kao što su Mn, Ni, Zn, As, Al, Co i Fe opseg AF je bio od 0,03–18,7 za sediment opterećen metalima (Shaheen et al. 2019).



## 2. CILJEVI RADA

Iako je *Phragmites australis* jedna od do sada intenzivno istraživanih vrsta u smislu geografske distribucije, raznovrsnosti ekoloških uslova koje naseljava i genetičkog diverziteta postoji jasna potreba za proučavanjem njene sposobnosti da toleriše ekstremne uslove sredine koji su posledica savremenih ekoloških promena klime, zagađenja zemljišta i formiranja specifičnih tipova tehnosola opterećenih velikim brojem toksičnih jedinjenja.

*P. australis* se odlikuje izrazitom fenotipskom plastičnošću i ekstenzivnom ekološkom amplitudom koja joj omogućava da uspešno naseljava staništa sa višestrukim tipovima stresa. Iako je do sada u više navrata istraživana njena sposobnost da toleriše i usvaja metale iz metalima antropogeno zagađenih prirodnih podloga, detaljnija istraživanja na biljkama koje spontano obrastaju tehnosole koji se odlikuju ekstremno nepovoljnim edafskim uslovima, kakvi su na deponijama jalovine, do sada nisu vršena. Jalovina koja nastaje u procesu obrade ruda metala (rudnička ili flotaciona) predstavlja tip tehnosola koji se odlikuje brojnim nepovoljnim fizičkim i hemijskim karakteristikama koje ograničavaju i često potpuno onemogućavaju rast i život biljaka. To su pre svega nepovoljan granulometrijski sastav, visoke koncentracije većeg broja metala, prisustvo procesnih hemikalija, izražen nedostatak makroelemenata i organske materije i nepovoljan vodni režim. Jalovina predstavlja potencijalnu opasnost za životnu sredinu budući da je izuzetno podložna eolskoj i vodnoj eroziji, zbog čega velika količina potencijalno toksičnih elemenata lako dospeva u životnu sredinu. Stoga bi istraživanja *P. australis* koja spontano nastanjuje jalovinu i živi u ekstremnim edafskim uslovima proširila dosadašnja znanja o njenoj ekološkoj plastičnosti i omogućila nove podatke o mogućnosti upotrebe obične trske u prečišćavanju voda i sedimenta ekstremno zagađenog većim brojem metala.

Ovo istraživanje zasnovano je na sledećim hipotezama:

- Visoke koncentracije metala u podlozi dovode do povećane koncentracije istih metala u biljci,
- *Phragmites australis* poseduje mehanizme koji omogućavaju slabiju transkolaciju metala u nadzemne organe,
- Apsorbovani metali se uspešno inaktiviraju/imobilizuju u ćelijskom zidu ili unutar ćelije,
- Biljke *P. australis* imaju dobar antioksidativni sistem koji im omogućava zaštitu od povećanih koncentracija ROS koji nastaju u prisustvu povišenih koncentracija metala,
- Biljke *P. australis* se mogu potencijalno gajiti u cilju fitostabilizacije sedimenta bogatog metalima, prečišćavanju voda pre njihovog ispuštanja iz flotacijskih jezera rudnika u životnu sredinu, kao i dreniranja iz starih jalovišta.

Osnovni ciljevi istraživanja u okviru ove disertacije obuhvataju:

- Utvrđivanje hemijskih odlika jalovine na kojoj su rasle biljke,
- Određivanje nivoa usvajanja metala i njihove translokacije kroz biljku,
- Utvrđivanje fitoremedijacionog potencijala *Phragmites australis* na osnovu biokoncentracionog (BCF), bioakumulacionog (BAF) i translokacionog faktora (TF),
- Lokalizaciju metala na nivou biljnih tkiva u cilju boljeg razumevanja mehanizama za uklanjanje i inaktiviranje metala u tkivima podzemnih i nadzemnih biljnih delova,

- Proučavanje otpornosti vrste *Phragmites australis* na osnovu biohemijskih parametara koji se koriste kao standardne procedure za procenu stepena stresa i oštećenja kod biljaka izazvanih potencijalno toksičnim elementima,
- Procena efikasnosti dugoročnog gajenja ovih biljaka u cilju fitostabilizacije sedimenta bogatog metalima i potencijalnog uticaja na poboljšanje kvaliteta voda koje se iz prelivnog sistema flotacijskih jezera rudnika ispuštaju u životnu sredinu.



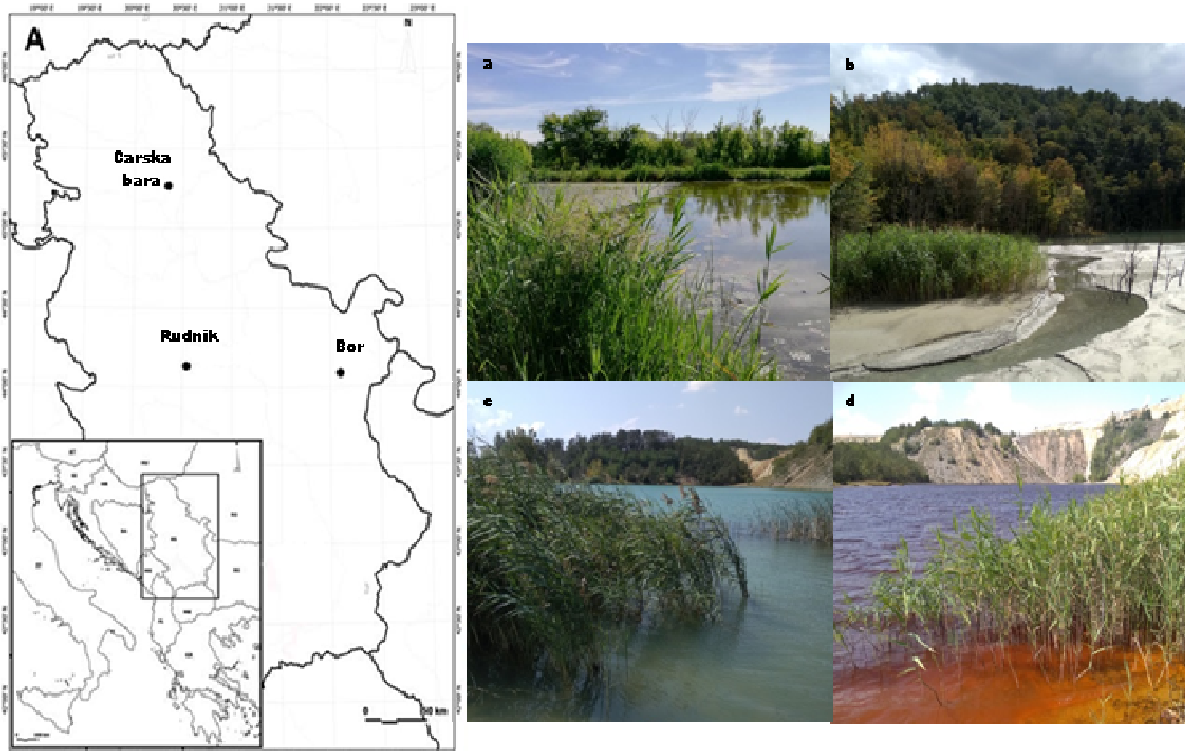
Slika 5. Šematski prikaz predmeta istraživanja doktorske disertacije.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Opis lokaliteta

Biljni materijal i odgovarajući sediment sakupljeni su tokom juna i septembra 2018. godine na lokalitetima (Slika 5.):

- "Carska bara" (severna Srbija, 45°16'10"N, 20°24'51"E) - Specijalni rezervat prirode,
- "Rudnik" (centralna Srbija, 44°06'19"N, 20°29'14"E) - odlagalište flotacione jalovine,
- "Bor" (istočna Srbija, 44°01'1"N, 22°08'29"E i 44°03'51"N, 22°08'14") - odlagališta rudničke i flotacione jalovine.



Slika 6. Lokaliteti na kojima je vršeno uzorkovanje prikazani na karti Srbije (A); zajednice trske na kontrolnom lokalitetu Carska bara (a); zajednice trske na odlagalištu flotacione jalovine na lokalitetu Rudnik (b); zajednice trske ispod odlagališta rudničke jalovine na lokalitetu Bor 1 (c); zajednice trske ispod odlagališta flotacione jalovine na lokalitetu Bor 2 (d).

Uzorcima prikupljeni na lokalitetu Carska bara uzeti su kao kontrolni, budući da je nezagađen metalima. Specijalni rezervat prirode "Carska bara" obuhvata područje duž gornjeg toka reke Begej. Predstavlja kompleks barsko-močvarnih, šumskih, livadskih, stepskih i slatinskih ekosistema sa velikim diverzitetom. Ovaj prostor čine staništa mnogih endemičnih i reliktnih vrsta (Glavonjić et al. 2018). Na obodnim delovima močvarnih ekosistema javljaju se guste zajednice sa dominacijom vrsta *Phragmites australis* i *Typha latifolia*.

U rudniku i flotaciji "Rudnik", lociranom na istoimenoj planini, vrši se ekstrakcija Pb, Zn i Cu iz polimetalne rude. Otpad generisan tokom eksploatacije rude istače se u vidu pulpe u flotaciono jezero. Na obodnim delovima jezera javljaju se zajednice u kojima dominiraju vrste *Phragmites australis* i *Typha latifolia*.

Rudarsko-topioničarki basen "Bor", smešten u gradu Boru, primarno se bavi eksploatacijom rude bakra. Tokom ovog procesa generiše se velika količina otpada u vidu rudničke i flotacione jalovine. Na obodnim delovima jezera ispod odlagališta rudničke (Bor 1) i odlagališta flotacione jalovine (Bor 2) jasno se izdvajaju zajednice u kojima dominira *Phragmites australis*.

### 3.2. Prikupljanje uzoraka i hemijske analize sedimenta

Prikupljanje uzoraka sedimenta izvršeno je tokom juna 2018. godine. Sediment je uzorkovan na dubini od 0–20 cm, što odgovara zoni rizosfere. Uzorci su potom sušeni na vazduhu. Usitnjeni su pomoću tučka i avana, prosejani kroz sito sa prečnikom pora 0,5 mm i osušeni na 65°C do konstantne mase. U okviru ispitivanja sedimenta rađene su sledeće analize u cilju određivanja:

- pH zemljišnog rastvora,
- sadržaja organskog ugljenika,
- sadržaja ukupnog azota,
- koncentracija lako pristupačnih oblika fosfora i kalijuma ( $P_2O_5$  i  $K_2O$ ),
- koncentracija pristupačnih frakcija Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Cd, Cr i Co,
- pseudo-totalne koncentracije Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Cd, Cr i Co.

#### 3.2.1. Određivanje pH zemljišnog rastvora

Deset grama vazdušno osušenog sedimenta pomešano je sa 25 ml redestilovane vode. pH vrednost je izmerena direktno u suspenziji sedimenta i vode prema potenciometrijskoj metodi ISO 10390:1994, pomoću pH-metra Iskra MA 5730. Dobijena vrednost predstavlja tzv. aktivnu kiselost. U suspenziji sedimenta (10 g) i 1M KCl (25 ml) određena je supstituciona kiselost.

#### 3.2.2. Određivanje sadržaja organskog ugljenika i organske materije

Prethodno osušenom zemljištu mase 0,05–0,5 g dodato je 10 ml 0,07M rastvora  $K_2Cr_2O_7$  u 48%  $H_2SO_4$ . Ova smeša je u prisustvu katalizatora ( $Ag_2SO_4$ ) zagrevana do ključanja, a zatim je dodato 30 ml redestilovane vode. Titracija je izvršena 0,1M rastvorom Morove soli (gvožđe-II-amonijum-sulfat -  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6H_2O$ ). Kao indikator je korišćena fenilantranilna kiselina (Tyrim 1965). Sadržaj organskog ugljenika je izračunat prema formuli:

$$C_{org}(\%) = ((A - B) \times F \times 0,0003 \times 100) \div m$$

gde je: A – zapremina rastvora Morove soli utrošene za titraciju slepe probe (ml); B - zapremina rastvora Morove soli utrošene za titraciju uzorka (ml); F – faktor normaliteta Morove soli; 0,0003 – 1 ml 0,1N  $K_2Cr_2O_7$  je ekvivalentan sa 0,0003 g organskog C; m – masa uzorka zemljišta (g).

Sadržaj organske materije u podlozi (SOM) je određen prema formuli koju je dao Jackson (1958), uzimajući da je prosečan procenat ugljenika u organskim jedinjenjima oko 58% i uključujući Von Bemmelen faktor (1,72):

$$\text{Organska materija (\%)} = C_{org}(\%) \times 1,72$$

#### 3.2.3. Određivanje sadržaja ukupnog azota

Sadržaj ukupnog azota je određen semimikro-Kjeldalovom metodom (Bremner 1996). Za analizu je korišćen 1 g osušenog zemljišta pomešan sa 2 ml redestilovane vode.

Mineralizacija je vršena u 3 ml cH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> uz dodatak katalizatora (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub> + Se, 100:10:1, w/w/w) pri temperaturi od 330°C. Nakon tri sata digestije, sav azot iz uzorka je preveden u amonijačni jon koji se oslobađa u prisustvu NaOH. Destilat je sakupljen u 5 ml rastvora 0,3M borne kiseline u prisustvu smeše indikatora metil oranž-bromkrezol zeleno. Zapremina 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utrošena za titraciju korišćena je za određivanje ukupnog azota u rastvoru prema formuli:

$$N(\%) = ((A - B) \times 0,28 \times 100) \div m$$

gde je: A - zapremina 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utrošena za titraciju uzorka (ml); B - zapremina 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utrošena za titraciju slepe probe (ml); 0,28 - faktor konverzije (1 ml 0,01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utrošen za titraciju vezuje 0,28 mg amonijačnog azota); m - masa uzorka zemljišta (mg).

### 3.2.4. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika fosfora

Koncentracija fosfora u obliku dostupnom biljkama određena je spektrofotometrijski metodom po Egner-Reihm-u (Egner et al. 1960). Pet grama vazdušno osušenog zemljišta pomešano je sa 10 ml ekstrakcionog rastvora<sup>1</sup> i 90 ml redestilovane vode. Zatim je smeša mučkana tokom dva sata na rotacionoj mešalici (temperatura 20 ± 2°C, brzina rotacije 30 obrtaja/min). Po završetku ekstrakcije uzorci su filtrirani (Sartorius, no 391). Reakciona smeša sadržala je 5 ml ekstrakta, 7,5 ml molibdenovog reagensa<sup>2</sup> i 0,5 ml rastvora 1% SnCl<sub>2</sub> u 1% askorbinskoj kiselini. Apsorbanca uzoraka merena je na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800) na talasnoj dužini od 580 nm. Na osnovu apsorbaneci standardnih rastvora poznatih koncentracija dobijena je kalibraciona kriva pomoću koje je određena koncentracija lako pristupačnih oblika fosfora u uzorcima sedimenta.

### 3.2.5. Određivanje koncentracije lako pristupačnih oblika kalijuma

Uzorci za određivanje koncentracije pristupačnog kalijuma su pripremljeni prema metodi korišćenoj za određivanje koncentracije pristupačnog fosfora. Nakon filtriranja, koncentracija kalijuma je merena na atomskom apsorpcionom spektrofotometru (Shimadzu AA-7000) na talasnoj dužini od 766,5 nm. Kalibraciona kriva na osnovu koje je izračunata koncentracija K u uzorcima dobijena je nakon merenja apsorbaneci standardnih rastvora poznatih koncentracija.

### 3.2.6. Određivanje pseudototalnog sadržaja metala

Pseudototalni sadržaj metala Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Cr i Co u sedimentu određen je prema metodi Jones & Case (1990). Digestija 5 g osušenog sedimenta je vršena u cHNO<sub>3</sub> na temperaturi od 150°C. Nakon hlađenja uzorci su dopunjeni do zapremine od 50 ml redestilovanom vodom i filtrirani kroz kvantitativni filter papir (Sartorius, no 391). Apsorbance uzoraka su merene na AAS (Shimadzu AA-7000) na različitim talasnim dužinama u zavisnosti od metala, a koncentracije su izračunate na osnovu kalibracionih kriva dobijenih merenjem apsorbaneci rastvora poznatih koncentracija metala. Nivoi detekcije za AAS (Shimadzu AA-7000) za ispitivane metale su sledeći: Fe (0,05 mg kg<sup>-1</sup>), Mn (0,005 mg kg<sup>-1</sup>), Ni (0,05 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (0,005 mg kg<sup>-1</sup>), Pb (0,02 mg kg<sup>-1</sup>), Cu (0,015 mg kg<sup>-1</sup>), Cd (0,05 mg kg<sup>-1</sup>), Cr (0,05 mg kg<sup>-1</sup>), Co (0,03 mg kg<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup> Ekstrakcioni rastvor sastoji od 100 g mlečne kiseline i 200 ml destilovane vode hidrolizirane na 95°C tokom 48 sati. Hidrolizovanoj mlečnoj kiselini dodaje se 178,5 ml 96% sirćetne kiseline i 77 g amonijum acetata. Zatim se rastvor dopuni destilovanom vodom do 1 l.

<sup>2</sup> Molibdenov reagens: 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> × 4H<sub>2</sub>O rastvara se u 40 ml destilovane vode uz zagrevanje (50°C). Nakon hlađenja dodaje se 40 ml 10M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i rastvor se dopunjava destilovanom vodom do 1 l.

### 3.2.7. Određivanje sadržaja pristupačnih metala

Sadržaj pristupačnih metala Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cu, Cd, Cr i Co je određen prema metodi Pansu & Gautheyrou (2006). Dva i po grama osušenog sedimenta pomešano je sa 50 ml rastvora 1M amonijum-acetata i 0,01M EDTA (pH 7,0). Uzorci su mučkani na rotacionoj mešalici (temperatura  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , brzina rotacije 30 obrtaja/min) tokom 2 sata, nakon čega su filtrirani kroz kvantitativni filter papir (Sartorius, no 391). Apsorbance metala u uzorcima su merene na AAS (Shimadzu AA-7000), a njihove koncentracije su izračunate na osnovu kalibracionih kriva dobijenih merenjem apsorbanca rastvora poznatih koncentracija.

## 3.3. Prikupljanje i analize biljnog materijala

Prikupljanje biljnog materijala vršeno je tokom juna i septembra 2018. godine. Na svakom lokalitetu uzorkovanja prikupljeno je 5 biljaka unutar polja  $10\text{ m} \times 2\text{ m}$ . Svaka biljka je pažljivo izvađena i prenesena zajedno sa sedimentom do laboratorije, gde je vršena priprema za dalje analize. Biljni materijal je razdvojen na korenove, rizome, stabla i listove. Opran je česmenskom i destilovanom vodom. Materijal namenjen za biohemijske analize je odmah nakon pranja zamrznut na  $-70^\circ\text{C}$ . Materijal za analizu elemenata je osušen na vazduhu, zatim usitnjen pomoću tučka i avana i potom sušen na  $105^\circ\text{C}$  do konstantne mase.

### 3.3.1. Određivanje ukupnog sadržaja metala

Za određivanje ukupnog sadržaja metala (Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, Cd, Cr, Co) u biljkama korišćena je metoda prema Jones & Case (1990). Jedan gram biljnog materijala je mineralizovan u 10 ml  $\text{cHNO}_3$  na  $150^\circ\text{C}$ . Nakon hlađenja uzorci su dopunjeni redestilovanom vodom do finalne zapremine od 50 ml i filtrirani kroz kvantitativni filter papir (Sartorius, no 391). Apsorbance elemenata su merene na AAS (Shimadzu AA-7000), a koncentracije metala su izračunate na osnovu kalibracionih kriva dobijenih merenjem apsorbanca rastvora poznatih koncentracija.

Stehiometrijski odnosi elemenata u biljkama izraženi kao molarni (atomski) odnos metala, nakon konverzije koncentracije metala iz  $\text{mg kg}^{-1}$  u  $\text{mol kg}^{-1}$ .

### 3.3.2. Određivanje fitoremedijacionog potencijala *Phragmites australis*

Fitoremedijacioni potencijal trske određen je na osnovu biokoncentracionog (BCF), bioakumulacionog (BAF) i translokacionog faktora (TF). BCF predstavlja odnos koncentracije elementa u korenu i njegove dostupne koncentracije u podlozi. BAF predstavlja odnos koncentracije elementa u određenom biljnom delu (listu) i njegove dostupne koncentracije u podlozi. Ove vrednosti nam daju informaciju o sposobnosti biljke da akumulira elemente u korenu/listu i efikasno vrši njihovo uklanjanje iz podloge (Ghosh & Singh 2005).

$$\text{BCF} = C_{\text{elementa}_{\text{koren}}} \div C_{\text{elementa}_{\text{sediment}}}$$

$$\text{BAF} = C_{\text{elementa}_{\text{list}}} \div C_{\text{elementa}_{\text{sediment}}}$$

Translokacioni faktor (TF) predstavlja odnos koncentracije određenog elementa u listu i njegove koncentracije u korenu. Daje nam informaciju o sposobnosti biljke da efikasno vrši transfer elementa od korena do lista, u kom se skladišti na odgovarajući način (Ghosh & Singh 2005).

$$\text{TF} = C_{\text{elementa}_{\text{list}}} \div C_{\text{elementa}_{\text{koren}}}$$

### 3.3.3. Histochemijska detekcija metala u biljnim tkivima

Za histochemijsku detekciju metala (Pb, Cu i Zn) korišćen je svež biljni materijal. Ručno napravljeni preseki korena, rizoma, stabla i listova potapani su u rastvore boja i nakon nekoliko minuta posmatrani su pod mikroskopom (ZeissAxioImager M.1). Fotografije su dobijene pomoću AxioCam MR5 kamere, uz korišćenje AxioVision version 4.8 softvera za njihovu obradu.

Za histochemijsku lokalizaciju Pb i Cu korišćen je 0,2% rastvor Na-rodizonata uz dodatak kapi sirćetne kiseline. Rodizonat sa Pb pri neutralnoj pH gradi kompleks plavoljubičaste boje, dok sa Cu formira kompleks narandžastocrvene boje (Feigl & Suter 1942). Za lokalizaciju Zn u biljnim tkivima korišćeno je 0,0065 g boje cinkon rastvorene u 0,2 ml 1M NaOH u boraksu ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ ), a zatim je dodata voda do finalne zapremine od 10 ml. Ovako dobijeni rastvor je zagrevan tokom 10 minuta na temperaturi od 80°C. Za bojenje je korišćen rastvor ohlađen do sobne temperature. Cinkon zajedno sa Zn gradi kompleks plave boje (Seregin & Kozhevnikova 2011).

### 3.3.4. Detekcija metala u biljnim tkivima pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa energo-disperzivnom spektrofotometrijom (SEM-EDS)

Za fiksaciju biljnog materijala (koren, rizom, stablo, list) korišćeni su apsolutni metanol i etanol, prema opštem protokolu za SEM (Talbot & White 2013). Uzorci su zatim podvrgnuti procesu liofilizacije (Laboratory freeze dryer Alpha 2-4 LSCplus), nakon čega je vršeno naparavanje zlatom u uređaju za naparavanje (BALTEC SCD005 Sputter Coater). Morfološka i hemijska analiza biljnog materijala izvršena je metodom skenirajuće elektronske mikroskopije (JEOL, JSM-6460LV) i korišćenjem EDS programa (Oxford, INCA).

### 3.3.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenta

Sadržaj hlorofila (Chl *a*, Chl *b*) i ukupnih karotenoida (Car) u listovima određen je metodama opisanim od strane Hiscox & Israelstam (1979). Odsecci svežih listova ( $\approx 0,02\text{g}$ ) preliveni su sa 1 ml dimetil-sulfoksida (DMSO) i zagrevani na 65°C do obezbojavanja. Nakon toga izmerene su apsorbanse pigmenta u uzorcima na talasnim dužinama od 480 nm, 663 nm i 645 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1800. Koncentracije hlorofila izračunate su na osnovu formula prema Arnon (1949) i izražene u miligramima pigmenta po gramu suve mase lista ( $\text{mg g}^{-1}$  suve mase):

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

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

gde je  $V_{\text{DMSO}}$  izražena u gramima;

Sadržaj ukupnih karotenoida u listovima izračunat je prema formulama koje je dao Wellburn (1994) i izražen kao miligrami pigmenta po gramu suve mase lista ( $\text{mg g}^{-1}$  suve mase):

$$\text{Car} = \frac{(1000 \times A_{480} - 2,14 \times \text{Chl } a - 70 \times \text{Chl } b)}{(1000 \times 220 \times m_{\text{odsečka}})}$$

### 3.3.6. Određivanje sadržaja fenola u listovima

Sadržaj slobodnih i vezanih fenola određen je metodom prema Feldman & Hanks (1968). Za određivanje slobodnih formi fenola odsečak lista ( $\approx 0,02\text{g}$ ) stavljen je u ependorf tubu sa 1 ml 80% etanola i zagrevan tokom 2 h na  $60^\circ\text{C}$ . Dobijeni ekstrakt korišćen je u reakciji za dokazivanje slobodnih formi fenola u prisustvu Folin-Ciocalteu reagensa. Isti odsečak lista korišćen je za dalje određivanje sadržaja vezanih fenola u listu. U ependorf tubu sa odsečkom dodato je 1 ml DMSO i zagrevano tokom 2 h na  $60^\circ\text{C}$ , nakon čega je dodato 0,5 ml 2M HCl i zagrevanje je nastavljeno naredna 2h na  $60^\circ\text{C}$ . Dobijeni ekstrakti rastvoreni su u 7 ml redestilovane vode u koje je dodato 0,1 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 0,2 ml 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Epruvete sa reakcionom smešom zagrevane su u vodenom kupatilu na  $100^\circ\text{C}$  tokom 15 min. i ohlađene pod mlazom hladne vode. Očitavanje apsorbanci vršeno je na 660 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800). Standardna kriva na osnovu koje su izračunate koncentracije fenola u uzorcima dobijena je merenjem apsorbanci rastvora ferulinske kiseline poznatih koncentracija. Koncentracije fenola su izražene u  $\text{mg g}^{-1}$  suve mase lista.

### 3.3.7. Određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta

Ukupni antioksidativni kapacitet (TAC) korena i lista je određen prema metodi Brand-Williams et al. (1995). Metoda se zasniva se na prelasku 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 žute boje koji se formira u prisustvu antioksidanasa. Za dobijanje etanolnog ekstrakta korišćeno je oko 0,2 g svežeg biljnog materijala (koren, list). Materijal sprašen u tečnom azotu prenesen je u ependorf tube, a zatim mu je dodato 2 ml 96% etanola. Biljni materijal je potom inkubiran tokom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, materijal je centrifugiran tokom 15 minuta na  $12\,000 \times g$ . Dobijeni supernatant je korišćen za dalju analizu. Svaki uzorak je analiziran u tri rastuće zapremine (20  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$  i 100  $\mu\text{l}$ ). Reakciona smeša sadržala je uzorak u navedenim zapreminama, 400  $\mu\text{l}$  metanolnog rastvora DPPH i 580  $\mu\text{l}$ , odnosno 550  $\mu\text{l}$  i 500  $\mu\text{l}$  metanola. Smeša je potom inkubirana na sobnoj temperaturi u mraku tokom 60 min, da bi se odigrala reakcija sa DPPH. Stepenu redukcije DPPH radikala se određuje nakon merenja apsorbance na 517 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800). Izražava u procentima potrošenog DPPH:

$$\text{TAC (\%)} = \frac{(A_0 - A_1) \times 1000}{A_0}$$

gde je:  $A_0$  – apsorbance slepe probe;  $A_1$  – apsorbance uzorka

### 3.3.8. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Određivanje stepena oksidativnih oštećenja membranskih lipida (LP) izazvanih reaktivnim kiseoničnim vrstama zasnovano je na određivanju količine malondialdehida (MDA), produkta peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Količina MDA određena je prema metodi Heath & Packer (1968), kasnije modifikovanoj od strane Hodges et al. (1999). Za dobijanje ekstrakta 0,5 g svežeg biljnog materijala (koren, list) sprašeno je u tečnom azotu u avanu i zatim je dodato 5 ml 10% rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA). Uzorci su potom centrifugirani tokom 10 minuta na  $3000 \times g$ . Reakciona smeša sadržala je 1 ml supernatanta, 4 ml 20% TCA (u kojoj je bilo 0,65% tiobarbiturne kiseline (TBA) i 0,01% dibutilhidroksitoluena (BHT)). Potom je smeša zagrevana u vodenom kupatilu na  $95^\circ\text{C}$  tokom 25 min. Reakcija je zatim naglo prekinuta hlađenjem epruveta na ledu. Uzorci su centrifugirani tokom 10 min na  $3000 \times g$ . Apsorbance su merene spektrofotometrijski na talasnim dužinama od 440 nm, 532 nm i 600 nm (Shimadzu UV-1800). MDA ekvivalenti su



izračunati prema formuli Hodges et al. (1999) i izraženi kao nmol MDA g<sup>-1</sup> suve mase korena ili lista:

$$\text{MDA} = \frac{((A_{532} - A_{600}) - (A_{440} - A_{600}) \times 0,0571) \times 10^6 \times V}{157000 \times m}$$

gde 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 korišćenog ekstrakta (ml); m – masa suvog uzorka (g)

### 3.3.9. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Određivanju koncentracije proteina i aktivnosti antioksidativnih enzima prethodila je ekstrakcija proteina iz biljnog materijala (koren, list). Biljni materijal (≈ 0,5 g) ekstrahovan je u smeši koja je sadržala 100 mM K-fosfatni pufer pH 7,0, 0,1 mM EDTA i 5% polivinilpirolidon (PVP). Biljni materijal je sprasjen u tečnom azotu u avanu. Dobro usitnjen biljni materijal prebačen je u ependorf tube u koje je zatim dodato 100 µl ekstrakcione smeše. Uzorci su držani na ledu i povremeno vorteksirani tokom 30 min. Nakon izvršene ekstrakcije proteina uzorci su centrifugirani na 15000 × g u trajanju od 20 minuta, na temperaturi od 4°C. Dobijeni supernatant je dalje korišćen za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima.

Koncentracija proteina u biljnom materijalu određena je spektrofotometrijski metodom prema Bradford (1976). Princip na kome se zasniva je merenje promene boje komazi plavo (engl. *Coomassie blue*) u braon boju koja nastaje nakon formiranja kompleksa između proteina i same boje u kiseloj sredini. Reakciona smeša za određivanje koncentracije proteina sadržala je 200 µl Bradfordovog reagensa, 790 µl redestilovane vode i 10 µl uzorka. Asporbanca uzoraka merena je na talasnoj dužini od 595 nm (Shimadzu UV-1800). Koncentracija proteina izračunata je na osnovu krive dobijene očitavanjem apsorbanci standardnih rastvora goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin* - BSA) poznatih koncentracija, a izražena je u mg ml<sup>-1</sup>.

### 3.3.10. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema

Aktivnost nekoliko enzima antioksidativnog sistema određena je na temperaturi od 25°C u prethodno pripremljenim ekstraktima proteina korena i lista trske. Određene su aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), ukupnih rastvorljivih peroksidaza (POD) i glutation reduktaze (GR).

#### 3.3.10.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) je određena spektrofotometrijski merenjem fotohemijske redukcije nitro plavo tetrazolijum hlorida (engl. *nitro blue tetrazolium chloride* - NBT) prema metodi Beauchamp & Fridovich (1971). Pod dejstvom svetlosti i u prisustvu metionina dolazi do redukcije riboflavina, pri kojoj nastaje superoksidni anjon. Ovaj anjon redukuje NBT do formazana koji je obojeni produkt. SOD eliminiše superoksidni anjon, što dovodi do inhibicije stvaranja formazana. Tako se aktivnost SOD izražava kroz količinu enzima potrebnu za inhibiciju redukcije 50% NBT.

Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 897,5 µl 100 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0, 20 µl 3,75 mM NBT, 50 µl 650 mM metionina, 2,5 µl 800 µM riboflavina i 30 µl uzorka. Uzorci su tokom 15 min bili izloženi svetlosti jačine 78 µmol foton s<sup>-1</sup>m<sup>-1</sup>. Asporbanca je merena na talasnoj dužini od 560 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1800. Aktivnost SOD u ispitivanim uzorcima izražena je kao ΔA<sub>560</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteina:

$$\text{SOD} = \Delta A_{560} \times \frac{100}{50} \div 15 \times V \times C$$

gde je:  $\Delta A_{560}$  – razlika u apsorbanci blanka i uzorka;  $\frac{100}{50}$  – količina SOD koja inhibira redukciju 50% NBT; 15 – vreme trajanja reakcije u minutima; V- zapremina uzorka (ml); C – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

### 3.3.10.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je određena spektrofotometrijski praćenjem potrošnje  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je supstrat za ovaj enzim (Aebi 1984). Princip metode određivanja aktivnosti CAT zasniva se na praćenju razlaganja  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240 nm, pri čemu je pad apsorbance proporcionalan aktivnosti katalaze. Reakciona smeša zapremine 1 ml je sadržala 970  $\mu\text{l}$  100 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0, 10  $\mu\text{l}$  2M  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 20  $\mu\text{l}$  uzorka. Pad apsorbance na 240 nm je praćen u vremenu (Shimadzu UV-1800). Aktivnost katalaze u ispitivanim uzorcima izražena je kao  $\Delta A_{240} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{240} \text{ min}^{-1} \times V_{rs}}{\varepsilon \times V_{uz} \times C}$$

gde je:  $\Delta A_{240} \text{ min}^{-1}$  – promena apsorbance uzorka u minuti;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml);  $\varepsilon$  – molarni ekstinkcioni koeficijent za  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240 nm;  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml); C – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

### 3.3.10.3. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) je određena spektrofotometrijski, praćenjem oksidacije askorbinske kiseline prema Nakano & Asada (1981). Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 950  $\mu\text{l}$  100 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0, 10  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10  $\mu\text{l}$  50 mM askorbinske kiseline i 30  $\mu\text{l}$  uzorka. Oksidacija askorbinske kiseline merena je na 290 nm praćenjem pada apsorbance u vremenu (Shimadzu UV-1800). Aktivnost APX u ispitivanim uzorcima izražena je kao  $\Delta A_{290} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A_{290} \text{ min}^{-1} \times V_{rs}}{\varepsilon \times V_{uz} \times C}$$

gde je:  $\Delta A_{290} \text{ min}^{-1}$  – promena apsorbance uzorka u minuti;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml);  $\varepsilon$  – molarni ekstinkcioni koeficijent za askorbat peroksidazu na 290 nm;  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml); C – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

### 3.3.10.4. Određivanje aktivnosti gvajakol peroksidaze

Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD) je određena spektrofotometrijski prema metodi Polle et al. 1994. Reakcija se zasniva na oksidaciji gvajakola i formiranju obojenog jedinjenja, tetragvajakola braon boje. Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 959  $\mu\text{l}$  100 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0, 10  $\mu\text{l}$  2M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1  $\mu\text{l}$  9,8 M gvajakola i 30  $\mu\text{l}$  uzorka. Praćen je porast apsorbance na 470 nm tokom vremena (Shimadzu UV-1800). Aktivnost gvajakol peroksidaze u ispitivanim uzorcima izražena je kao  $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina:

$$\text{POD} = \frac{\Delta A_{470} \text{ min}^{-1} \times V_{rs}}{\varepsilon \times V_{uz} \times C}$$

gde je:  $\Delta A_{470} \text{ min}^{-1}$  – promena apsorbance uzorka u minuti;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml);  $\epsilon$  molarni ekstinkcioni koeficijent za gvajakol peroksidazu na 470 nm;  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml);  $C$  – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

#### 3.3.10.5. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze

Aktivnost glutation reduktaze (GR) je određena spektrofotometrijski, praćenjem brzine oksidacije NADPH do NADP<sup>+</sup> prema metodi Foyer & Halliwell (1976).

Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 910  $\mu\text{l}$  100 mM K-fosfatnog pufera pH 7,5, 10  $\mu\text{l}$  10 mM NADPH, 50  $\mu\text{l}$  50 mM GSSG i 30  $\mu\text{l}$  uzorka. Oksidacija NADPH do NADP<sup>+</sup> je praćena padom apsorbance na 340 nm u vremenu (Shimadzu UV-1800). Aktivnost glutation reduktaze u ispitivanim uzorcima izražena je kao  $\Delta A_{340} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteina:

$$\text{GR} = \frac{\Delta A_{340} \text{ min}^{-1} \times V_{rs}}{\epsilon \times V_{uz} \times C}$$

gde je:  $\Delta A_{340} \text{ min}^{-1}$  – promena apsorbance uzorka u minuti;  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše (ml);  $\epsilon$  – molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm;  $V_{uz}$  – zapremina uzorka (ml);  $C$  – koncentracija proteina u uzorku ( $\text{mg ml}^{-1}$ ).

### 3.4. Statistička obrada podataka

Sve izmerene vrednosti izražene su kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom ( $M \pm SD$ ) za tri ponavljanja po mestu uzorkovanja. Zatim je testirana normalnost raspodele podataka. Dobijeni rezultati su potom upoređeni korišćenjem neparametrijskog Mann-Whitney U testa kojim se utvrđuje postojanje statistički značajnih razlika u merenim parametrima između svake dve nezavisne grupe uzoraka. Kao statistički značajne uzete su vrednosti za  $p < 0,05$ .

Za poređenje svih merenih varijabli (koncentracije metala, biohemijski parametri) korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) kako bi se utvrdila korelacija između dva parametra. Sve statističke analize su rađene u softverskom paketu R (Version 3.5.1; R Core Team 2018).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Hemijske odlike ispitivanog sedimenta

Osnovne hemijske karakteristike sedimenta i jalovine prikazane su u Tabeli 2. pH vrednosti zemljišnog rastvora kontrolnog sedimenta, kao i jalovina sa lokaliteta Bor 1 i Rudnik su bile neutralne reakcije, dok je jalovina iz Bora 2 ultrakisele reakcije (Soil Survey Division Staff 1993). Sadržaj organske materije (SOM) je bio najveći u mešavini sedimenta i rudničke jalovine iz Bora 1 i flotacionoj jalovini Rudnika. Najniža koncentracija je izmerena u jalovini iz Bora 2, čak 7–8 puta niža u odnosu na Rudnik i Bor 1. Sadržaj azota je bio najveći u kontrolnom sedimentu i mešavini sedimenta i rudničke jalovine iz Bora 1, dok je u flotacionoj jalovini poreklom iz Rudnika i Bora 2 bio čak 4 i 28 puta niži u odnosu na prethodne dve podloge. Sadržaj dostupnog fosfora je bio najveći u prirodnom kontrolnom sedimentu. U odnosu na njega, flotaciona jalovina Rudnika je sadržala 3 puta nižu koncentraciju dostupnog P, dok je njegov sadržaj u Boru 1 i Boru 2 bio čak 17 i 506 puta niži. Sadržaj dostupnog kalijuma je bio najveći u jalovini iz Bora 1, dok je najmanji sadržaj ovog metala bio je u jalovini iz Rudnika.

Tabela 2. Hemijske osobine analiziranog sedimenta ( $M \pm SD$ ).

	pH <sub>H2O</sub>	pH <sub>KCl</sub>	C (%)	SOM (%)	N (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg 100g <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (mg 100g <sup>-1</sup> )
Carska bara	7,43	6,68	1,78 ± 0,26	3,08 ± 0,46	0,16 ± 0,0	25,3 ± 0,2	19,0 ± 0,3
Bor 1	7,1	6,75	2,5 ± 0,02	4,31 ± 0,03	0,16 ± 0,0	1,47 ± 0,04	26,0 ± 0,0
Bor 2	3,5	3,02	0,3 ± 0,1	0,52 ± 0,1	0,04 ± 0,0	0,09 ± 0,02	14,0 ± 0,0
Rudnik	6,91	6,64	2,21 ± 0,14	3,81 ± 0,23	0,01 ± 0,0	7,59 ± 0,05	9,57 ± 1,16

Pseudototalne koncentracije i koncentracije pristupačnih oblika metala u kontrolnom sedimentu i jalovini prikazane su u Tabeli 3. Najviše pseudototalne i koncentracije pristupačnih oblika gotovo svih analiziranih metala osim bakra nađene su u jalovini sa Rudnika, dok je Cu bio najzastupljeniji u jalovini iz Bora 1.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Fe se statistički značajno razlikuju među svim lokalitetima, pri čemu je najviša pseudototalna koncentracija Fe izmerena u Rudniku. U poređenju sa kontrolnim sedimentom pseudototalna koncentracija Fe u jalovini iz Rudnika bila je 2,5 puta viša. Međutim, najviša izmerena koncentracija pristupačnog oblika Fe je bila u jalovini iz Bora 2.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Mn se statistički značajno razlikuju među svim lokalitetima, a najviše zabeležene su bile u jalovini sa Rudnika. Pseudototalna koncentracija Mn u ovom sedimentu bila je čak 5,3 puta viša u odnosu na kontrolu i 10 puta viša u odnosu na jalovinu iz Bora 2. Slični odnosi postoje i kada je reč o pristupačnim koncentracijama Mn u podlozi, pa je tako njegova koncentracija u flotacionoj jalovini Rudnika bila viša za 6,5, 3,7 i 19,1 puta u odnosu na kontrolni sediment i jalovinu Bora 1 i Bora 2.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Ni se statistički značajno razlikuju među svim lokalitetima, a najviše zabeležene su bile takođe u flotacionoj jalovini iz Rudnika. Pseudototalna koncentracija ovog metala je bila 3,4 puta viša od one koja je zabeležena u kontrolnom sedimentu, dok je u odnosu na jalovinu iz Bora 1 i Bora 2 bila 7, odnosno 17 puta viša. Koncentracija pristupačnog oblika Ni je bila 6,2 puta viša u jalovini sa Rudnika u odnosu na kontrolni sediment, dok je gotovo 40 i 43 puta bila viša u odnosu na jalovinu iz Bora 2 i Bora 1.

Tabela 3. Pseudototalne koncentracije i koncentracije pristupačnih oblika metala u sedimentu ( $M \pm SD$ ,  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

	Carska bara	Bor 1	Bor 2	Rudnik
Fe (%) <sub>pseudototalni</sub>	2,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	4,9 ± 0,0 <sup>c</sup>	6,8 ± 0,3 <sup>d</sup>
Fe (%) <sub>pristupačni</sub>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>d</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>
Mn <sub>pseudototalni</sub>	362 ± 2 <sup>b</sup>	413 ± 47 <sup>c</sup>	186 ± 2 <sup>a</sup>	1940 ± 146 <sup>d</sup>
Mn <sub>pristupačni</sub>	41,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	74,1 ± 2,5 <sup>c</sup>	14,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	272 ± 12 <sup>d</sup>
Ni <sub>pseudototalni</sub>	25,5 ± 0,3 <sup>c</sup>	12,5 ± 1,3 <sup>b</sup>	5,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	85,7 ± 0,8 <sup>d</sup>
Ni <sub>pristupačni</sub>	1,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,0 <sup>d</sup>
Zn <sub>pseudototalni</sub>	54,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	218 ± 23 <sup>c</sup>	60,9 ± 2,7 <sup>b</sup>	1431 ± 225 <sup>d</sup>
Zn <sub>pristupačni</sub>	1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	20,9 ± 1,3 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	194 ± 3 <sup>d</sup>
Pb <sub>pseudototalni</sub>	10,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	59,8 ± 4,5 <sup>c</sup>	26,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	1948 ± 185 <sup>d</sup>
Pb <sub>pristupačni</sub>	3,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	12,3 ± 0,4 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	812 ± 1 <sup>d</sup>
Cu <sub>pseudototalni</sub>	15,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	4703 ± 459 <sup>d</sup>	288 ± 20 <sup>b</sup>	761 ± 60 <sup>c</sup>
Cu <sub>pristupačni</sub>	5,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	774 ± 22 <sup>d</sup>	29,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	45,3 ± 0,4 <sup>c</sup>
Cd <sub>pseudototalni</sub>	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>	11,3 ± 0,4 <sup>d</sup>
Cd <sub>pristupačni</sub>	0,0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>	4,0 ± 0,0 <sup>d</sup>
Co <sub>pseudototalni</sub>	4,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	17,8 ± 0,3 <sup>c</sup>
Co <sub>pristupačni</sub>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
Cr <sub>pseudototalni</sub>	23,0 ± 0,1 <sup>c</sup>	8,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	49,0 ± 1,9 <sup>d</sup>
Cr <sub>pristupačni</sub>	0,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,0 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,6 <sup>c</sup>

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Zn se takođe statistički značajno razlikuju među ispitivanim lokalitetima, a višestruko više koncentracije u odnosu na ostale lokalitete su izmerene u jalovini sa Rudnika, gde je u odnosu na kontrolu pseudototalna koncentracija cinka bila 26 puta viša, a u odnosu na jalovinu iz Bora 1 i Bora 2 za gotovo 7 i 23 puta viša. Istovremeno, koncentracija pristupačnog oblika Zn u flotacionoj jalovini sa Rudnika je bila čak 149 puta viša u odnosu na kontrolu, dok je u Boru 1 i Boru 2 njegov dostupni sadržaj bio 9 i gotovo 93 puta viši.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Pb pokazuju sličan obrazac, sa statistički značajnim razlikama u koncentracijama među svim lokalitetima, pri čemu su najviše koncentracije izmerene u jalovini iz Rudnika. Poredeći sa kontrolnim sedimentom, koncentracija pseudototalnog Pb u Rudniku je bila čak 190 puta viša, dok je koncentracija pristupačnog oblika bila 240 puta viša. U poređenju sa jalovinom iz Bora 1 i Bora 2 koncentracija pristupačnog oblika Pb je bila 66 i čak 812 puta viša.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Cu takođe pokazuju statistički značajne razlike među lokalitetima. Najviše pseudototalne koncentracije bakra izmerene su u Boru 1 i čak 300 puta premašuju koncentraciju ovog metala u kontrolnom sedimentu, a 16 odnosno 6 puta premašuju koncentracije u jalovini iz Bora 2, odnosno sa Rudnika. Koncentracije pristupačnog oblika Cu u jalovini iz Bora 1 su bile 48 puta više u odnosu na kontrolu, kao i 26 i 17 puta više u odnosu na jalovinu iz Bora 2 i Rudnika.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Cd slede obrazac većine analiziranih metala. Naime, statistički značajne razlike u koncentracijama su detektovane među lokalitetima. Najviše pseudototalne koncentracije ovog elementa su zabeležene u jalovini sa Rudnika i čak

275 puta premašuju koncentraciju kadmijuma u kontrolnom sedimentu, odnosno gotovo 10 puta koncentraciju u jalovini iz Bora 1, dok je u jalovini iz Bora 2 koncentracija Cd bila ispod nivoa detekcije. Koncentracija pristupačnog oblika Cd u jalovini sa Rudnika u poređenju sa kontrolom je bila 80 puta viša, a čak 400 puta viša u odnosu na jalovinu iz Bora 1, dok je 12 puta bila viša u odnosu na jalovinu iz Bora 2.

Pseudototalna koncentracija kobalta je bila značajno viša u jalovini sa Rudnika u odnosu na ostale lokalitete i to 4 puta viša u odnosu na kontrolu, gotovo 5 puta u odnosu na jalovinu iz Bora 1 i 12 puta viša u odnosu na jalovinu iz Bora 2. Koncentracija pristupačnog oblika Co je bila gotovo 41 put viša u jalovni sa Rudnika u odnosu na kontrolu, dok je 8 puta bila viša od koncentracije u jalovini iz Bora 1. U jalovini iz Bora 2 koncentracija Co bila je ispod nivoa detekcije.

Pseudototalne i pristupačne koncentracije Cr su bile statistički značajno različite među analiziranim lokalitetima, sa najvišim zabeleženim koncentracijama u jalovini sa Rudnika. U odnosu na kontrolni sediment, pseudototalna koncentracija hroma je bila duplo viša, dok je u odnosu na Bor 1 i Bor 2 izmerena gotovo 7 puta viša koncentracija ovog metala. Koncentracija pristupačnog oblika Cr u jalovni sa Rudnika je bila čak 116, odnosno 97 puta viša u odnosu na jalovinu iz Bora 1 i kontrolu, respektivno, dok je 45 puta bila viša od kocentracije Cr u jalovni iz Bora 2.

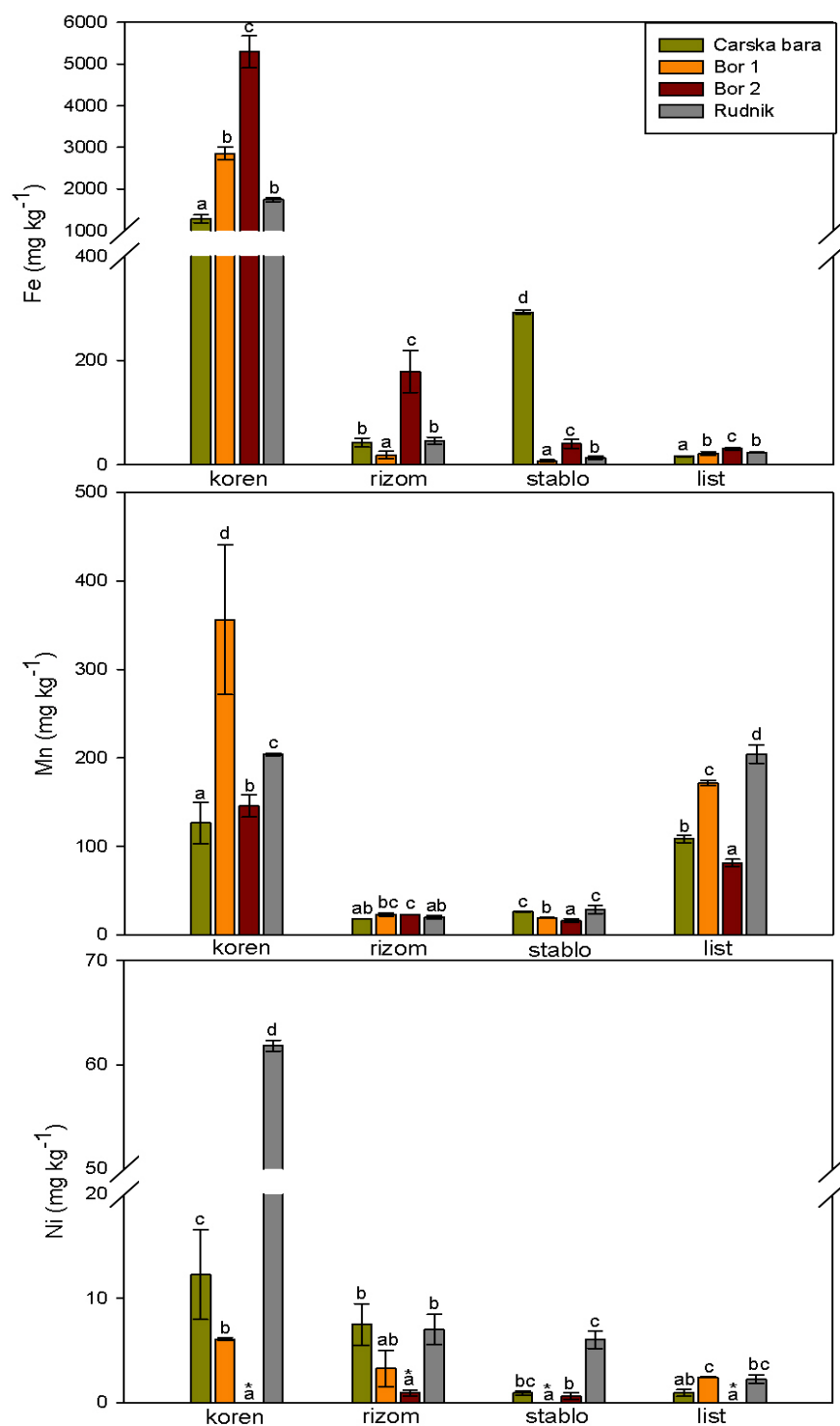
## **4.2. Hemijski sastav biljnog materijala**

Ukupne koncentracije metala u biljnim delovima trske sakupljene u junu i septembru 2018. godine su prikazane na Grafikonima 1–6.

Koncentracija Fe u korenu i listu trske u junu je bila viša kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolne biljke, dok su rizom i stablo kontrolnih biljaka imali više koncentracije ovog metala u odnosu na ostale lokalitete. Kada poredimo različite delove biljaka, u korenu biljaka iz Bora 2 izmerene su čak 176 puta više koncentracije ovog elementa u odnosu na listove (Grafikon 1). Zatim slede stablo i rizom sa približno jednakim koncentracijama, a potom i list u kome su izmerene najniže koncentracije ovog metala. Gotovo svi biljni delovi trske iz Bora 2 imali su značajno višu koncentraciju Fe u odnosu na ostale lokalitete, dok je najniža koncentracija bila u kontrolnim biljkama. Izuzetak su stabla kontrolnih biljaka, koja su imala najvišu koncentraciju ovog metala.

Koncentracija Mn u korenu i listu ispitivanih biljaka je bila viša od onih koje su izmerene u rizomu i stablu za 7 i više puta (Grafikon 1). Pri tome, biljke iz Bora 2 i sa Rudnika su sadržale značajno više koncentracije Mn u odnosu na biljke sa preostala dva lokaliteta. Tako je koren biljaka iz Bora 2 sadržao gotovo 3 puta više Mn u odnosu na kontrolne biljke, dok su na nivou lista te razlike bile nešto manje. Rizom i stablo trske su kod svih biljaka imali slične koncentracije ovog elementa.

Koncentracija Ni je bila najviša u korenu biljaka sa Rudnika, sa koncentracijom do 6 puta višom u odnosu na koren kontrolnih biljaka, kao i 10 puta višom u odnosu na koren biljaka iz Bora 1, dok je najveća razlika pokazana u odnosu na koren biljaka iz Bora 2, kod koga je koncentracija Ni bila ispod nivoa detekcije AAS (Grafikon 1). Poređenjem sadržaja Ni u različitim delovima biljaka se uočava da je koren po pravilu akumulirao najviše Ni, dok su preostali delovi biljke, a naročito list, sadržali daleko niže koncentracije ovog elementa. Tako je koren biljaka sa Rudnika imao čak do 27 puta višu koncentraciju ovog elementa u odnosu na ostale delove biljaka. U poređenju sa biljkama sa ostalih lokaliteta, biljke rasle u Boru 2 su imale najnižu koncentraciju Ni u svim delovima, dok je u stablu biljaka iz Bora 1 koncentracija Ni bila ispod nivoa detekcije AAS.



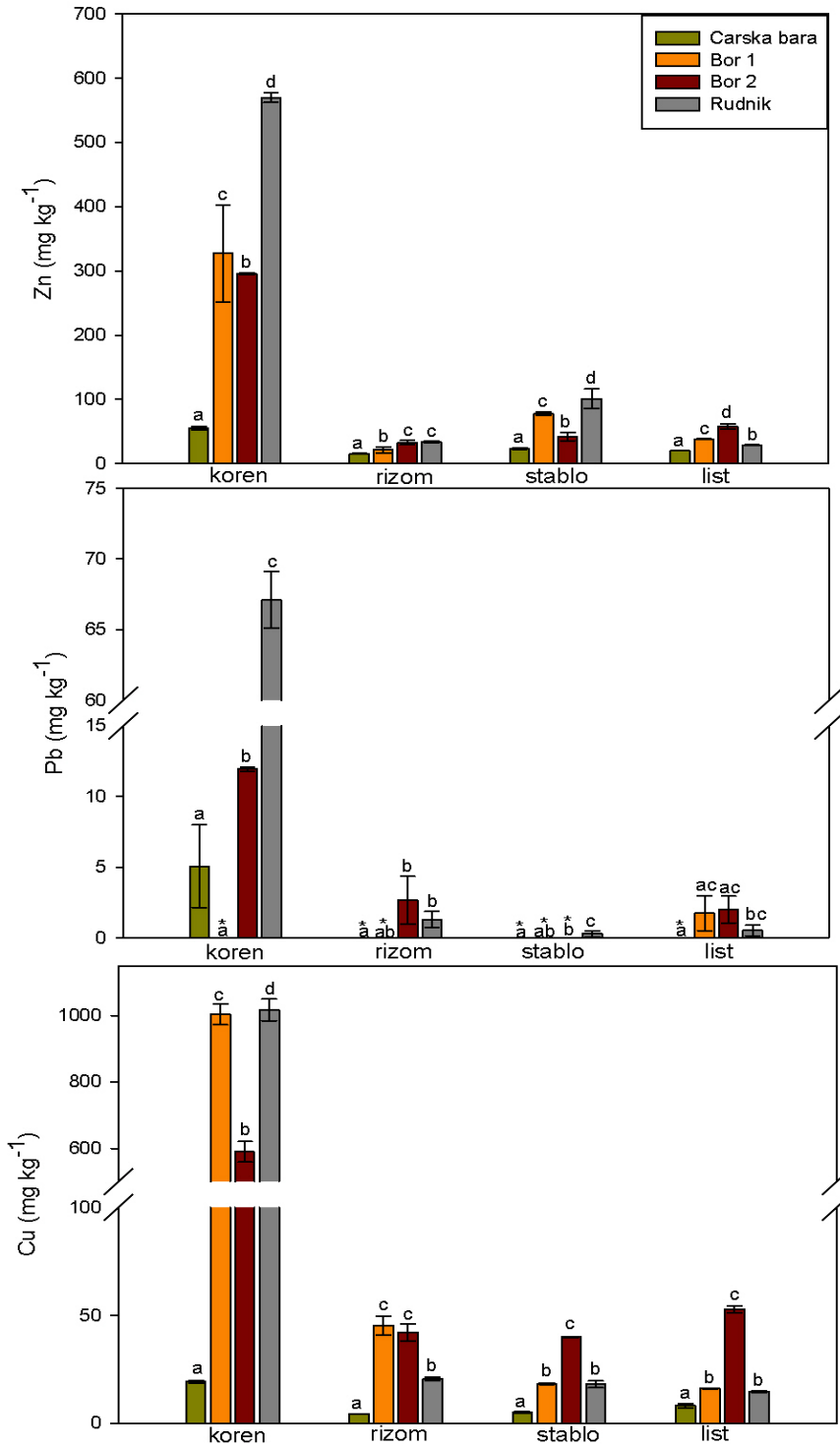
Grafikon 1. Koncentracije Fe, Mn i Ni u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u junu 2018. godine. \* - ispod nivoa detekcije. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija Zn je bila značajno viša u svim biljkama sa odlagališta jalovine u odnosu na kontrolu, dok su biljke sa flotacionog jalovišta na Rudniku, osim lista, sadržale najviše koncentracije ovog elementa (Grafikon 2). U korenu trske sa Rudnika je izmerena 10 puta viša koncentracija Zn u odnosu na kontrolne biljke, kao i čak 19 puta viša koncentracija u odnosu na listove istih biljaka.

U korenu trske sa svih lokaliteta su izmerene višestruko više koncentracije Pb u odnosu na ostale delove biljaka. Najviša koncentracija Pb je detektovana u korenu biljaka sa flotacione jalovine Rudnika (Grafikon 2). Ona je bila 13 i 5 puta viša u odnosu na koren kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 2, respektivno, dok je najveća razlika bila u odnosu na koren biljaka iz Bora 1, gde je koncentracija Pb bila ispod nivoa detekcije AAS. Takođe, bila je 51, 231 i 129 puta viša u odnosu na sadržaj Pb u rizomu, stablu i listovima kod istih biljaka, respektivno. Međutim, i pored najviše zabeležene koncentracije Pb u korenu biljaka sa Rudnika, viša koncentracija Pb je zabeležena u listovima biljaka iz Bora 1 i Bora 2.

Koncentracija Cu je bila značajno viša u svim biljkama sa odlagališta jalovine u odnosu na kontrolne biljke. U korenu biljaka iz Bora 1 i Rudnika koncentracije Cu su bile slične i gotovo duplo više u odnosu na koren biljaka iz Bora 2 i čak oko 50 puta više u odnosu na kontrolu (Grafikon 2), dok su u korenu bile čak 20 i više puta više u odnosu na ostale delove biljke. Rizomi biljaka iz Bora 1 i Bora 2 su imali značajno višu koncentraciju ovog elementa u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta. I pored toga što su biljke iz Bora 2 sadržale značajno nižu koncentraciju Cu u korenu, u njihovom stablu i listu su detektovane dvostruko više koncentracije ovog elementa u odnosu na biljke sa ostalih jalovišta.



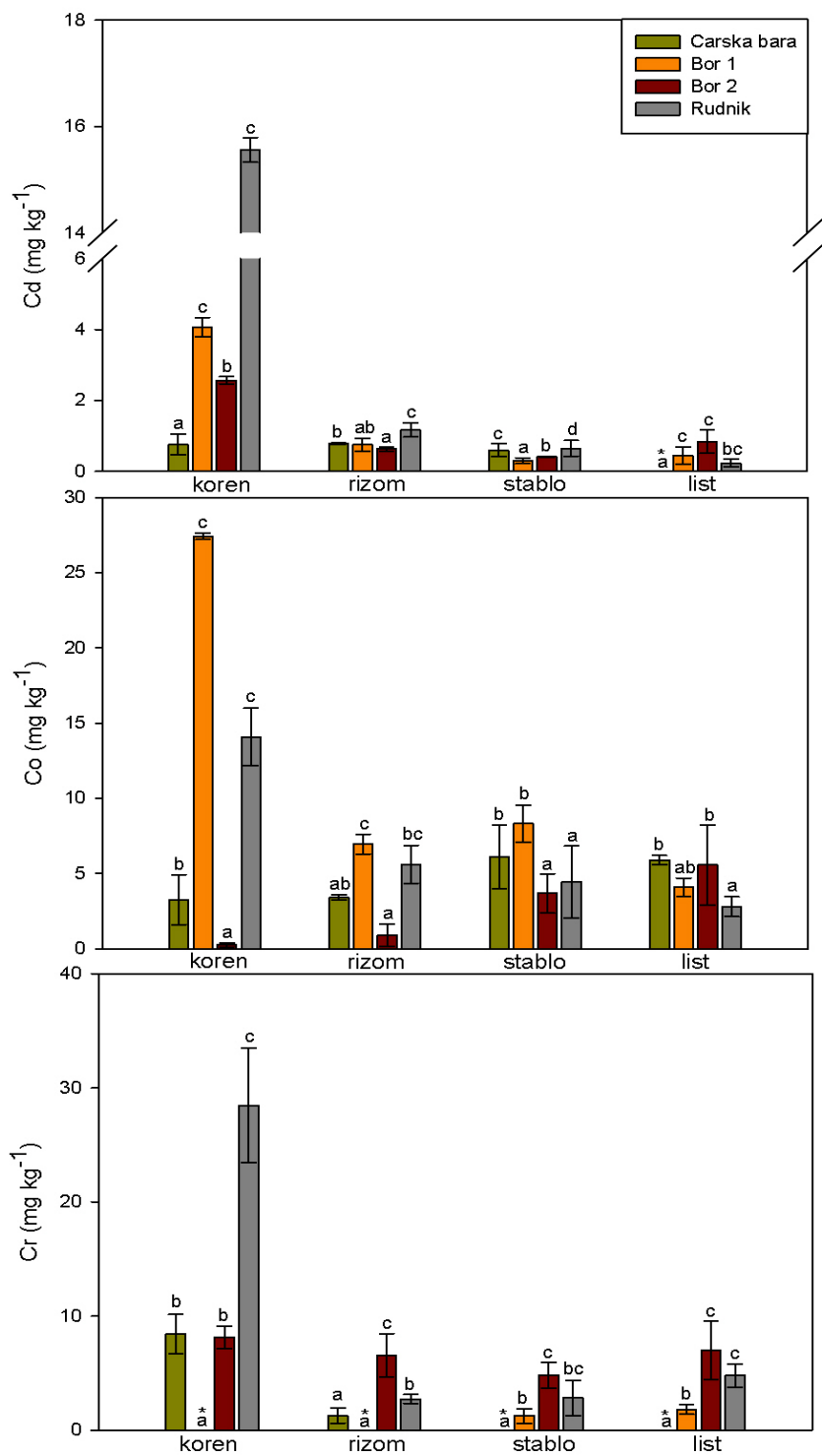


Grafikon 2. Koncentracije Zn, Pb i Cu u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u junu 2018. godine. \* - ispod nivoa detekcije Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija Cd u korenu i listu je bila značajno viša u biljkama sa jalovišta u odnosu na kontrolu, sa najvišom koncentracijom detektovanom u biljkama sa flotacione jalovine Rudnik (Grafikon 3). Kod svih biljaka sa jalovišta rizomi, stabla i listovi biljaka su sadržali višestruko niže koncentracije Cd u odnosu na koren. Pri tome se najviše razlike u koncentracijama Cd u korenu u odnosu na preostale delove biljke uočavaju kod biljaka sa Rudnika, čiji je koren sadržao 12 i više puta višu koncentraciju ovog elementa u poređenju sa ostalim biljnim delovima.

Najviše koncentracije Co su detektovane u korenu biljaka sa jalovišta Bor 1 i Rudnik i bile su 7 i skoro 4 puta više u odnosu na kontrolne biljke, respektivno, dok je najniža koncentracija zabeležena u korenu biljaka iz Bora 2, čak 14 puta niža u odnosu na kontrolu (Grafikon 3). Od rizoma i stabla ka listovima se uočava postepeno smanjenje koncentracije Co u biljkama sa lokaliteta Bor 1 i Rudnik. Tako su u korenu biljaka iz Bora 1 detektovane oko 6 puta više koncentracije Co u odnosu na listove istih biljaka. Međutim, u stablu, a posebno u listovima, sadržaj kobalta ne zavisi direktno od njegovog sadržaja u korenu, pa su najviše koncentracije detektovane u kontrolnim biljkama i biljkama iz Bora 2.

Najviše koncentracije Cr su izmerene u korenovima biljaka sa Rudnika, dok su ostali delovi ovih biljaka sadržali višestruko niže koncentracije ovog metala. Tako je koren biljaka sa Rudnika imao 3 i više puta višu koncentraciju ovog elementa u odnosu na kontrolne i biljke iz Bora 2, dok je najveća razlika u odnosu na koren biljaka iz Bora 1 kod kojih je koncentracija Cr bila ispod nivoa detekcije AAS (Grafikon 3). Kod kontrolnih i biljaka sa Rudnika njegov sadržaj je bio daleko niži u svim ostalim biljnim delovima u odnosu na koren. Za razliku od njih, biljke iz Bora 2 su pokazale ujednačen sadržaj Cr u svim delovima biljke, i imale su višu koncentraciju ovog elementa u rizomu, stablu i listovima u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta, međutim bez statistički značajne razlike u odnosu na biljke sa Rudnika.



Grafikon 3. Koncentracije Cd, Co i Cr u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u junu 2018. godine. \* - ispod nivoa detekcije Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

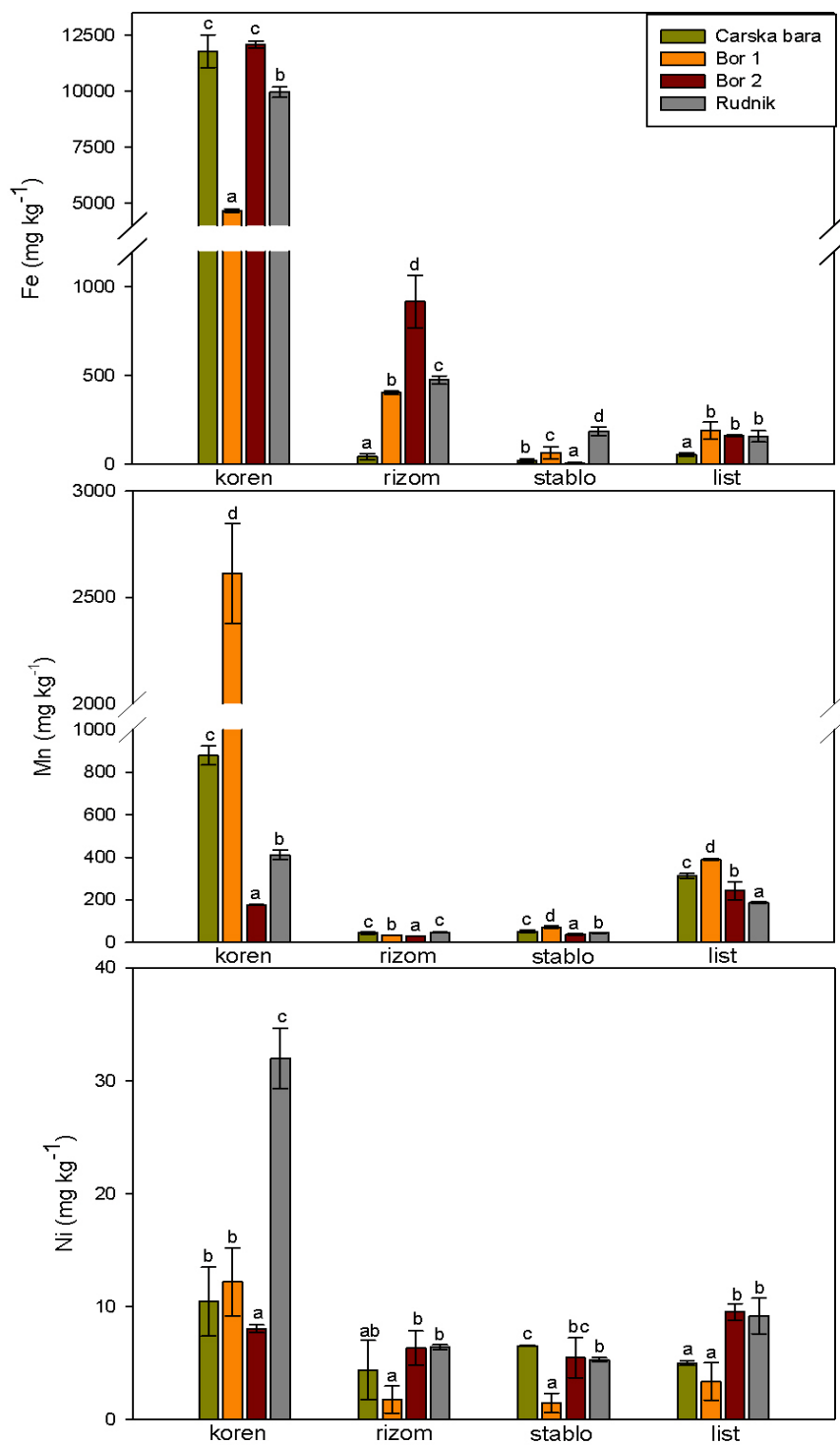
Ukupne koncentracije metala u biljnim delovima trske sakupljenim u septembru 2018. godine su prikazane na Grafikonima 4-6.

Poredeći sadržaj ispitivanih metala u biljkama uzorkovanim u junu i septembru uočavaju se određene razlike u svim biljnim delovima. Naime, koncentracije većine ispitivanih elemenata su bile više u biljkama uzorkovanim u septembru sa izuzetkom Zn i Cd čije su koncentracije u svim ispitivanim uzorcima bile više u junu, kao i Cu, Cr, i Ni, čije su koncentracije bile više u korenovima biljaka iz Rudnika u junu 2018. godine.

Koncentracije Fe u ispitivanim biljnim delovima kod gotovo svih biljaka sa različitim lokaliteta su bile više u odnosu na prethodni period, sa najznačajnijim razlikama u korenu kod kog su izmerene višestruko više koncentracije ovog elementa. Koren biljaka sa svih lokaliteta je sadržao značajno više koncentracije Fe u odnosu na ostale delove biljaka. Korenovi kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 2 su sadržali najviše koncentracije ovog elementa, i kod kontrolnih biljaka su bile čak oko 214 puta više u odnosu na sadržaj Fe u listu (Grafikon 4). Koncentracije Fe u rizomu i listu su bile značajno više u biljkama sa jalovišta u odnosu na kontrolne biljke. Iako su biljke iz Bora 2 sadržale jednu od najviših zabeleženih koncentracija Fe u korenu i rizomu, njegov sadržaj u stablu je bio nizak i čak niži u odnosu na biljke sa preostalih lokaliteta.

Koncentracije Mn u svim biljnim delovima pokazuju sličan obrazac kao kod biljaka uzorkovanih u junu, sa koncentracijama koje su ovoga puta bile nešto više, što se posebno odnosi na koncentracije detektovane u korenu svih ispitivanih biljaka. U poređenju sa ostalim biljnim delovima, koren je i ovoga puta sadržao značajno više koncentracije datog elementa, a razlike u sadržaju su bile najizraženije kod biljaka iz Bora 1 kod kojih su koncentracije u korenu bile čak 74 puta više u odnosu na rizom (Grafikon 4). Uopšteno, biljke iz Bora 1 su i u ovom uzorkovanju imale značajno viši sadržaj Mn u korenu u poređenju sa biljkama sa ostalih lokaliteta, koji je bio gotovo 3, 14 i 6 puta viši u odnosu na kontrolu, Bor 2 i biljke sa Rudnika (Grafikon 4), respektivno. Takođe, kod ovih biljaka je sadržaj Mn i u stablu i listu ovoga puta bio viši u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta.

Koncentracije Ni pokazuju sličan trend kao kod biljaka uzorkovanih u junu. I kod ovog elementa su najviše koncentracije detektovane u korenu, sa najvišim vrednostima zabeleženim kod biljaka sa Rudnika, 3 do 4 puta višim u odnosu na koren kontrolnih i biljaka iz Bora 1 i Bora 2 (Grafikon 4). Sadržaj Ni je bio približno ujednačen između rizoma, stabla i listova biljaka sa svakog od lokaliteta, sa najnižim vrednostima zabeleženim kod biljaka iz Bora 1.

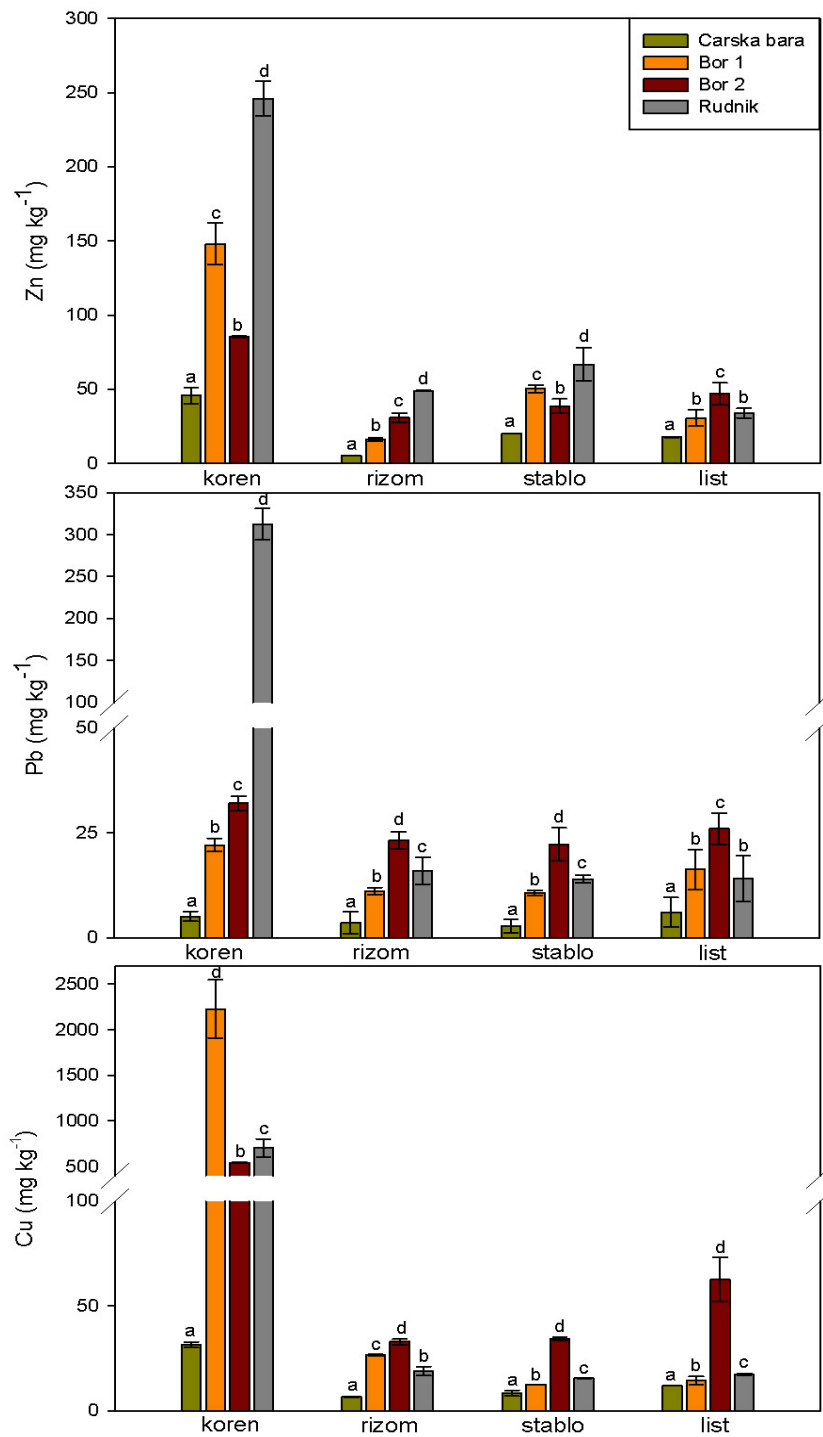


Grafikon 4. Koncentracije Fe, Mn i Ni u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim organima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Koncentracije Zn u biljkama uzorkovanim u septembru pokazuju isti trend distribucije po biljnim delovima kao u junu, sa najvišim vrednostima zabeleženim u korenu, kao i u svim biljnim delovima biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu. Biljke sa Rudnika su sadržale značajno višu koncentraciju ovog elementa u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta u svim biljnim delovima, osim lista, u kom su najviše koncentracije zabeležene kod biljaka iz Bora 2. Tako je sadržaj Zn u korenu, rizomu i stablu biljaka sa Rudnika bio 5, 9 i 3 puta viši u odnosu na kontrolne biljke, respektivno (Grafikon 5).

Koncentracija Pb je bila značajno viša u odnosu na prethodni period uzorkovanja, sa višestruko većim sadržajem u svim ispitivanim delovima biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu. Dok je višestruko viša koncentracija Pb zabeležena u korenovima biljaka sa Rudnika u odnosu na biljke sa drugih lokaliteta, kod biljaka iz Bora 2 je detektovan značajno veći sadržaj ovog elementa u svim ostalim biljnim delovima. Kada uporedimo koncentracije Pb u različitim delovima biljaka sa istog lokaliteta, uočava se da su one približno ujednačene. Izuzetak su biljke sa Rudnika kod kojih je koncentracija Pb u korenu bila čak oko 20 puta viša u odnosu na ostale biljne delove (Grafikon 5).

Koncentracija Cu u biljkama sakupljenim u septembru pokazuje veoma sličan trend distribucije, sa sličnim koncentracijama kao što je zabeleženo u junu. Tako je i u ovom uzorkovanju koncentracija Cu bila značajno viša u svim ispitivanim biljnim delovima kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu. Biljke iz Bora 1 su pokazale najvišu koncentraciju Cu u korenu, čak 70 puta višu u odnosu na kontrolu, i čak 155 puta višu koncentraciju u odnosu na listove i stablo istih biljaka. Takođe, ova koncentracija je bila duplo viša u odnosu na uzorke sakupljene u junu. S druge strane, biljke iz Bora 2 su sadržale značajno višu koncentraciju ovog elementa u svim ostalim biljnim delovima (Grafikon 5).



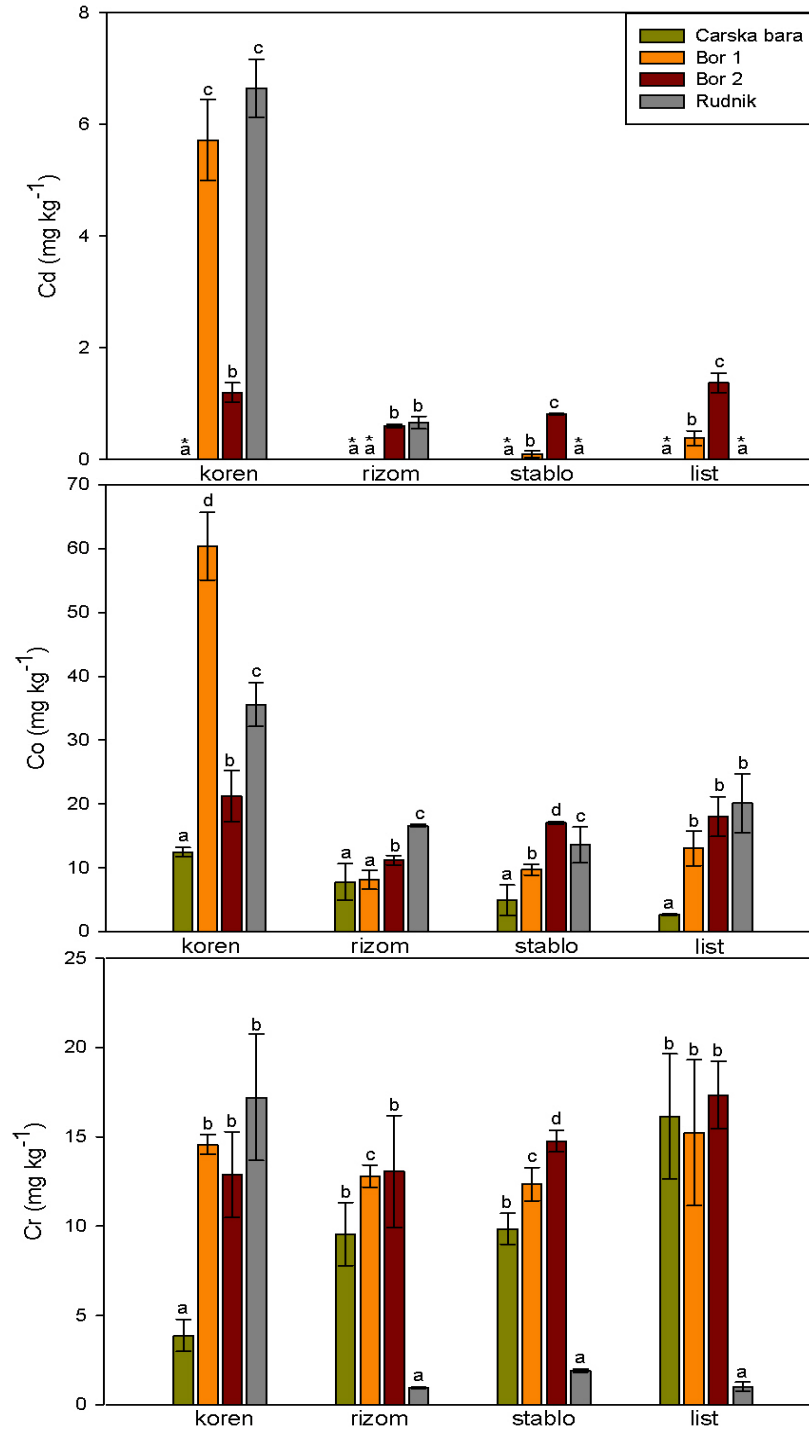
Grafikon 5. Koncentracije Zn, Pb i Cu u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Koncentracija Cd je, za razliku od prethodnog perioda, u svim biljnim delovima kontrolnih biljaka bila ispod nivoa detekcije, dok je u svim ispitivanim delovima biljaka sa jalovišta zabeležen veći sadržaj ovog elementa u odnosu na kontrolu. Osim kod kontrolnih biljaka, koncentracija ispod nivoa detekcije je detektovana još u rizomu kod biljaka iz Bora 1, kao i u stablu i listu biljaka sa Rudnika. Najviše zabeležene koncentracije su bile, kao i u slučaju ostalih ispitivanih metala, u korenovima biljaka, osim kod biljaka iz Bora 2 koje su približno jednaku koncentraciju Cd imale u listu i korenu. Najizraženije razlike u sadržaju Cd se uočavaju kod biljaka sa Rudnika, pa je tako koncentracija u korenovima bila 10 puta viša u odnosu na rizom, dok su razlike još veće u odnosu na stablo i list istih biljaka zbog veoma niskog sadržaja Cd koji je bio ispod nivoa detekcije (Grafikon 6).

Koncentracije Co u septembru su bile značajno više u korenovima biljaka u odnosu na prethodni period, sa značajno višim koncentracijama u svim ispitivanim biljnim delovima biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu. Izuzetak su rizomi kod kojih nije bilo značajne razlike između kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 1. Najviše koncentracije su i dalje bile prisutne u korenu kod svih ispitivanih biljaka, sa najvišim vrednostima izmerenim u korenovima biljaka iz Bora 1 i Rudnika. Tako je koncentracija Co u korenu biljaka iz Bora 1 bila gotovo 5 puta viša u odnosu na listove istih biljaka (Grafikon 6).

Koncentracije Cr u biljkama sakupljenim u septembru su generalno bile više u odnosu na one detektovane u biljkama u junu, osim u korenu kontrolnih biljaka i rizomu, stablu i listovima biljaka sa Rudnika. Sadržaj Cr u korenu biljaka sa odlagališta jalovine je bio značajno viši u odnosu na kontrolu, sa 4 puta višom koncentracijom u korenu biljaka sa Rudnika. Istovremeno, biljke sa Rudnika su sadržale najniže koncentracije ovog elementa u rizomima, stablima i listovima. Na svim ostalim lokalitetima se uočavaju slične koncentracije u listovima i korenovima biljaka, osim u slučaju kontrolnih uzoraka kod kojih je koncentracija u listovima biljaka bila 4 puta viša u odnosu na koren (Grafikon 6).





Grafikon 6. Koncentracije Cd, Co i Cr u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* u septembru 2018. godine. \* - ispod nivoa detekcije. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1. Stehiometrijski odnosi metala u biljci

Stehiometrijski odnosi elemenata u biljnim delovima sakupljenim tokom juna i septembra određeni su za metale sa potencijalnim uticajem na antioksidativnu aktivnost enzima.

Tokom juna su kontrolne biljke i biljke iz Bora 1 u korenovima imale značajno veće odnose Mn:Zn, Mn:Pb i Zn:Pb u poređenju sa biljkama iz Bora 2 i Rudnika (Tabela 4). Sa druge strane, najmanji odnos Mn:Pb, Fe:Pb, Cu:Pb i Zn:Pb detektovan je u biljkama sa Rudnika. U listu su, pak, najveći odnosi Mn:Cu, Mn:Zn, Mn:Pb, Fe:Pb i Zn:Pb detektovani upravo u biljkama sa Rudnika, dok je istovremeno najveći odnos Fe:Mn, Cu:Pb i Cu:Zn bio prisutan u biljkama iz Bora 2 (Tabela 4).

Tokom septembra korenovi kontrolnih biljaka su imali značajno veće odnose Mn:Cu, Mn:Pb, Fe:Pb i Fe:Cu u odnosu na biljke sa deponija jalovine (Tabela 5). Istovremeno stehiometrijski odnosi Mn:Cu, Mn:Zn i Mn:Pb u listovima su bili značajno manji i u biljkama iz Bora 2 i Rudnika u poređenju sa biljkama sa ostalih lokaliteta (Tabela 5).

Značajno veći stehiometrijski odnosi Fe:Mn, Fe:Pb, Fe:Zn, Fe:Cu, kao i Cu:Zn za gotovo sve lokalitete su bili u korenovima u odnosu na listove biljaka tokom oba perioda merenja. Izuzetak su kontrolne biljke čiji su korenovi i listovi imali isti odnos Cu:Zn u oba perioda uzorkovanja, odnosno biljke sa Rudnika sa sličnim odnosom Fe:Pb u korenu i listu u junu.

Sa druge strane, značajno veći stehiometrijski odnosi Mn:Cu, Mn:Zn, Mn:Pb i Zn:Pb su zabeleženi u listovima u odnosu na koren kod svih biljaka uzorkovanih u junu. Kod biljaka sakupljenih u septembru javljaju se određena odstupanja, te nema značajne razlike u odnosu Mn:Cu u listu i korenu kontrolnih biljaka, odnosno Mn:Zn kod kontrolnih i biljaka iz Bora 1. Takođe je odnos Mn:Pb u septembru bio veći u listovima jedino kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika, dok je kod biljaka sa ostalih lokaliteta ovaj odnos bio značajno veći u korenu biljaka.

Kada poredimo odnose elemenata u različitim periodima godine zapažaju se značajno više vrednosti u korenu i listu tokom septembra za Fe:Pb, Fe:Zn i Fe:Cu u odnosu na jun iste godine. Takođe, odnos Mn:Zn, kao i Mn:Pb je bio veći u korenovima svih ispitivanih biljaka, odnosno kontrolnih i biljaka iz Bora 1 u septembru, u odnosu na prethodni period. Istovremeno, odnos Zn:Pb u svim biljkama je tokom juna bio značajno veći u odnosu na septembar, kao i odnos Mn:Pb u listovima biljaka sa jalovišta. Ove razlike posledica su različite akumulacije elemenata u biljnim delovima tokom dva perioda uzorkovanja.

Tabela 4. Stehiometrijski odnos elemenata u biljnim delovima *Phragmites australis* u junu 2018. godine.

Odnos elemenata	List				Koren			
	Carska bara	Bor 1	Bor 2	Rudnik	Carska bara	Bor 1	Bor 2	Rudnik
Mn:Cu	15,4 ± 1,0	12,3 ± 0,1	1,8 ± 0,03	16,3 ± 0,3	7,5 ± 1,2	0,8 ± 0,7	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Mn:Zn	6,4 ± 0,3	5,4 ± 0,2	1,7 ± 0,0	8,4 ± 0,3	2,7 ± 0,4	4,2 ± 2,4	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Mn:Pb	-	277 ± 94	169 ± 49	1208 ± 317	119 ± 40	-	46,0 ± 3,4	11,5 ± 0,4
Fe:Mn	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	10,5 ± 1,2	3,5 ± 1,3	37,0 ± 0,5	8,7 ± 0,3
Fe:Pb	-	8,9 ± 3,7	16,8 ± 4,3	37,5 ± 10,2	317 ± 120	-	450 ± 27	26,4 ± 0,2
Fe:Zn	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,0	27,3 ± 0,7	10,7 ± 3,3	20,9 ± 1,4	3,6 ± 0,0
Fe:Cu	2,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,0	1,8 ± 0,0	75,6 ± 3,1	3,2 ± 0,3	10,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
Cu:Pb	-	22,6 ± 7,6	95,6 ± 29	74,4 ± 20	15,1 ± 6,0	-	161 ± 6,4	49,5 ± 3,1
Zn:Pb	-	51,8 ± 17	101 ± 28	142 ± 40	42,1 ± 16,0	-	78,6 ± 0,6	26,9 ± 0,4
Cu:Zn	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	3,3 ± 0,7	2,0 ± 0,1	1,8 ± 0,1

Tabela 5. Stehiometrijski odnos elemenata u biljnim delovima *Phragmites australis* u septembru 2018. godine.

Odnos elemenata	List				Koren			
	Carska bara	Bor 1	Bor 2	Rudnik	Carska bara	Bor 1	Bor 2	Rudnik
Mn:Cu	30,3 ± 1,3	31,7 ± 4,7	4,5 ± 0,0	12,4 ± 0,5	32,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1
Mn:Zn	21,1 ± 1,2	15,7 ± 3,0	6,2 ± 0,1	6,7 ± 0,8	22,9 ± 1,6	21,1 ± 0,1	2,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Mn:Pb	264 ± 19	95,8 ± 28,4	34,9 ± 1,0	55,6 ± 23,0	654 ± 53	450 ± 72	20,8 ± 1,3	5,0 ± 0,0
Fe:Mn	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	13,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	67,3 ± 0,3	23,8 ± 0,7
Fe:Pb	48,4 ± 4,1	43,9 ± 2,0	23,4 ± 2,9	43,4 ± 8,6	8626 ± 79	788 ± 70	1402 ± 92	118 ± 4
Fe:Zn	3,7 ± 0,7	7,3 ± 0,5	4,1 ± 0,6	5,4 ± 0,5	303 ± 18	37,2 ± 2,9	166 ± 2	47,4 ± 1,2
Fe:Cu	5,2 ± 1,0	14,9 ± 1,6	3,0 ± 0,4	10,2 ± 1,8	425 ± 7	2,4 ± 0,3	25,3 ± 0,1	16,3 ± 2,0
Cu:Pb	8,6 ± 5,9	3,0 ± 0,5	7,8 ± 0,2	4,4 ± 1,7	20,3 ± 1,5	332 ± 70	55,4 ± 3,4	7,3 ± 0,6
Zn:Pb	12,2 ± 8,2	6,0 ± 0,7	5,7 ± 0,1	8,2 ± 2,4	28,7 ± 4,3	21,4 ± 3,5	8,5 ± 0,5	2,5 ± 0,0
Cu:Zn	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,1	15,4 ± 0,7	6,5 ± 0,0	2,9 ± 0,3

### 4.3. Fitoremedijacioni potencijal *Phragmites australis*

Biokoncentracioni, bioakumulacioni i translokacioni faktori određeni za period uzorkovanja jun i septembar 2018. godine su prikazani u Tabelama 6 i 7.

Biokoncentracioni faktor (BCF) predstavlja odnos koncentracije elementa u korenu i njegove pristupačne koncentracije u sedimentu i ukazuje na nivo akumulacije elemenata u korenu. U junu je BCF > 1 bio za sve ispitivane elemente u biljkama sa svih lokaliteta osim u slučaju Pb i Mn kod biljaka sa Rudnika. Najviše vrednosti ovog faktora zabeležene su za Zn u Boru 2, čak 142, kao i za Cr na kontrolnom lokalitetu koji je iznosio 140 (Tabela 6). Za Pb i Cr (Bor 1), kao i za Ni, Cd i Co (Bor 2) ovaj faktor nije bilo moguće odrediti zbog koncentracija ovih elemenata u podlozi i/ili biljnim organima, koje su bile ispod nivoa detekcije AAS.

Bioakumulacioni faktor (BAF) predstavlja odnos koncentracije elementa u listu i njegove pristupačne koncentracije u sedimentu. Ukazuje nam na nivo akumulacije elemenata u nadzemnim delovima (listu) biljke. U junu je BAF > 1 detektovan u Carskoj bari za elemente Mn, Zn, Cu i Cr, dok su na Rudniku svi ispitivani elementi imali vrednost BAF < 1. U Boru 1 je BAF > 1 bio izračunat za sve elemente osim Fe, Pb i Cu, dok je u Boru 2 jedino za Fe ovaj faktor bio manji od 1. Za Pb, Cd i Cr (Carska bara) i Ni, Cd i Co (Bor 2) ovaj faktor nije određen zbog koncentracija ispod nivoa detekcije u podlozi i/ili biljnim delovima.

Translokacioni faktor (TF) predstavlja odnos koncentracije elementa u listu i korenu i ukazuje na nivo translokacije elementa iz korena u nadzemni deo (list). U junu je translokacioni faktor imao vrednost manju od 1 za sve ispitivane elemente, osim u slučaju Mn u Rudniku. Za Pb i Cr (Carska bara, Bor 2), Cd (Carska bara), kao i Ni i Co (Bor 2) ovaj faktor nije određen zbog koncentracija koje su u biljnim delovima bile ispod nivoa detekcije.

Tabela 6. Biokoncentracioni (BCF), bioakumulacioni (BAF) i translokacioni faktor (TF) za biljke sakupljene tokom juna 2018. godine.

Element	Carska bara			Bor 1			Bor 2			Rudnik		
	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF
Fe	18	0,2	0,0	95,2	0,7	0,01	13,2	0,1	0,0	17,4	0,2	0,0
Mn	3,0	2,6	0,8	4,8	2,3	0,48	10,2	5,7	0,6	0,8	0,8	1,0
Ni	11,7	0,9	0,1	40,7	16,3	0,40	-	-	-	9,6	0,4	0,0
Zn	42,6	15,4	0,4	15,6	1,8	0,12	142	27,8	0,2	2,9	0,2	0,0
Pb	1,5	-	-	-	0,1	-	14,4	2,4	0,2	0,1	0,0	0,0
Cu	3,4	1,4	0,4	1,3	0,0	0,02	20,2	1,8	0,1	22,4	0,3	0,0
Cd	15,2	-	-	12,3	1,4	0,11	257	84,0	0,3	3,9	0,1	0,0
Co	45,2	73,6	1,6	65,3	5,4	0,15	-	-	-	4,3	0,9	0,2
Cr	140	-	-	-	36,6	-	62,6	53,9	0,9	4,9	0,8	0,2

Kod svih biljaka uzorkovanih u septembru BCF > 1 je izračunat za sve ispitivane elemente. Najviše zabeležene vrednosti su bile za Fe na svim lokalitetima, kao i za Cd (Bor 1) i Co (Carska bara) (Tabela 7). Za Cd (Carska bara, Bor 2) i Co (Bor 2) ovaj faktor nije bilo moguće odrediti zbog koncentracija koje su u podlozi i/ili biljnim delovima bile ispod nivoa detekcije.

U septembru je BAF > 1 određen za većinu elemenata kod biljaka sa svih lokaliteta, osim biljaka sa Rudnika kod kojih su jedino Fe, Ni i Co imali vrednosti BAF > 1. Najviše zabeležene vrednosti su bile za Co (Carska bara) i Cr (Bor 2) (Tabela 7). BAF < 1 je bio zabeležen za Fe (Carska bara) i Cu (Bor 1), kao i za sve ispitivane elemente kod biljaka sa Rudnika izuzev Fe, Ni i Co. Za Cd (Carska bara, Bor 2, Rudnik) i Co (Bor 2) ovaj faktor nije određen koncentracija koje su u podlozi i/ili biljnim delovima bile ispod nivoa detekcije.

TF je u septembru bio manji od 1 za većinu ispitivanih elemenata na svim lokalitetima. Izuzetak su Pb (Carska bara), Cr (Carska bara, Bor 1, Bor 2) i Mn, Ni i Cd (Bor 2) (Tabela 7). Za Cd (Carska bara, Rudnik) ovaj faktor nije određen zbog nedetektibilnih koncentracija u biljnom materijalu.

Kada poredimo vrednosti faktora između dva perioda uzorkovanja, uočavamo najveće razlike u vrednostima BCF, koje su tokom septembra bile značajno više u odnosu na jun 2018. godine za većinu ispitivanih metala. Tako je BCF za Fe kod biljaka iz Bora 2 bio 17 puta veći u septembru u odnosu na jun. Takođe su veoma visoke vrednosti BCF = 291 i BAF = 305 za Cr zabeležene kod biljaka iz Bora 1. Najmanje razlike se uočavaju za TF, budući da se najveći deo metala kod ispitivanih biljaka akumulira na nivou korena, pa nema značajnih razlika u translokaciji elemenata u nadzemne delove biljke. Izuzetak je Pb, čiji je TF bio gotovo 5 puta veći u Boru 2 tokom septembra.

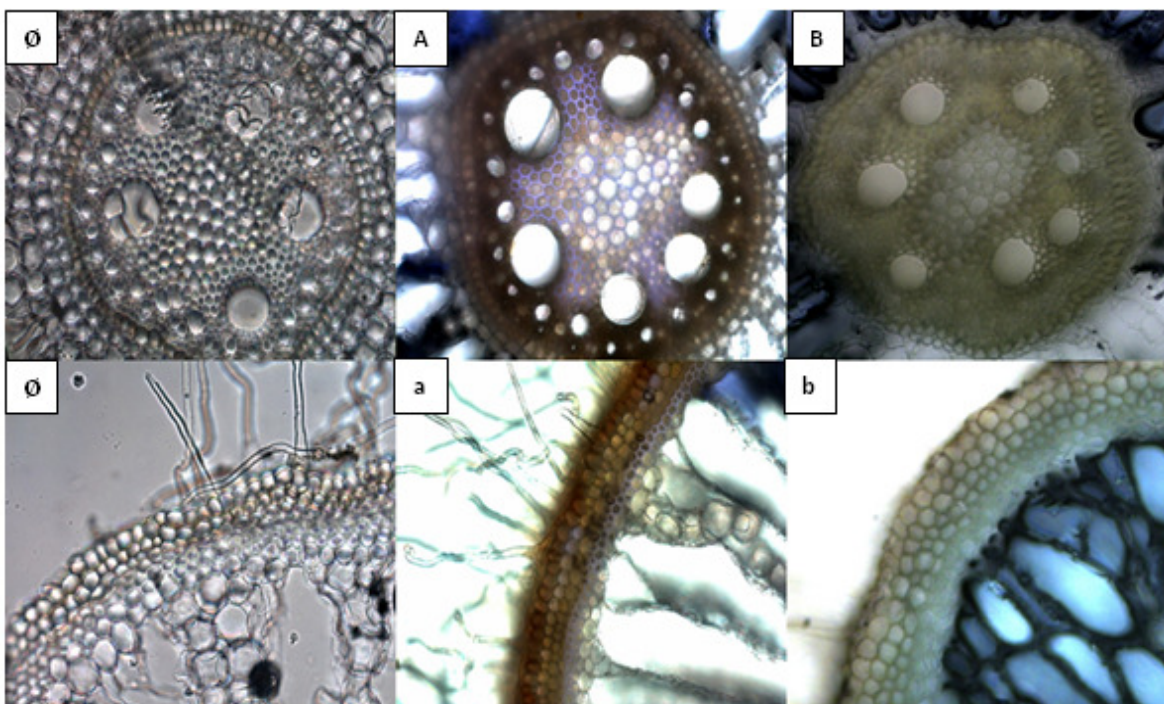
Tabela 7. Biokoncentracioni (BCF), bioakumulacioni (BAF) i translokacioni faktor (TF) za biljke sakupljene tokom septembra 2018. godine.

Element	Carska bara			Bor 1			Bor 2			Rudnik		
	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF	BCF	BAF	TF
Fe	168	0,8	0,0	156	6,4	0,0	302	4,0	0,0	99,6	1,6	0,0
Mn	21,1	7,5	0,4	35,2	5,2	0,2	12,4	17,1	1,4	1,5	0,7	0,4
Ni	10,0	4,8	0,5	81,2	22,4	0,3	47,2	55,9	1,2	5,0	1,4	0,3
Zn	35,2	13,6	0,4	7,1	1,5	0,2	40,9	22,4	0,6	1,3	0,2	0,1
Pb	1,5	1,8	1,2	1,8	1,3	0,7	38,6	31,3	0,8	0,4	0,0	0,0
Cu	5,5	2,1	0,4	2,9	0,0	0,0	18,6	2,15	0,1	15,5	0,4	0,0
Cd	-	-	-	17,3	1,2	0,1	-	-	1,1	1,7	-	-
Co	156	33	0,2	25,4	31,0	0,2	-	-	0,8	2,5	6,2	0,6
Cr	64,7	269	4,2	291	305	1,0	99,1	133	1,4	3,0	0,2	0,0

#### 4.4. Histohemijska lokalizacija i detekcija metala u biljnim tkivima *Phragmites australis* pomoću metode skenirajuće elektronske mikroskopije sa energo-disperzivnom spektrofotometrijom

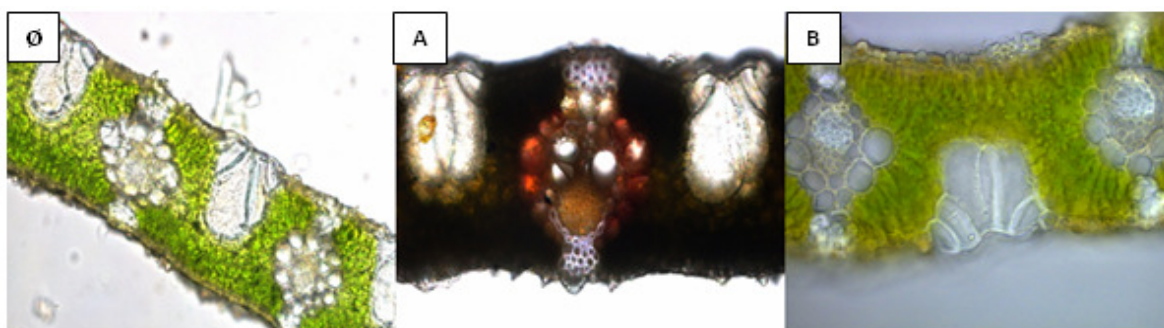
Histohemijska lokalizacija metala u biljnim delovima (koren, rizom, stablo, list) omogućava njihovu vizualizaciju unutar različitih biljnih tkiva, pri čemu ne daje informaciju o njihovoj koncentraciji.

Na osnovu specifične plavoljubičaste boje koja nastaje kao posledica kompleksacije Na-rodizonata i Pb uočava se da je u korenu biljaka olovo dominantno akumulirano u zidovima parenhimskih ćelija srži i ćelija egzodermisa (Slika 7A, 7a). Sličan obrazac akumulacije se uočava i u slučaju Zn. Naime, na osnovu specifične plave boje koja nastaje kao posledica kompleksacije boje cinkon i Zn se uočava da je u korenu biljaka Zn dominantno akumuliran u zidovima parenhimskih ćelija srži i egzodermalnih ćelija (Slika 7B, 7b). Međutim, kada je u pitanju akumulacija Cu primećujemo potpuno drugačiji trend. Na osnovu specifične narandžastocrvene boje koja nastaje kao posledica kompleksacije Na-rodizonata i Cu zaključujemo da je u korenu biljaka Cu dominantno akumuliran unutar ćelija endodermisa, pericikla, kao i unutar floemskih, sklerenhimskih, epidermalnih i egzodermalnih ćelija (Slika 7A, 7a).



Slika 7. Histohemijska detekcija Pb i Cu (A, a) i Zn (B, b) u korenu *Phragmites australis*.

U listu je Pb dominantno akumulirano u zidovima sklerenhimskih ćelija oko provodnih snopića (Slika 8A), dok je Zn također najvećim delom akumuliran u ćelijskim zidovima sklerenhimskih, ali i floemskih ćelija (Slika 8B). Bakar je, međutim, dominantno akumuliran unutar ćelija parenhimske sare i floema (Slika 8A). Takođe, ne može se isključiti prisustvo ispitivanih elemenata u ćelijama hlarenhima.



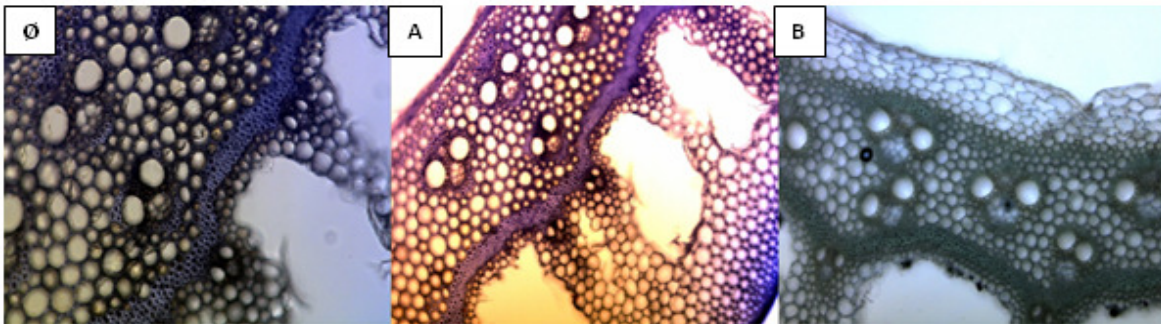
Slika 8. Histohemijska detekcija Pb, Cu (A) i Zn (B) u listu *Phragmites australis*.

U stablu i rizomu je obrazac akumulacije ispitivanih elemenata gotovo identičan. Naime, Pb i Zn su dominantno akumulirani u ćelijskim zidovima sklerenhimskih ćelija pozicioniranim ispod epidermisa i oko provodnih snopića (Slika 9A, 10A, 9B, 10B), dok je Cu akumuliran u epidermalnim, sklerenhimskim ćelijama, parenhimu primarne kore, kao i unutar floemskih ćelija (Slika 9A, 10A).





Slika 9. Histoheмиjska detekcija Pb, Cu (A) i Zn (B) u stablu *Phragmites australis*.

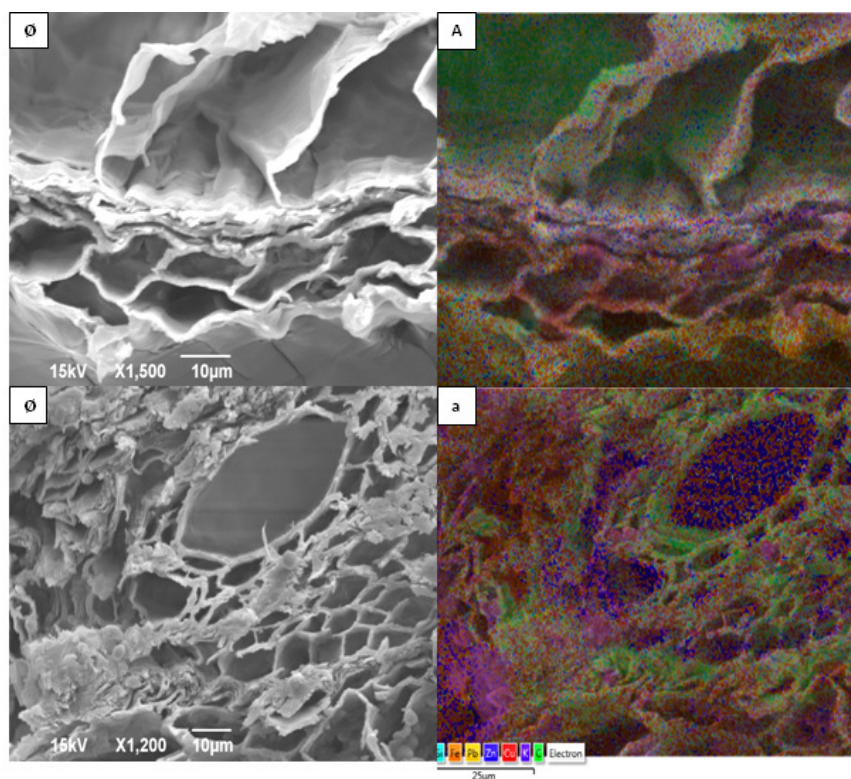


Slika 10. Histoheмиjska detekcija Pb, Cu (A) i Zn (B) u rizomu *Phragmites australis*.

SEM-EDS metoda daje detaljan uvid u anatomske karakteristike preparata, odnosno biljnih delova, omogućava vizualizaciju različitih elemenata i istovremeno daje informaciju o njihovom relativnom masenom udelu u biljnim tkivima.

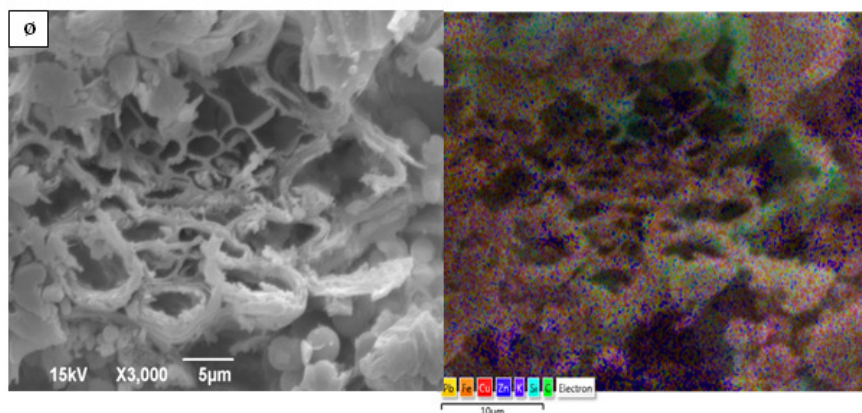
Kako su biljni delovi prethodno liofilizirani vizualizacija elementa unutar ćelije je gotovo nemoguća, ali je moguće utvrditi prisustvo različitih elemenata u zidovima ćelija unutar pojedinih biljnih tkiva.

Tako se na osnovu mikrografija preseka korena uočava značajno prisustvo Fe, Zn, Cu i Pb u ćelijskim zidovima epidermalnih i egzodermalnih ćelija (Slika 11A), dok je prisustvo ovih elemenata potvrđeno i u zidovima parenhimskih ćelija srži (Slika 11a). U epidermalnim i egzodermalnim ćelijama je detektovan najveći relativni udeo Pb (1,45%), zatim sledi Cu (0,45%), Fe (0,21%) i Zn (0,15%) (Prilog 3). Ako posmatramo parenhimske ćelije srži oko ksilemskih elemenata, sadržaj ispitivanih elemenata je bio nešto drugačiji. Naime, ponovo je dominiralo Pb (1,71%), ali za njim slede Fe (0,58%) kao i Zn (0,36%) kog je bilo dvostruko više u tkivima centralnog cilindra korena, dok je sadržaj Cu (0,17%) ovde bio 2 i više puta manji u odnosu na epidermalne i egzodermalne ćelije (Prilog 3).



Slika 11. SEM-EDS detekcija metala u korenu *Phragmites australis*.

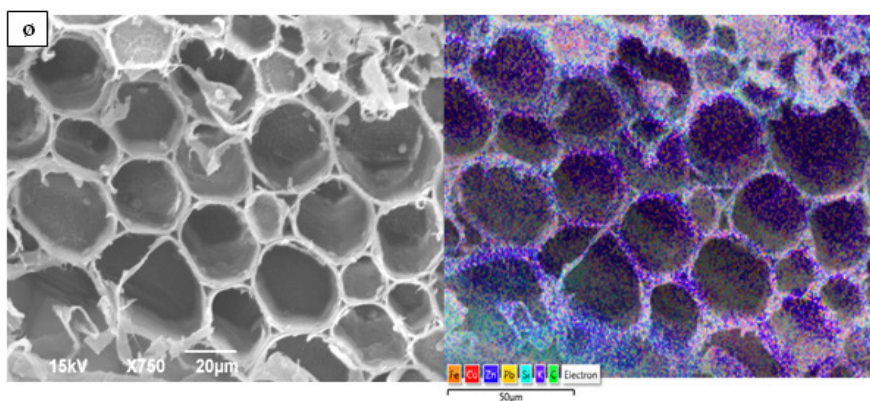
Na osnovu SEM mikrografije preseka lista (Slika 12) se uočava prisustvo Fe, Zn, Cu i Pb u ćelijama hlarenhima. Kada se posmatra maseni udeo ovih elemenata, sadržaj Fe i Cu je bio ispod nivoa detekcije, dok je sadržaj Pb (1,73%) i Zn (0,14%) bio približno jednak onome u ćelijama korena (Prilog 3).



Slika 12. SEM-EDS detekcija metala u listu *Phragmites australis*.

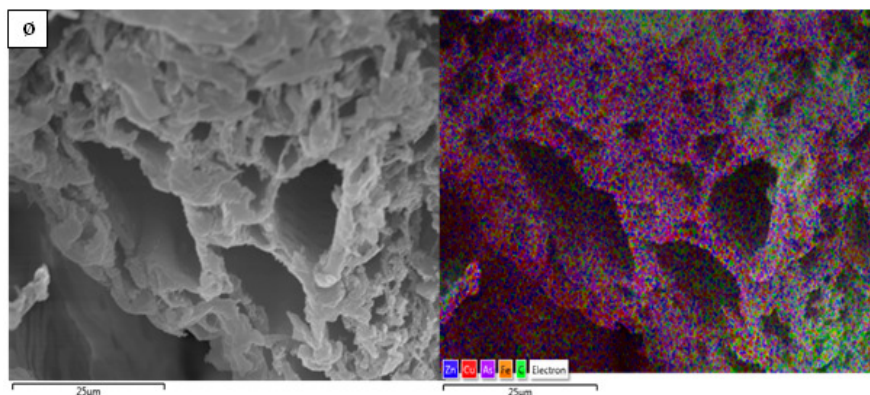
Na SEM mikrografiji preseka stabla (Slika 13) se prisustvo Fe, Zn, Cu i Pb detektuje u parenhimskim ćelijama kore stabla. Međutim, od analiziranih elemenata jedino je bio merljiv maseni udeo Pb (2,53%) koji je bio značajno viši u odnosu na analizirana tkiva korena i lista, dok je sadržaj Fe (0,42%) bio nešto niži u odnosu na parenhimske ćelije srži korena (Prilog 3).





Slika 13. SEM-EDS detekcija metala u stablu *Phragmites australis*.

Na mikrografiji preseka rizoma (Slika 14) se detektuje prisustvo Fe, Zn i Cu u ćelijama parelnima oko provodnih snopića. Na osnovu masenog udela elemenata u datom tkivu, apsolutno dominira Fe (0,91%), čiji je relativni sadržaj bio značajno veći u poređenju sa drugim biljnim delovima. Maseni udeo Zn i Cu je bio ispod nivoa detekcije u ovom biljnom tkivu (Prilog 3).



Slika 14. SEM-EDS detekcija metala u rizomu *Phragmites australis*.

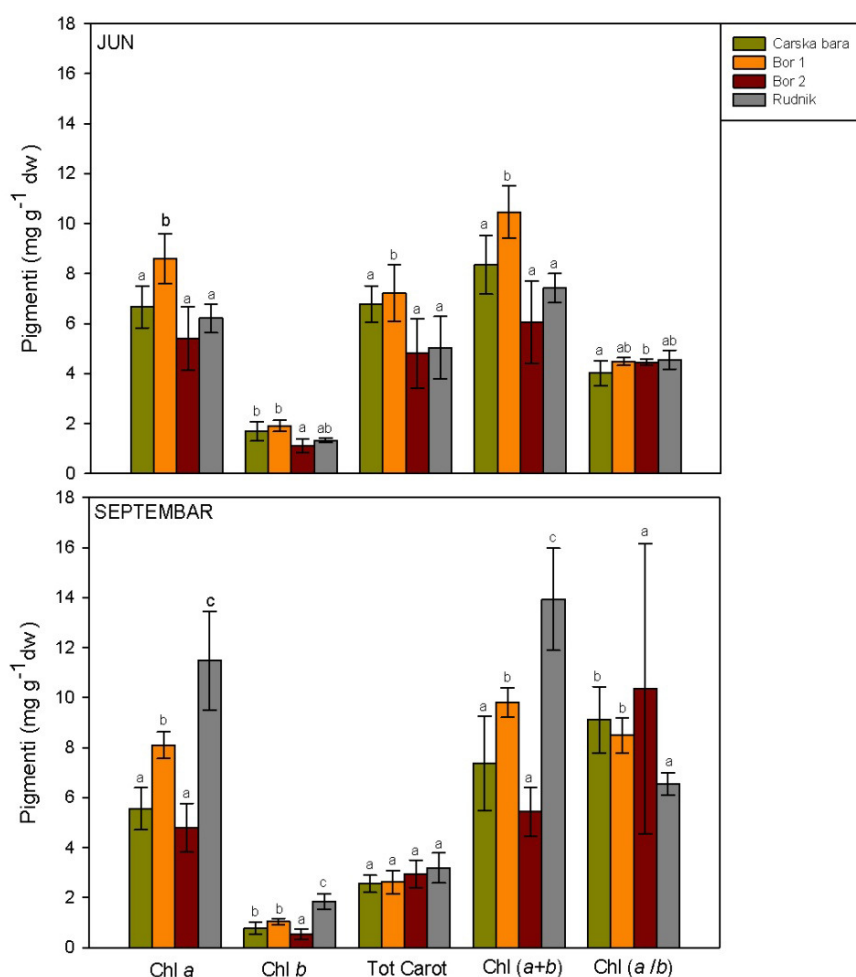
## 4.5. Biohemijski parametri *Phragmites australis*

### 4.5.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Sadržaj fotosintetskih pigmenata hlorofila *a* (Chl *a*), hlorofila *b* (Chl *b*), ukupnih hlorofila (Chl *a+b*) i ukupnih karotenoida (Tot Carot), kao i odnos hlorofila *a* i *b* (Chl *a/b*) u listovima biljaka uzorkovanih u junu i septembru 2018. godine je prikazan na Grafikonu 7.

U junu je sadržaj Chl *a* i karotenoida bio značajno viši u odnosu na sadržaj Chl *b*. Koncentracije Chl *a*, ukupnih karotenoida i Chl (*a+b*) su bile najviše u listovima biljaka iz Bora 1. Najniže izmerene koncentracije ovih pigmenata su zabeležene u listovima biljaka iz Bora 2, ali bez statistički značajnih razlika u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta. Značajna pozitivna korelacija se uočava između fotosintetskih pigmenata, odnosno hlorofila *a* i *b* ( $\rho = 0,923$ ), kao i hlorofila *a* i *b* i karotenoida ( $\rho = 0,73$ ,  $\rho = 0,706$ ) (Prilog 11). Odnos Chl *a/b* je bio najmanji u listovima kontrolnih biljaka, dok je na ostalim lokalitetima ovaj odnos bio približno ujednačen i značajno pozitivno korelisan sa koncentracijom Cd ( $\rho = 0,669$ ) i negativno sa sadržajem fenola u listovima ( $\rho = -0,587$ ) (Prilog 11).

U listovima biljaka uzorkovanih u septembru sadržaj Chl *a* i Chl *b* je bio kod većine biljaka nešto niži u odnosu na jun, osim u slučaju biljaka sa Rudnika kod kojih je došlo do gotovo dvostrukog povećanja koncentracije Chl *a* u odnosu prethodni period, kao i u odnosu na listove biljaka sa drugih lokaliteta. Za razliku od hlorofila, koncentracija ukupnih karotenoida je bila uočljivo niža kod biljaka sa svih lokaliteta uzorkovanih u septembru. Koncentracija Chl *a* u listovima svih biljaka je bila značajno viša u poređenju sa drugim pigmentima. Koncentracije Chl *a*, Chl *b*, ukupnih karotenoida i Chl (*a*+*b*) su bile najviše u listovima biljaka sa Rudnika. Najniže izmerene koncentracije fotosintetskih pigmenta su bile u listovima biljaka iz Bora 2, osim u slučaju karotenoida koji nisu pokazali statistički značajnu razliku između lokaliteta. Između hlorofila *a* i *b* ( $\rho = 0,748$ ) je pokazana značajna pozitivna korelacija (Prilog 13). Odnos Chl *a*/*b* je bio najmanji u listovima biljaka sa Rudnika i značajno negativno korelisan sa koncentracijama Cu ( $\rho = -0,881$ ), Zn ( $\rho = -0,846$ ), Ni ( $\rho = -0,776$ ), Co ( $\rho = -0,720$ ) i Pb ( $\rho = -0,692$ ), dok je pozitivna korelacija detektovana jedino sa Mn ( $\rho = 0,727$ ) (Prilog 13).

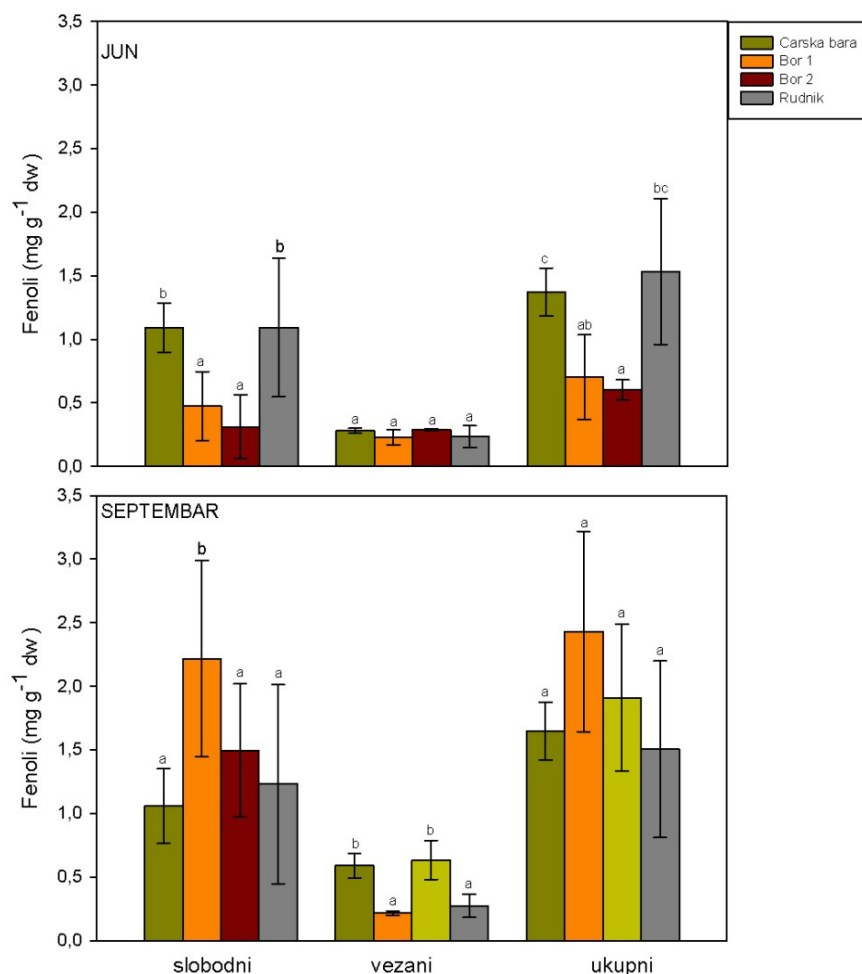


Grafikon 7. Koncentracija Chl *a*, Chl *b*, Tot Carot, Chl (*a*+*b*) i odnos Chl *a*/*b* u listovima *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5.2. Sadržaj fenola

Sadržaj fenola (slobodnih, vezanih i ukupnih) u listovima biljaka sakupljenim u junu i septembru 2018. godine je prikazan na Grafikonu 8.

Sadržaj slobodnih fenola u listovima biljaka uzorkovanim u junu i septembru 2018. je bio značajno viši u odnosu na sadržaj vezanih fenola.



Grafikon 8. Koncentracija fenola (slobodnih, vezanih i ukupnih) u listovima *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

U junu su najviše koncentracije slobodnih i ukupnih fenola u listovima biljaka izmerene u kontrolnim biljkama i biljkama sa Rudnika, dok su dva do tri puta niže vrednosti detektovane u listovima biljaka iz Bora 1 i Bora 2. Kod vezanih fenola nije bilo statistički značajnih razlika između biljaka sa različitih lokaliteta. Značajna negativna korelacija je zabeležena između ukupnog sadržaja fenola i koncentracija Cd ( $\rho = -0,606$ ) i Cu ( $\rho = -0,671$ ), odnosa Chl *a/b* ( $\rho = -0,587$ ) i aktivnosti SOD ( $\rho = -0,643$ ), dok je pozitivna korelacija detektovana između ukupnih fenola i LP ( $\rho = 0,720$ ) (Prilog 11).

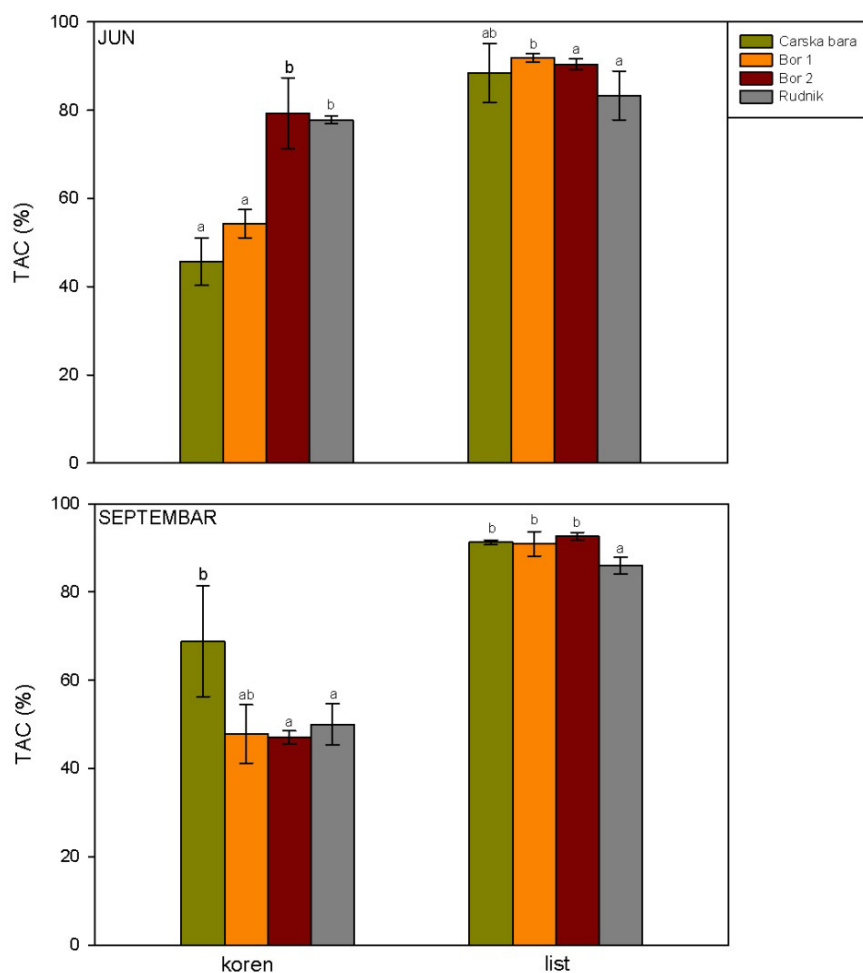
Iako su koncentracije slobodnih i ukupnih fenola u listovima kontrolnih biljaka i biljaka sa Rudnika ostale približno iste kao u prethodnom periodu uzorkovanja, njihov sadržaj je u septembru bio značajno viši u listovima biljaka iz Bora 1 i Bora 2. Nešto višim koncentracijama vezanih fenola se odlikuju listovi kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 2 u

odnosu na prethodni period, dok je njihov sadržaj u listovima biljaka iz Bora 1 i Rudnika ostao približno isti kao u junu.

#### 4.5.3. Ukupan antioksidativni kapacitet

Ukupan antioksidativni kapacitet (TAC) određen u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazan je na Grafikonu 9.

Ukupan antioksidativni kapacitet u korenu biljaka u junu je bio značajno viši u biljkama iz Bora 2 i Rudnika u odnosu na biljke sa drugih lokaliteta, tačnije za oko 50 i 30% viši u odnosu na koren kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 1, respektivno. Tokom ovog perioda uočava se značajna pozitivna korelacija između TAC i koncentracija Pb ( $\rho = 0,758$ ), Zn ( $\rho = 0,678$ ) i Fe ( $\rho = 0,629$ ), dok je negativna korelacija detektovana sa aktivnošću enzima CAT ( $\rho = -0,846$ ), APX ( $\rho = -0,811$ ) i POD ( $\rho = -0,783$ ) (Prilog 10).



Grafikon 9. Ukupan antioksidativni kapacitet (TAC) u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

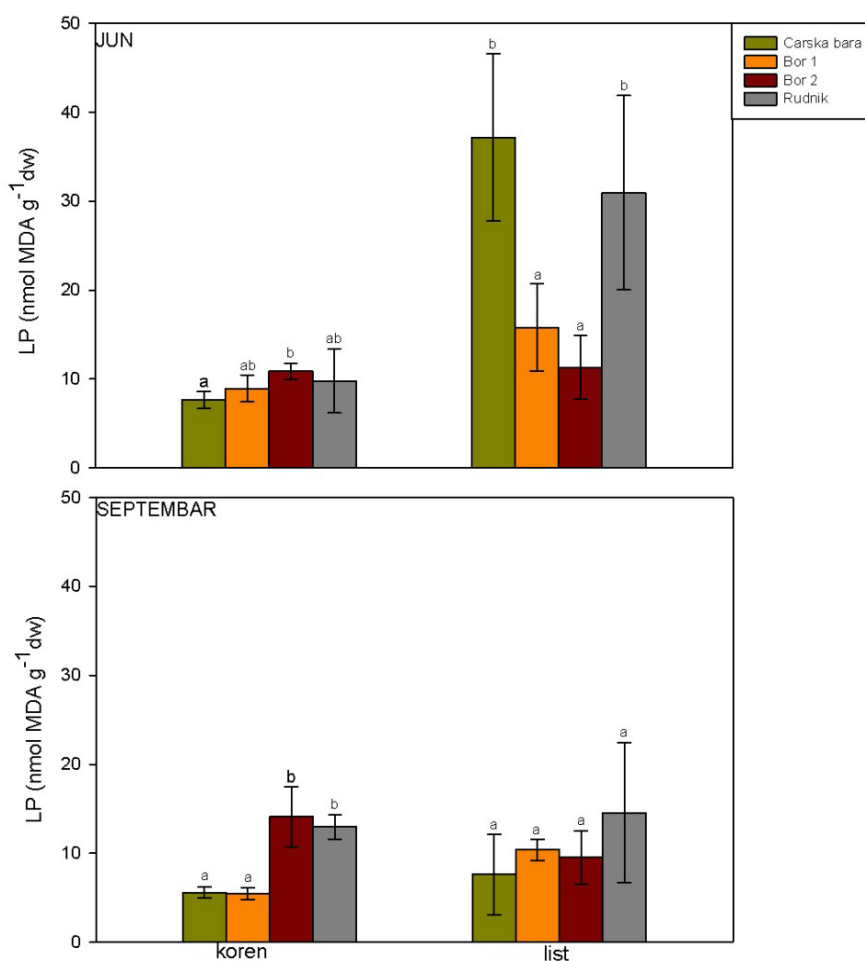
U listu je TAC bio viši u odnosu na koren. Kod biljaka iz Bora 1 TAC je bio statistički značajno viši u odnosu na listove biljaka iz Bora 2 i Rudnika, dok između kontrolnih i biljaka sa jalovišta nije bilo značajnih razlika. Na nivou lista se beleži značajna pozitivna korelacija između ovog parametra i aktivnosti GR ( $\rho = 0,601$ ) (Prilog 11).

Ukupan antioksidativni kapacitet biljaka u septembru je bio i dalje viši u listovima u odnosu na koren biljaka. Najviši TAC je zabeležen u korenu kontrolnih biljaka, dok su na ostalim lokalitetima vrednosti bile približno ujednačene i značajno niže u odnosu na prethodni period, posebno u korenu biljaka iz Bora 2 i Rudnika.

U listu statistički značajno niži TAC imale su biljke sa Rudnika, dok vrednosti u listovima sa ostalih lokaliteta nisu bile statistički značajno različite. Totalni antioksidativni kapacitet listova u septembru je pokazao značajnu negativnu korelaciju sa ukupnim sadržajem hlorofila ( $\rho = -0,713$ ), odnosno sadržajem hlorofila *a* ( $\rho = -0,699$ ) i hlorofila *b* ( $\rho = -0,664$ ) (Prilog 13).

#### 4.5.4. Stepen lipidne peroksidacije membrana

Stepen lipidne peroksidacije membrana (LP) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine je prikazan na Grafikonu 10.



Grafikon 10. Stepen lipidne peroksidacije membrana (LP) u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Kada posmatramo nivo MDA na nivou korena u junu, uočava se najniža koncentracija kod kontrolnih biljaka, dok je značajno viša izmerena u korenu biljaka iz Bora 2, ali bez značajnih razlika u odnosu na biljke sa drugih odlagališta jalovine. U korenu se značajna

pozitivna korelacija beleži između LP i sadržaja proteina ( $\rho = 0,790$ ), a negativna između LP i aktivnosti POD ( $\rho = -0,587$ ) (Prilog 10).

U listu je nivo MDA bio viši u odnosu na koren, sa najizraženijom razlikom kod kontrolnih biljaka gde je 5 puta veći nivo MDA zabeležen u listu. Značajno viša koncentracija MDA je bila u listovima kontrolnih biljaka i biljaka sa Rudnika, u poređenju sa biljkama sa ostalih lokaliteta, pa su tako biljke iz Bora 1 i Bora 2 imale 2 i 3 puta manji nivo MDA u odnosu na kontrolne biljke. U listu se značajna negativna korelacija beleži između LP i aktivnosti SOD ( $\rho = -0,671$ ) i Chl *a/b* ( $\rho = -0,594$ ), kao i koncentracija Zn ( $\rho = -0,876$ ), Cu ( $\rho = -0,783$ ), Cd ( $\rho = -0,782$ ) i Fe ( $\rho = -0,587$ ), dok se značajna pozitivna korelacija beleži sa ukupnim fenolima u listu ( $\rho = 0,720$ ) (Prilog 11).

U septembru su koncentracije MDA u korenu biljaka iz Bora 2 i Rudnika bile nešto više u odnosu na prethodni period, kao i u odnosu na koncentracije u korenovima biljaka sa preostala dva lokaliteta u kojima je sadržaj MDA bio duplo niži u odnosu na biljke sa navedenih lokaliteta. Značajna pozitivna korelacija u korenu je detektovana sa Pb ( $\rho = 0,755$ ), dok je negativna uočena sa Mn ( $\rho = -0,825$ ) (Prilog 12).

U listovima je koncentracija MDA bila značajno niža u odnosu na prethodni period, odnosno 5 i 2 puta niža kod kontrolnih biljaka i biljaka sa Rudnika. Poređenjem biljaka sa različitih lokaliteta uočava se najviša koncentracija MDA u biljkama sa Rudnika, ali bez statistički značajnih razlika u odnosu na sadržaj u listovima biljaka sa preostalim lokalitetima.

#### 4.4.5. Sadržaj ukupnih proteina

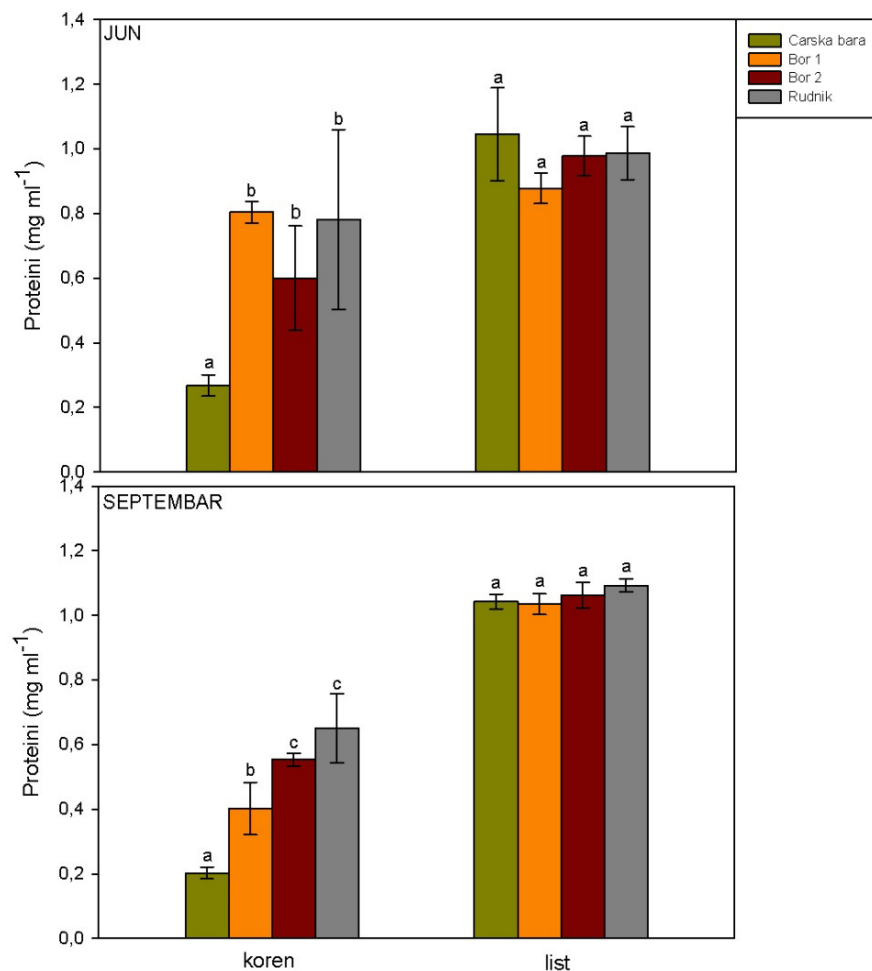
Sadržaj proteina u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine je prikazan na Grafikonu 11.

Koncentracija proteina u korenu biljaka u junu je bila značajno viša u biljkama sa odlagališta jalovine u odnosu na kontrolne biljke, odnosno 2 puta viša u biljkama iz Bora 2 i Bora 1 i 3 puta viša u biljkama sa Rudnika, respektivno. U korenu se uočava značajna pozitivna korelacija između koncentracije Fe i sadržaja proteina ( $\rho = 0,734$ ) (Prilog 10).

U listu su zabeležene više koncentracije proteina u odnosu na koren biljaka, sa najizraženijom razlikom kod kontrolnih biljaka kod kojih je koncentracija proteina u listu bila 4 puta viša u odnosu na koren. Istovremeno, kontrolne biljke su sadržale nešto višu koncentraciju ukupnih proteina u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta, ali bez statistički značajnih razlika. Na nivou lista je tokom datog perioda detektovana značajna pozitivna korelacija između sadržaja proteina i koncentracije Co ( $\rho = 0,587$ ), kao i negativna korelacija sa hlorofilom *a* ( $\rho = -0,608$ ) i hlorofilom *b* ( $\rho = -0,587$ ) (Prilog 11).

Koncentracije proteina u korenu u septembru su bile niže u odnosu na prethodni period, sa najvećom razlikom kod biljaka iz Bora 1, kod kojih je u septembru izmerena duplo niža koncentracija proteina u odnosu na jun. Značajno više koncentracije proteina utvrđene su kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu. Tako su biljke iz Bora 1 imale duplo veći sadržaj, a biljke iz Bora 2 i Rudnika oko 3 puta veći sadržaj proteina u odnosu na kontrolne biljke. Značajna pozitivna korelacija je pokazana između sadržaja proteina i LP ( $\rho = 0,599$ ), koncentracija Pb ( $\rho = 0,862$ ), Zn ( $\rho = 0,760$ ), Cd ( $\rho = 0,635$ ) i Cr ( $\rho = 0,585$ ), dok je negativna korelacija zabeležena sa aktivnošću enzima CAT ( $\rho = -0,932$ ), APX ( $\rho = -0,921$ ) i POD ( $\rho = -0,753$ ) (Prilog 12). Koncentracija proteina u listovima je bila približno ujednačena, bez statistički značajnih razlika među lokalitetima i nije značajnije odstupala u odnosu na prethodni period. Značajno više koncentracije proteina su bile prisutne u listovima u odnosu na koren biljaka. Ovaj odnos koncentracija najupečatljiviji je kod kontrolnih biljaka, sa gotovo 5 puta većom koncentracijom u listovima u odnosu na koren biljaka. U listovima se značajna

negativna korelacija beleži između sadržaja proteina i Chl  $a/b$  ( $\rho = -0,608$ ) i koncentracije Mn ( $\rho = -0,706$ ), dok se značajna pozitivna korelacija uočava sa aktivnošću POD ( $\rho = 0,713$ ) (Prilog 13).



Grafikon 11. Koncentracija proteina u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.6. Aktivnost antioksidativnih enzima

##### 4.4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazana je na Grafikonu 12.

U junu su kontrolne biljke imale višu aktivnost SOD u korenu u odnosu na sve biljke sa jalovišta, kao i u odnosu na listove biljaka. Značajna pozitivna korelacija na nivou korena je detektovana između aktivnosti SOD i koncentracije Ni ( $\rho = 0,641$ ), dok se negativna javlja između SOD i koncentracije Fe ( $\rho = -0,601$ ), kao i aktivnosti GR ( $\rho = -0,580$ ) (Prilog 10).

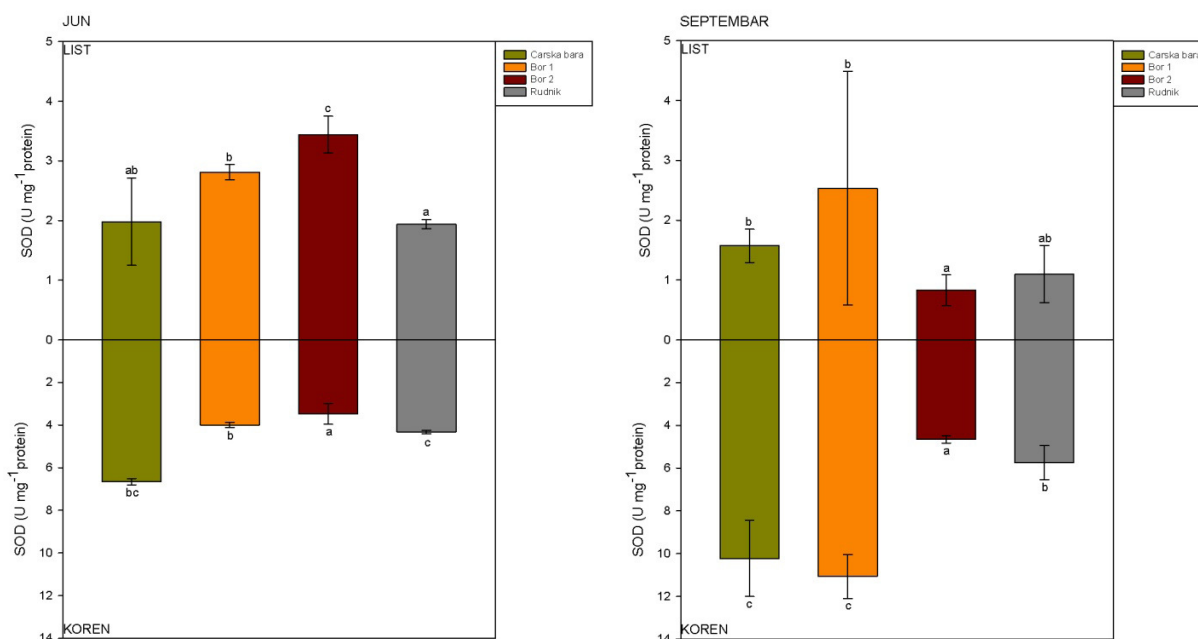
U listu se najvišom aktivnošću SOD odlikuju biljke iz Bora 2, dok su kontrolne biljke i biljke sa Rudnika imale značajno niži i međusobno sličan nivo aktivnosti SOD. Značajna pozitivna korelacija u listu je detektovana između aktivnosti datog enzima i koncentracija Cu



( $\rho = 0,874$ ), Zn ( $\rho = 0,797$ ), Fe ( $\rho = 0,699$ ) i Cd ( $\rho = 0,641$ ), dok je negativna korelacija prisutna između aktivnosti SOD i ukupnih fenola ( $\rho = -0,643$ ) i LP ( $\rho = -0,671$ ) (Prilog 11).

Aktivnost SOD u korenu biljaka uzorkovanih u septembru je bila veća u odnosu na aktivnost u prethodnom periodu, što je posebno izraženo kod kontrolnih biljaka i onih sa lokaliteta Bor 1 kod kojih se aktivnost povećala 2 i skoro 3 puta, dok je aktivnost u biljkama iz Bora 2 i Rudnika ostala veoma slična onoj iz juna. Zbog toga su i značajno više aktivnosti SOD zabeležene u korenu kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 1 u odnosu na biljke sa preostala dva lokaliteta. Detektovana je značajna pozitivna korelacija između aktivnosti SOD i aktivnosti APX ( $\rho = 0,671$ ), CAT ( $\rho = 0,678$ ), kao i koncentracije Mn ( $\rho = 0,860$ ), dok je negativna korelacija zabeležena sa koncentracijom Pb ( $\rho = -0,636$ ) i LP ( $\rho = -0,755$ ) (Prilog 12).

U listu su u odnosu na prethodni period izmerene aktivnosti SOD kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika bile višestruko niže u odnosu na koren, što predstavlja jednu od glavnih razlika između biljaka uzorkovanih u junu i septembru. Kao rezultat povećanja aktivnosti SOD u korenu i nešto smanjene aktivnosti u listu uočavaju se veće razlike, pa je kod kontrolnih biljaka, biljaka iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika aktivnost SOD bila 6,5, 4,4, 5,6 i 5,2 puta niža u odnosu na koren, respektivno. U listu su se biljke iz Bora 1 i kontrolne biljke odlikovale višom aktivnošću SOD u odnosu na biljke sa preostala dva lokaliteta. Takođe je detektovana značajna negativna korelacija između aktivnosti SOD i koncentracije Fe u listu biljaka ( $\rho = -0,776$ ) (Prilog 13).



Grafikon 12. Aktivnost SOD u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.6.2. Aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazana je na Grafikonu 13.

U junu je aktivnost CAT u korenu biljaka sa deponija jalovine bila značajno niža u odnosu na kontrolne biljke, pa su tako kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika aktivnosti datog enzima bile 11 i 10 puta manje u odnosu na kontrolu. Takođe se uočava značajna negativna korelacija na nivou korena između aktivnosti CAT i koncentracija Fe ( $\rho = -0,587$ ), Zn ( $\rho = -0,594$ ), Pb

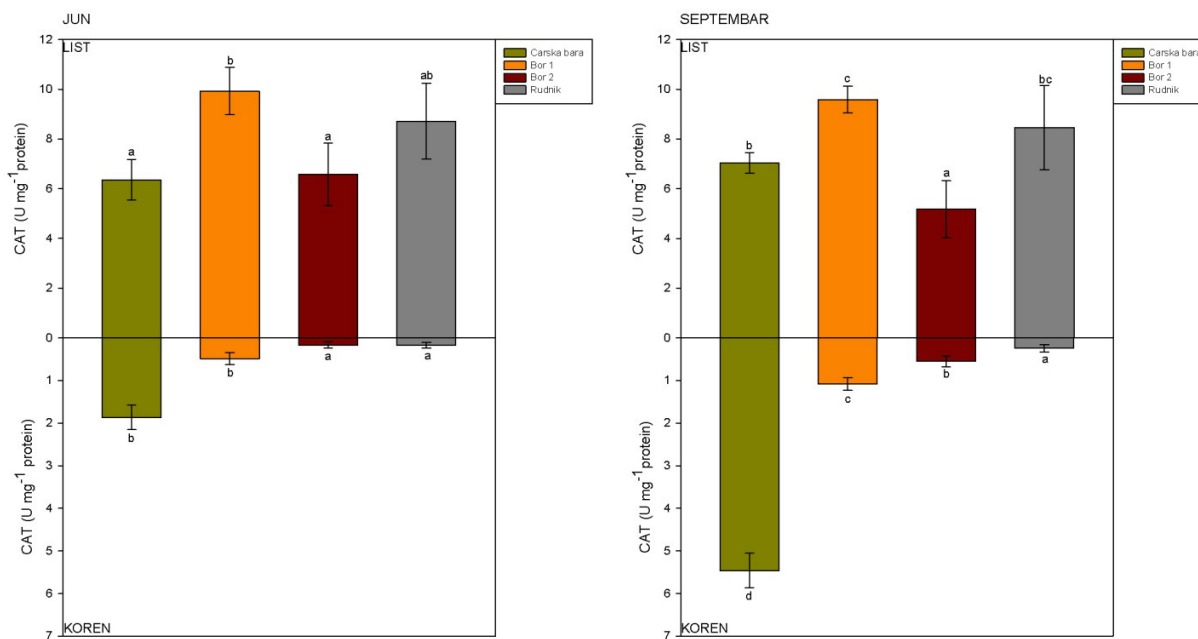


( $\rho = -0,669$ ) i TAC ( $\rho = -0,846$ ), dok je značajna pozitivna korelacija prisutna između aktivnosti CAT i POD ( $\rho = 0,881$ ) i CAT i APX ( $\rho = 0,902$ ) (Prilog 10).

U listovima je aktivnost CAT bila značajno veća u odnosu na korenove svih biljaka u oba perioda uzorkovanja, sa najizraženijom razlikom kod biljaka sa deponija jalovine. Tako je aktivnost CAT u listu bila čak 20, 40 i 50 puta veća u odnosu na koren biljaka iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika, respektivno. Najveću aktivnost na nivou lista CAT je ispoljila kod biljaka iz Bora 1, gde je bila značajno viša u odnosu na kontrolne i biljke iz Bora 2. Detektovana je značajna pozitivna korelacija između aktivnosti CAT i ukupnih hlorofila ( $\rho = 0,643$ ), koncentracije Ni ( $\rho = 0,594$ ) i aktivnosti enzima APX ( $\rho = 0,951$ ) i POD ( $\rho = 0,762$ ), a negativna između aktivnosti CAT i koncentracije Co ( $\rho = -0,713$ ) (Prilog 11).

U septembru se aktivnost CAT u korenu biljaka povećala u odnosu na prethodni period, gotovo 3, 2,2, 3,4 i 1,5 puta kod kontrolnih, biljaka iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika, respektivno, u odnosu na jun iste godine. Kada se porede aktivnosti CAT u biljkama sa različitih lokaliteta uočava se značajno veća aktivnost u korenu kontrolnih biljaka u odnosu na ostale lokalitete, koja je 5, gotovo 10 i čak 22 puta veća u odnosu na biljke iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika, respektivno. Značajna negativna korelacija se uočava sa koncentracijama Pb ( $\rho = -0,923$ ), Zn ( $\rho = -0,804$ ), Cr ( $\rho = -0,692$ ) i Cd ( $\rho = -0,708$ ), kao i sa LP ( $\rho = -0,657$ ) i koncentracijom proteina ( $\rho = -0,932$ ), dok je značajna pozitivna korelacija zabeležena između CAT i enzima APX ( $\rho = 0,965$ ), POD ( $\rho = 0,748$ ) i SOD ( $\rho = 0,678$ ) (Prilog 12).

Istovremeno aktivnost CAT u listu je imala sličan obrazac kao u prethodnom periodu, sa nešto nižom aktivnosti kod biljaka iz Bora 2 i malo višom aktivnosti kod kontrolnih biljaka, ali bez značajnijih razlika u odnosu na jun iste godine. Najmanja aktivnost CAT je bila u listovima biljaka iz Bora 2, dok je najveću aktivnost CAT ispoljila u biljkama iz Bora 1, koja je bila značajno viša u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta. Značajna negativna korelacija je detektovana između aktivnosti CAT i koncentracije Ni ( $\rho = -0,636$ ), a pozitivna između aktivnosti CAT i koncentracije hlorofila *b* ( $\rho = 0,643$ ) i aktivnosti APX ( $\rho = 0,958$ ) (Prilog 13).



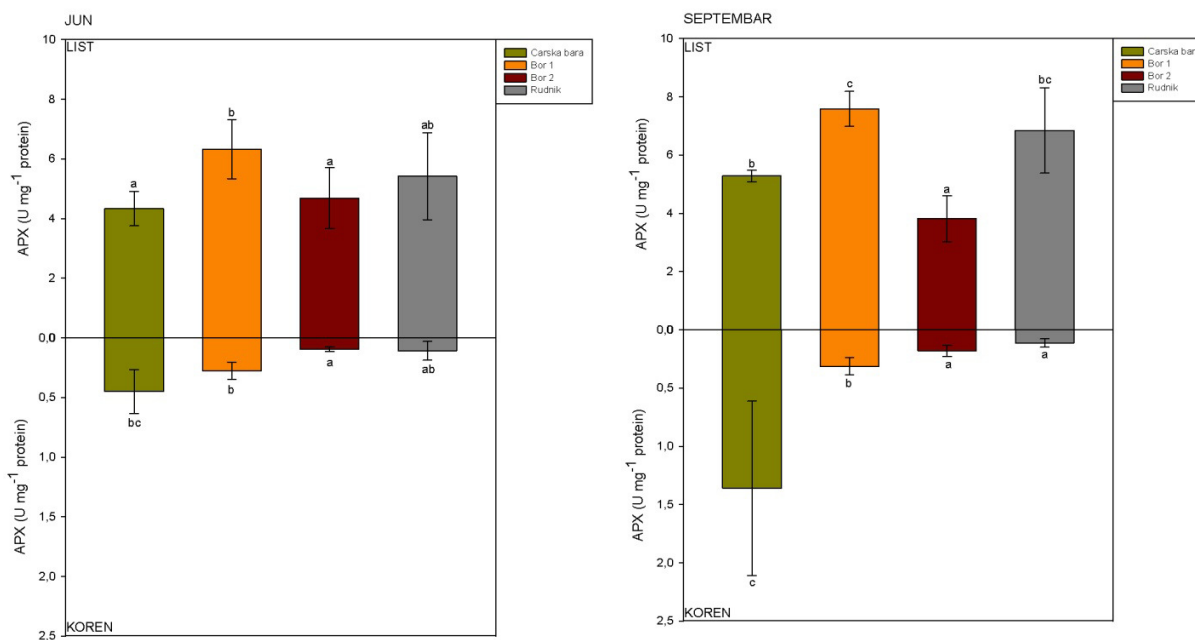
Grafikon 13. Aktivnost CAT u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazana je na Grafikonu 14.

U junu je aktivnost APX u korenu bila niža kod biljaka sa deponija jalovine u odnosu na kontrolne biljke, sa najizraženijom razlikom kod biljaka iz Bora 2 gde je zabeležena gotovo 5 puta niža aktivnost u odnosu na kontrolu. Značajna pozitivna korelacija je zabeležena između aktivnosti APX i CAT ( $\rho = 0,902$ ) i APX i POD ( $\rho = 0,776$ ), dok je aktivnost datog enzima bila negativno korelisana sa TAC ( $\rho = -0,783$ ) i koncentracijama Pb ( $\rho = -0,812$ ), Zn ( $\rho = -0,615$ ) i Cd ( $\rho = -0,608$ ) (Prilog 10).

Aktivnost APX je bila znatno veća u listovima u odnosu na koren, gotovo 4, 24, 21 i čak 60 puta kod kontrolnih biljaka, biljaka iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika, respektivno. U listovima je najveću aktivnost APX ispoljila u biljkama iz Bora 1, kod kojih je bila značajno viša u odnosu na kontrolne i biljke iz Bora 2. Značajna pozitivna korelacija zabeležena je u odnosu na koncentraciju Ni ( $\rho = 0,630$ ), ukupnih hlorofila ( $\rho = 0,594$ ), i aktivnost enzima CAT ( $\rho = 0,951$ ) i POD ( $\rho = 0,706$ ), a negativna u odnosu na koncentraciju Co ( $\rho = -0,636$ ) (Prilog 11).



Grafikon 14. Aktivnost APX u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

U septembru je aktivnost APX u korenu biljaka bila viša kod kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 2 za 3 i gotovo 2 puta u odnosu na prethodni period uzorkovanja, dok je kod biljaka sa preostala dva lokaliteta zadržan sličan nivo aktivnosti APX. Najveću aktivnost u listovima APX je ispoljila u korenu kontrolnih biljaka sa 4, gotovo 8 i čak 12 puta većom aktivnošću u odnosu na biljke iz Bora 1, Bora 2 i Rudnika, respektivno. Utvrđena je značajna pozitivna korelacija sa aktivnošću CAT ( $\rho = 0,965$ ) i POD ( $\rho = 0,657$ ) i negativna sa LP ( $\rho = -0,762$ ), koncentracijom proteina ( $\rho = -0,921$ ) i koncentracijama Pb ( $\rho = -0,916$ ), Zn ( $\rho = -0,762$ ), Cr ( $\rho = -0,692$ ) i Cd ( $\rho = -0,669$ ) (Prilog 12).

Istovremeno, aktivnost APX u listovima biljaka je zadržala sličan obrazac kao i u prethodnom periodu kada se porede biljke sa različitih lokaliteta. Tokom septembra u

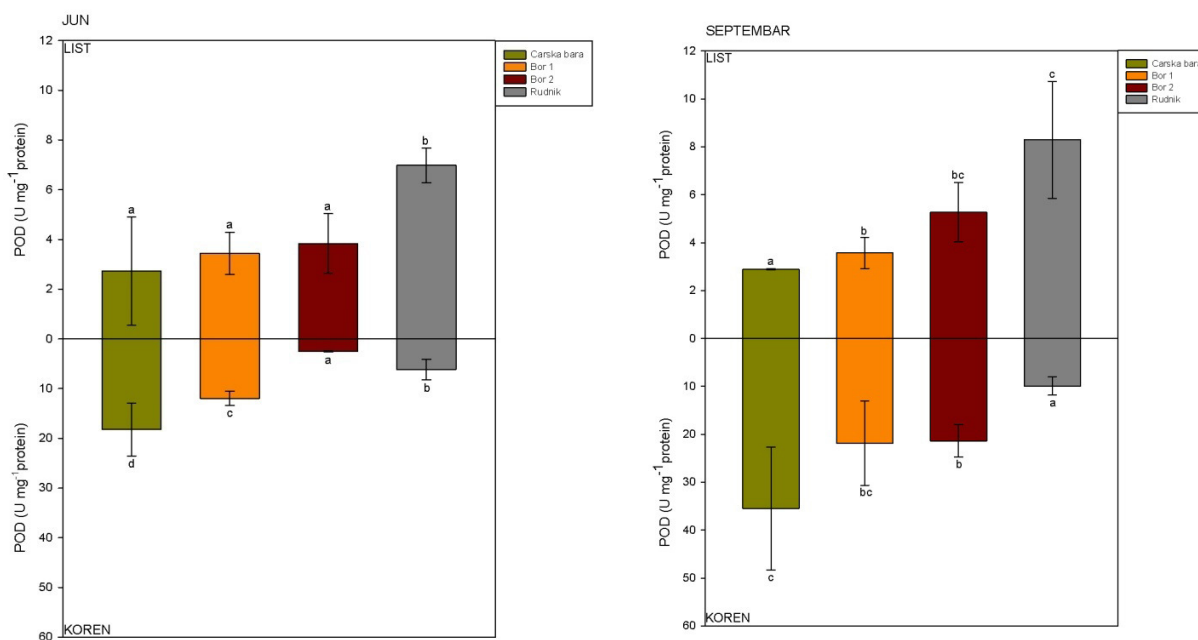
listovima svih biljaka dolazi do blagog povećanja aktivnosti APX, osim kod biljaka iz Bora 2 gde je uočen blagi pad. Tako je značajno niža aktivnost APX zabeležena kod biljaka iz Bora 2 u odnosu na ostale lokalitete, odnosno dvostruko manja od aktivnosti datog enzima u biljkama iz Bora 1. Značajna pozitivna korelacija je detektovana između aktivnosti APX i hlorofila *b* ( $\rho = 0,636$ ), ukupnih hlorofila ( $\rho = 0,587$ ) i aktivnosti CAT ( $\rho = 0,958$ ) (Prilog 13).

#### 4.4.6.4. Aktivnost gvajakol peroksidaze

Aktivnost gvajakol peroksidaze (POD) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazana je na Grafikonu 15.

U junu je najveću aktivnost POD pokazala u korenu kontrolnih biljaka, dok je višestruko, gotovo 9 i 3 puta bila niža u korenu biljaka iz Bora 2 i Rudnika, respektivno. Ako se upoređi aktivnost POD u korenu sa onom u listovima, uočava se da je aktivnost u korenu bila daleko veća (7 i gotovo 3 puta) kod kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 1 u odnosu na listove, dok su razlike u aktivnosti ovog enzima bile manje izražene kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika. Značajna pozitivna korelacija na nivou korena je utvrđena između aktivnosti POD i CAT ( $\rho = 0,881$ ) i APX ( $\rho = 0,776$ ), dok se negativna korelacija uočava sa TAC ( $\rho = -0,811$ ), LP ( $\rho = -0,587$ ), i koncentracijom Fe ( $\rho = -0,734$ ) (Prilog 10).

Istovremeno, u listovima biljaka POD je najvišu aktivnost ispoljila u biljkama sa Rudnika. U listovima je detektovana značajna pozitivna korelacija između POD i koncentracije Mn ( $\rho = 0,699$ ), aktivnosti CAT ( $\rho = 0,762$ ) i APX ( $\rho = 0,706$ ), dok je negativna korelacija zabeležena između POD i koncentracije Co ( $\rho = -0,741$ ) (Prilog 11).



Grafikon 15. Aktivnost POD u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Aktivnost POD u korenu biljaka uzorkovanih u septembru se povećala u svim ispitivanim biljkama, sa najvećim skokom aktivnosti kod biljaka iz Bora 2, kod kojih je aktivnost POD porasla 8 puta u odnosu na jun iste godine. Iako je aktivnost POD u korenu svih biljaka sa deponija jalovine bila niža u odnosu na kontrolu, najniža aktivnost POD je bila prisutna kod biljaka sa Rudnika sa vrednošću gotovo 3 puta nižom u odnosu na kontrolne

biljke. Značajna pozitivna korelacija u korenu detektovana je između aktivnosti POD i CAT ( $\rho = 0,748$ ) i APX ( $\rho = 0,657$ ), a negativna korelacija se beleži između aktivnosti POD i koncentracije proteina ( $\rho = -0,753$ ), koncentracija Pb ( $\rho = -0,811$ ), Zn ( $\rho = -0,748$ ), Cd ( $\rho = 0,630$ ) i Ni ( $\rho = -0,622$ ) (Prilog 12).

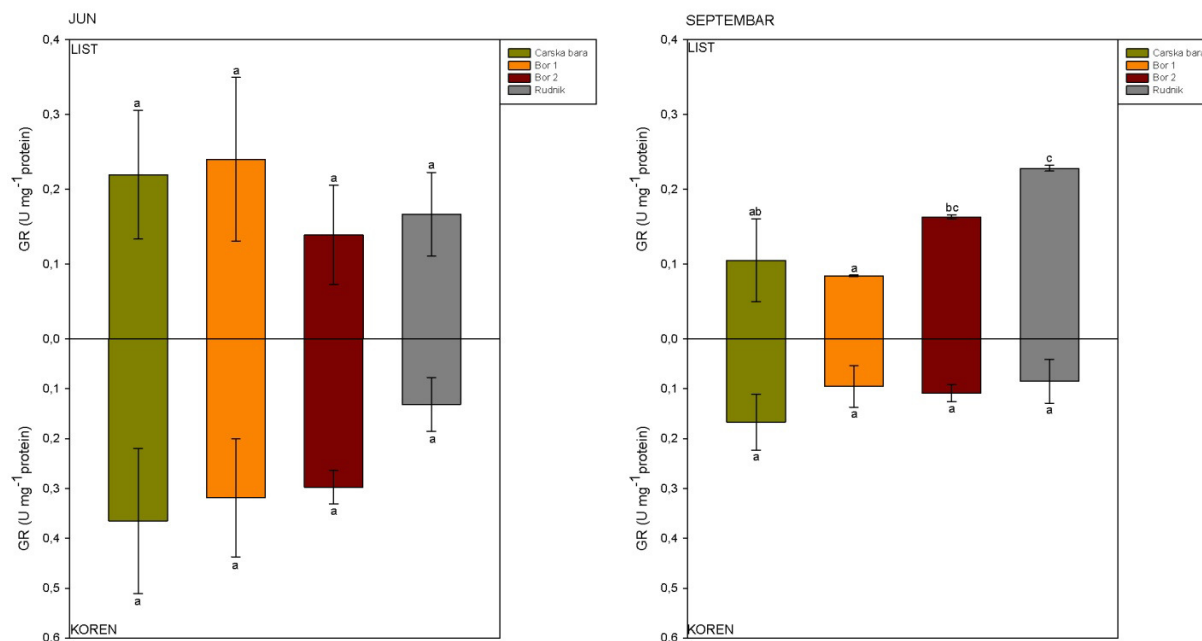
Istovremeno u listovima je tokom septembra došlo do blagog porasta aktivnosti POD kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika u odnosu na prethodni period. Međutim, zadržan je sličan obrazac u aktivnosti kada se porede biljke sa različitih lokaliteta, pa je najveća aktivnost POD zabeležena kod biljaka sa Rudnika, gotovo 3 puta veća u odnosu na kontrolne biljke. U listovima je aktivnost POD bila značajno pozitivno korelisana sa koncentracijama Cu ( $\rho = 0,713$ ), Co ( $\rho = 0,706$ ), Zn ( $\rho = 0,622$ ) i Ni ( $\rho = 0,594$ ), kao i koncentracijom proteina ( $\rho = 0,713$ ) i aktivnošću GR ( $\rho = 0,664$ ), dok je negativno korelisana bila sa Chl *a/b* ( $\rho = -0,853$ ) (Prilog 13).

#### 4.4.6.5. Aktivnost glutation reduktaze

Aktivnost glutation reduktaze (GR) u korenu i listu biljaka sakupljenih u junu i septembru 2018. godine prikazana je na Grafikonu 16.

Najveća zabeležena aktivnost GR u korenu biljaka u junu je izmerena kod kontrolnih biljaka, ali bez statistički značajnih razlika u odnosu na ostale lokalitete. Aktivnost GR u korenu je bila značajno negativno korelisana sa koncentracijom Cd ( $\rho = -0,622$ ) i aktivnošću SOD ( $\rho = -0,580$ ) (Prilog 10). Poređenjem aktivnosti GR u korenu i listovima se uočava da se aktivnost GR značajno ne razlikuje, osim u slučaju biljaka iz Bora 2 kod kojih je u korenu aktivnost ovog enzima bila 2 puta veća u odnosu na list.

U listovima biljaka iz Bora 2 i Rudnika se beleže niže aktivnosti GR u odnosu na druga dva lokaliteta, ali bez statistički značajnih razlika među lokalitetima. U listu je aktivnost GR bila značajno pozitivno korelisana sa ukupnim antioksidativnim kapacitetom ( $\rho = 0,601$ ) (Prilog 11).



Grafikon 16. Aktivnost GR u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine. Statistički značajne vrednosti koncentracija metala u biljnim delovima trske među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

U odnosu na biljke uzorkovane u junu, kod biljaka iz septembra se uočava pad aktivnosti GR u korenu biljaka i najizraženiji je kod kontrolnih biljaka, biljaka iz Bora 1 i Bora 2 kod kojih je aktivnost manja za 2, odnosno 3 i gotovo 3 puta u odnosu na prethodni period. Poređenjem biljaka sa različitih lokaliteta se primećuje da na nivou korena nema značajnih razlika u aktivnosti GR. Značajna pozitivna korelacija se beleži sa aktivnošću CAT ( $\rho=0,608$ ), a negativna sa koncentracijama Zn ( $\rho = -0,678$ ), Cr ( $\rho = -0,650$ ), Cu ( $\rho = -0,636$ ), Cd ( $\rho = -0,620$ ) i Co ( $\rho = -0,580$ ) (Prilog 12).

Takođe je i na nivou lista došlo do značajnog pada aktivnosti GR u odnosu na prethodni period uzorkovanja kod kontrolnih i biljaka iz Bora 1, kod kojih je zabeležena aktivnost GR bila niža 2 i gotovo 3 puta u odnosu na prethodni period. Za razliku od njih, u listovima biljaka iz Bora 2 i Rudnika tokom septembra je došlo do blagog porasta aktivnosti datog enzima u odnosu na prethodni period, pa su najviše vrednosti izmerene kod biljaka sa Rudnika. U listovima je aktivnost GR značajno pozitivno korelisana sa aktivnošću POD ( $\rho = 0,664$ ) i koncentracijama Ni ( $\rho = 0,755$ ) i Cu ( $\rho = 0,608$ ), a značajna negativna korelacija se beleži sa Chl *a/b* ( $\rho = -0,706$ ) i koncentracijama Mn ( $\rho = -0,860$ ) i Cr ( $\rho = -0,699$ ) (Prilog 13).

## 5. DISKUSIJA

Jedan od glavnih i veoma kompleksnih izazova čovečanstva je duboko razumevanje posledica koje antropogene aktivnosti imaju na životnu sredinu, dok je jedan od ključnih zadataka pokušaj da se štetan uticaj na životnu sredinu umanjí što je više moguće. Zagađenje zemljišta i voda metalima predstavlja globalni problem koji je posebno izražen u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju, prvenstveno zbog rudarstva, kao i višedecenijske upotrebe pesticida i mineralnih đubriva. Navedene aktivnosti su dovele do akumulacije metala u površinskim slojevima zemljišta, a zatim do njihovog kretanja kroz zemljište i oslobađanja u okolne vodene i kopnene ekosisteme, odakle putem lanaca ishrane lako dospevaju na sve trofičke nivoe i ispoljavaju negativne efekte na žive organizme. U procesu prirodnog smanjenja negativnih uticaja metala u životnoj sredini veliku ulogu imaju biljke koje svojim biološkim aktivnostima utiču na smanjenje njihove koncentracije i mobilnosti u podlozi.

Globalno rasprostranjene vrste koje pokazuju visok potencijal za aklimatizaciju na širok spektar promena uslova u životnoj sredini mogu biti dobri kandidati za nastanjivanje metalima zagađenih podloga. Jedna od njih je *Phragmites australis*, emerzna vodena biljka koja zahvaljujući velikoj genetičkoj varijabilnosti i izraženoj fenotipskoj plastičnosti ispoljava široku ekološku valencu za veliki broj ekoloških faktora i tako uspešno nastanjuje širok spektar ekoloških uslova (Eller et al. 2017). Ova robusna helofita se može naći na različitim nadmorskim visinama i svim temperaturnim zonama, na podlogama različitog mineralnog sastava (od slatkih voda do zaslanjenih priobalnih zona, metalima opterećenih podloga, podloga bogatim ili siromašnim makroelementima) i onima sa različitim stepenom zasićenosti vodom (Mozdzer et al. 2010; Yu et al. 2012). Zbog toga, obična trska ima široko geografsko rasprostranjenje, odnosno predstavlja kosmopolitsku vrstu koja veoma često dominira u ekosistemima koje naseljava. Ima veoma veliki uticaj na njih zahvaljujući visokoj godišnjoj produkciji biomase i veoma uspešnom polnom i vegetativnom razmnožavanju, što joj omogućava brzu ekspanziju i dominaciju na staništu (Kettenring et al. 2015, 2016; Eller et al. 2017). Osim gore navedenih, naseljava i fizički i hemijski narušena staništa. Zbog svega ovoga, obična trska predstavlja izuzetno dobar model za proučavanje ekofizioloških odgovora na različite tipove stresa, kao i za proučavanje potencijalne primene ove vrste u uklanjanju polutanata iz podloge.

### 5.1. Hemijske odlike ispitivanog sedimenta i jalovine

Kontrolni sediment koji je sakupljen u Specijalnom rezervatu prirode Carska bara prirodnog je porekla, a imajući u vidu da se radi o zaštićenom području, antropogeni uticaj je minimalan. Razvija se na aluvijalnoj ravni između Tise i kanala Begej i pripada tipu slabo razvijenog aluvijalnog zemljišta sa neutralnom pH reakcijom karakterističnom za ovakav tip podloge (Antić et al. 1990). Na osnovu sadržaja organske materije (SOM), kontrolni sediment pripada grupi dosta humoznih zemljišta (Tyurin 1965), što je u korelaciji sa aluvijalnim tipom zemljišta čija se geneza zasniva na taloženju materijala nanesenog vodenim tokovima. Tako se ovaj sediment odlikuje umerenim sadržajem azota (Džamić et al. 1996), što je u najvećoj meri posledica dekompozicije organske materije, ali i procesa nanošenja i ispiranja pod uticajem vodenog toka. Ovo je u skladu sa podacima o hemijskim osobinama slabo razvijenog aluvijuma u kome je prosečan sadržaj azota 0,14% (Antić & Jović 1965). Kontrolni sediment je dobro snabdeven lako dostupnim fosforom i srednje snabdeven kalijumom prema Džamić et al. (1996), što se pripisuje generalno visokom sadržaju organske materije u ovom tipu zemljišta.

Sedimenti sa preostala tri lokaliteta su potpuno ili delimično antropogenog porekla i predstavljaju naslage rudničke (Bor 1) ili flotacione jalovine (Bor 2 i Rudnik) koje se

međusobno razlikuju po nastanku, obradi u rudarstvu, kao i fizičkim i hemijskim svojstvima. Oba tipa jalovine se odlikuju visokim sadržajem potencijalno toksičnih metala i izraženim nedostatkom organske materije, što su glavni otežavajući faktori za razvoj biljaka karakteristični za ovaj tip staništa. Sediment iz Bora 1 koji se javlja na obodu starog odlagališta borske otkrivke predstavlja mešavinu smeđe kiselog zemljišta na peščaru i andezitu i ostataka rudničke jalovine. Tip stene od koje jalovina vodi poreklo označava se kao dvostruka litologija budući da se sastoji od kombinacije andezita i sedimentnih stena. Dobijene vrednosti supstitucione kiselosti u ovom istraživanju su unutar opsega karakterističnog za ovaj tip stene ( $\text{pH}_{\text{KCl}}$  5,33–7; Randelović 2015) i ukazuju na neutralnu pH reakciju (Soil Survey Division Staff 1993). Visok sadržaj organske materije objašnjava se prisustvom zemljišta razvijenog na obodnom delu jezera ispod odlagališta rudničke jalovine, odakle su biljke prikupljene. Takođe, neophodno je istaći da je deponovanje konglomerata na Staroj otkrivci završeno 1960. godine, pa su ove stene dug vremenski period bile izložene spoljašnjim uticajima (Randelović 2015) što je moglo uticati na sadržaj makroelemenata. Sediment iz Bora 1 se prema Džamić et al. (1996) karakteriše umerenim sadržajem azota, što je povezano sa visokim sadržajem organske materije u zemljištu, dok je siromašan u pogledu sadržaja lako pristupačnog fosfora i dobro snabdeven pristupačnim kalijumom. Generalno, za zemljišta u neposrednom okruženju borske otkrivke karakterističan je sadržaj humusa 1–7%, sadržaj pristupačnog fosfora 1–16,2 mg 100g<sup>-1</sup> i sadržaj pristupačnog kalijuma 10–25 mg 100g<sup>-1</sup> (Randelović 2015).

Za razliku od prethodnog, supstrat poreklom iz Bora 2 predstavlja flotacionu jalovinu poreklom od grupe stena hornblenda andeziti (Randelović 2015), čija se aktivna i supstituciona kiselost nalaze u rangu ultra kisele reakcije (Soil Survey Division Staff 1993). Ovako niska pH vrednost je poreklom od rastvorenih sulfidnih minerala iz stene koja čini flotacionu jalovinu i upliva zakišeljene vode koja se proceđuje iz okolnih naslaga jalovine do jezera na čijem obodu raste trska (Stanković et al. 2015). Ova flotaciona jalovina se odlikuje veoma niskim sadržajem organske materije, a u skladu sa tim i izuzetno niskim sadržajem ukupnog azota i pristupačnog fosfora, što je čini veoma nepovoljnim supstratom za razvoj biljaka. Ovaj sediment je takođe umereno snabdeven lako pristupačnim kalijumom. Veoma nizak sadržaj organske materije, azota, kao i umerena snabdevenost lako pristupačnim kalijumom u hornblenda andezitima potvrđeni su analizom datog tipa stena u istraživanju Randelović (2015).

Jalovina poreklom iz Rudnika odlikuje se neutralnom pH (Soil Survey Division Staff 1993). Neutralna pH reakcija jalovine iz Rudnika posledica je načina obrade rude koji podrazumeva upotrebu baznih agenasa tokom hemijske obrade. Iako se odlikuje visokim sadržajem organske materije (Tyurin 1965), u ovom slučaju gotovo sav organski ugljenik je poreklom od ksantata koji se koriste kao kolektori metala u procesu flotiranja sulfidnih minerala u hidrometalurškom procesu, kao i produkata njihove degradacije (Lam 1999; Ozturk et al. 2022). Zbog toga se ova flotaciona jalovina odlikuje niskim sadržajem azota, kao i pristupačnog fosfora i kalijuma, što pokazuju i istraživanja Andrejić (2021).

Kada je reč o pseudototalnom sadržaju ispitivanih metala u podlozi, uočava se da je u jalovini poreklom iz Rudnika sadržaj gotovo svih ispitivanih elemenata značajno veći u odnosu na uzorke sa ostalih lokaliteta. Sadržaj pseudototalnog Fe u flotacionoj jalovini iz Bora 2 i Rudnika je značajno viši u odnosu na kontrolni sediment i sediment iz Bora 1, što je i očekivano s obzirom da je Fe jedan od glavnih konstituenata litosfere sa prosečnom koncentracijom u Zemljinoj kori od oko 5% (Kabata-Pendias 2011). S druge strane, u kontrolnom sedimentu i sedimentu iz Bora 1 koji predstavlja mešavinu prirodnog zemljišta i rudničke jalovine sadržaj ukupnog Fe je sličan prosečnoj koncentraciji pseudototalnog Fe u zemljištima od oko 3,5%. Pored Fe, sadržaj ostalih ispitivanih metala je najveći u flotacionoj jalovini sa Rudnika, sa izuzetkom bakra koga najviše ima u jalovini poreklom iz Bora 1, a čija

koncentracija daleko premašuje prosečnu koncentraciju ovog metala u različitim tipovima stena i zemljišta širom sveta koja se kreće najčešće u opsegu od 25–75 mg kg<sup>-1</sup> i 14–109 mg kg<sup>-1</sup>, respektivno (Kabata-Pendias 2011). Pojedini tipovi stena sadrže i značajno više koncentracije Cu, kao što je slučaj sa rudom iz Bora. Naime, viši pseudototalni sadržaj bakra u stenama borskog odlagališta karakterističan je za dvostruke litologije (Bor 1) u odnosu na hornblenda andezite (Bor 2) (Randelović 2015). Pored toga, značajna količina organske materije u sedimentu iz Bora 1 ima veliku ulogu u kompleksiranju bakra i smanjenju njegove mobilnosti, što zajedno sa neutralnom pH vrednošću zemljišnog rastvora igra ulogu u akumulaciji Cu i njegovim ekstremno visokim koncentracijama u ispitivanom sedimentu (Kabata-Pendias 2011).

Značajno viša koncentracija Mn izmerena je u jalovini sa Rudnika u odnosu na uzorke sa ostalih lokaliteta, ali je i dalje unutar opsega maksimalne dozvoljene koncentracije u poljoprivrednim zemljištima od 1500–3000 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011). Iako se zbog biološke uloge i prisutnih koncentracija u zemljištima Mn generalno ne smatra zagađujućom materijom, njegova značajnija akumulacija u površinskim slojevima zemljišta može dovesti do ispoljavanja toksičnih efekata na biljke (Kabata-Pendias 2011).

Prosečan sadržaj Ni u Zemljinoj kori kreće se oko 20 mg kg<sup>-1</sup>, dok u ultramafitskim stenama može biti značajno viši i u opsegu od 1400–2000 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011). Iako najviše zabeležene koncentracije u jalovini sa Rudnika 4 puta premašuju prosečan sadržaj Ni u zemljištima širom sveta (22 mg kg<sup>-1</sup>; Kabata-Pendias 2011), one ne premašuju koncentracije koje su u ranijim istraživanjima zabeležene u jalovini rudnika u Velikoj Britaniji (do 1150 mg kg<sup>-1</sup>; Grove & Ellis 1980). Takođe, u zagađenim zemljištima zabeležene su i ekstremno visoke koncentracije Ni, čak do 26 000 mg kg<sup>-1</sup> (Izosimova 2005).

Koncentracija Zn u jalovini sa Rudnika, značajno viša u odnosu na podlogu sa ostalih lokaliteta, posledica je mineralnog sastava stene sa visokom procentualnom zastupljenošću Zn (0,49–4,49%; Stojanović et al. 2018). Prosečan sadržaj Zn u zemljištima širom sveta kreće se u opsegu od 17–125 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011), što je 11 puta niže od izmerene koncentracije u jalovini sa Rudnika, odnosno gotovo dvostruko niže od koncentracije u jalovini iz Bora 1. Ovako visoke koncentracije Zn takođe su zabeležene u rudama obojenih metala u Velikoj Britaniji u kojima se kreću u opsegu od 185–4500 mg kg<sup>-1</sup> (Davies 1977).

Najviša koncentracija Pb u jalovini iz Rudnika, gotovo 290 puta viša u odnosu na kontrolni sediment, direktna je posledica hemijskog sastava rude u kojoj je Pb procentualno najzastupljeniji metal (0,94–5,66%; Stojanović et al. 2018). Daleko premašuje prosečnu koncentraciju u različitim tipovima zemljišta koja se procenjuje na 32 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011). Takođe, jalovina iz Bora 1 sadrži dvostruko višu koncentraciju Pb u odnosu na navedeni prosek, ali ipak nižu od gornje granice za nezagađena zemljišta od 70 mg kg<sup>-1</sup> koju predlaže Davies (1976).

Sadržaj Cd u jalovini sa Rudnika značajno je viši u odnosu na uzorke sa ostalih lokaliteta i gotovo 11 puta prevazilazi njegovu prosečnu koncentraciju u zemljištima koja se kreće u opsegu od 0,06–1,1 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias 2011). Imajući u vidu da se Cd javlja kao prateći element u ležištima Pb i Zn, njegove visoke koncentracije na području Rudnika su i očekivane. Iako visoke, koncentracije Cd u jalovini sa Rudnika su višestruko niže od onih zabeleženih u neposrednoj okolini rudnika Zn „Padaeng” (Phaenark et al. 2009).

Najviše izmerene koncentracije Cr i Co zabeležene u jalovini sa Rudnika ne prevazilazile prosečnu koncentraciju od 54 mg kg<sup>-1</sup> za Cr, odnosno 0,1–70 mg kg<sup>-1</sup> za Co u različitim tipovima zemljišta (Kabata-Pendias 2011). Značajno više koncentracije ovih elemenata u jalovini sa Rudnika u odnosu na druge tipove jalovine posledica su hemijskog



sastava rude na ovom prostoru, u kojoj se pored Pb, Zn, Cu, Ag, Bi i Cd koji su najzastupljeniji, Cr i Co takođe prirodno javljaju (Stojanović et al. 2018).

Kada posmatramo dostupnost metala u odnosu na njihove pseudototalne koncentracije, uočava se značajna pozitivna korelacija, što je prethodno potvrđeno istraživanjem Bonanno & Giudice (2010). Naime, u sedimentu koji sadrži najvišu pseudototalnu koncentraciju određenog elementa, po pravilu uočavamo i najvišu koncentraciju dostupnog oblika istog elementa. Međutim, ovo ne mora uvek biti pravilo budući da veliki broj faktora utiče na dostupnost metala biljkama (Antonangelo & Zhang 2019). Često najveći uticaj ima pH zemljišnog rastvora i po pravilu veća dostupnost većine ispitivanih metala je pri nižoj pH, odnosno u kiseloj sredini. Na pH u neposrednoj okolini korena, rizosferi, u velikoj meri utiču biljke i zemljišni mikroorganizmi koji svojim eksudatima mogu dovesti do smanjenja pH i time veće dostupnosti i apsorpcije metala (Johnstone & Nolan 2015). Međutim, Zn je jedan od elemenata za koji je karakteristična veća mobilnost i dostupnost pri neutralnoj odnosno alkalnoj pH zemljišnog rastvora (Azouzi et al. 2015), što potvrđuje značajno veća dostupnost ovog metala u jalovini poreklom iz Bora 1 i Rudnika u odnosu na Bor 2.

Pored toga, izuzetno veliki uticaj na dostupnost metala može imati sadržaj organske materije u podlozi, što se uočava na primeru Pb. Naime, udeo pristupačnog olova u odnosu na njegov ukupni sadržaj u jalovini iz Bora 2 je značajno niži u odnosu na ostale uzorke, iako je ovde pH izrazito kisel, što bi inače povećalo dostupnost ovog elementa. Razlog tome jeste izuzetno nizak sadržaj organske materije koja ima veliki kapacitet za vezivanje olova, čija dostupnost u uslovima niske pH značajno raste (Kabata-Pendias 2011). Istovremeno, može se smatrati da je veće učešće dostupnog Cr u njegovom ukupnom sadržaju u jalovini sa Rudnika posledica adsorpcije za rezidualni ksantat i produkte njihove degradacije (Arim et al. 2019; Moreno-López 2019).

Koncentracije biodostupnih oblika pojedinih metala su više od fitotoksičnih koncentracija prema Kabata-Pendias (2011). Tako je pristupačna koncentracija olova u jalovini iz Rudnika 25 puta viša od granične koncentracije za toksičnost ovog metala ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ), dok je koncentracija bakra u sedimentu iz Bora 1 38 puta viša od granične koncentracije za toksičnost ovog elementa ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Koncentracija Mn u jalovini iz Rudnika takođe je nešto iznad gornje granice za fitotoksičnost ovog metala ( $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Marschner 2012). Biodostupne forme ostalih ispitivanih metala su ispod granice fitotoksičnosti prema Kabata-Pendias (2011).

## 5.2. Hemijske odlike ispitivanog biljnog materijala

Najveći broj dosadašnjih naučnih istraživanja *P. australis* se odnosi na proučavanje ekološke plastičnosti i sposobnosti ove vrste da akumulira različite hemijske elemente iz podloge, a time i mogućnosti njenog korišćenja u biološkom prečišćavanju otpadnih voda umereno zagađenih metalima u okviru konstruisanih vlažnih staništa (Brix & Schierup 1989; Bragato et al. 2006; Lee & Scholz 2007; Vymazal 2013; Hernández-Crespo et al. 2015). Ipak, istraživanja obične trske koja se spontano javlja na metalima izuzetno opterećenoj podlozi koja ne predstavlja prirodnu podlogu već tehnosol, do sada su prikazana u malom broju studija gde su određivane koncentracije većeg broja metala u delovima trske koja je rasla na jalovini (Stoltz & Greger 2002; Prica et al. 2019; Kovačević et al. 2020). Gotovo sva istraživanja obične trske pokazuju da se najveći deo akumuliranih elemenata zadržava na nivou podzemnih delova biljke. Ipak, stepen akumulacije metala kod trske, kao i kod svih biljaka, zavisi od različitih faktora uključujući koncentracije metala i njihovu dostupnost u podlozi, fizičke i hemijske karakteristike vode i sedimenta, vreme uzorkovanja i proces

translokacije elemenata unutar biljke (Du Laing et al. 2009; Bonanno & Giudice 2010; Teuchies et al. 2013).

Kada je reč o koncentracijama metala u biljkama sa rudničke i flotacione jalovine u, vrednosti Zn, Pb, Cu, Cd i Co u septembru su daleko više u odnosu na kontrolne biljke, kao i u odnosu na one zabeležene u ranijim istraživanjima obične trske sa prirodnih staništa izložene komunalnim i industrijskim otpadnim vodama (Bragato 2006; Bonanno 2011). Razlog ovome su izuzetno visoke koncentracije ispitivanih metala u jalovini koje su višestruko više u odnosu na sadržaj u navedenim otpadnim vodama. U ispitivanim biljkama poreklom sa odlagališta jalovine u oba perioda uzorkovanja, sa izuzetkom Mn (jun, septembar) i Cr (septembar) kod biljaka iz Bora 1, ustanovljene su značajno više koncentracije ispitivanih metala u korenovima u odnosu na ostale delove biljke. Na to može uticati i pasivna apsorpcija određenih metala apoplastičnim putem, koja se javlja u uslovima veoma visokih koncentracija metala u zemljišnom rastvoru (Kabata-Pendias 2011). Poznato je da većina biljaka koje uspešno žive na metalima opterećenim podlogama akumuliraju i efikasno imobilizuju metale u apoplastu zahvaljujući visokom afinitetu katjona metala za vezivanje za funkcionalne grupe ćelijskog zida (-OH, -COOH i -SH funkcionalne grupe) (Schmohl et al. 2000; Meyers et al. 2009; Colzi et al. 2011), ograničavaju njihov prolazak u centralni cilindar korena hidrofobnim naslagama suberina na ćelijama endoderma (Kasparijevim zadebljanjima), kao i unutar ćelijske vakuole parenhimskih ćelija korteksa korena (Salt et al. 1995). Razlike u sadržaju metala između korena i ostalih delova ispitivanih biljaka trske sa jalovišta ukazuju na izraženu imobilizaciju metala u korenu, čime su umanjeni toksični efekti metala na metaboličke procese ćelija, posebno u listovima biljaka.

Kod višegodišnjih trava, kao što je obična trska, postoji sezonska dinamika rasta i usvajanja mineralnih elemenata koja može da utiče na razlike u koncentracijama metala u biljci u različitim periodima godine. Tako su zabeležene gotovo dvostruko niže koncentracije Zn u korenu svih biljaka sa jalovine uzorkovanih u septembru u odnosu na biljke iz juna, što je u skladu sa generalno višim koncentracijama Zn u svim biljnim delovima, korenu, nadzemnim delovima i reproduktivnim organima tokom rasta biljke u odnosu na one kod zrelih jedinki (Longnecker & Robson 1993). Ovo ukazuje na značaj Zn kao česte komponente eukariotskog proteoma, kao i na efikasnu kontrolu apsorpcije i transporta Zn u okviru biljke (Andreini et al. 2009; Habashi 2013). Nasuprot tome, koncentracije Fe, Mn, Pb i Co u korenu svih biljaka uzorkovanih u septembru 2018. godine su višestruko više u odnosu na biljke iz juna. Slično je i sa Ni i Cr kod biljaka iz Bora 1 i Bora 2 i Cu i Cd kod biljaka iz Bora 1. Razlog tome može biti činjenica da tokom jesenjih meseci, pri kraju vegetacione sezone, bioakumulacija dostiže svoj maksimum (Bonanno & Giudice 2010). Ovo može biti rezultat dobre dostupnosti ovih metala u podlozi, postepene akumulacije metala tokom vremena usled izraženog transporta apoplastom koji je pod snažnim uticajem transpiracije i ujedno značajne imobilizacije u okviru korena.

Iako je sadržaj analiziranih metala u korenu biljaka sa jalovišta uglavnom u okviru vrednosti koje su toksične za većinu biljaka, postavljene granične vrednosti koncentracija su ustanovljene prvenstveno za nadzemne delove biljaka i stoga nisu nužno primenljive za koren (Kabata-Pendias 2011). I zaista, u dosadašnjim istraživanjima je veoma retko primećen štetan uticaj povišenih koncentracija metala na vitalne fiziološke i biohemijske procese ćelije. Tako je sadržaj Fe u korenovima biljaka ekstremno visok i u kontrolnim biljkama i u biljkama sa jalovine. Ovako visoke koncentracije Fe samo u korenovima biljaka zajedno sa BCF vrednostima koje su posebno visoke u septembru i veoma niskim TF ukazuju na transport Fe putem apoplasta i taloženje unutar korena, kao i veoma nisku translokaciju u akropetalnom pravcu. Izmerene koncentracije Fe u korenovima biljaka su dva puta više od onih dobijenih u biljkama koje su rasle na sedimentu reke koja je pod intenzivnim uticajem urbanizacije i poljoprivrede (Bonanno 2011), dok su još uvek značajno niže od onih u biljkama koje su rasle

na kiseloj rudničkoj drenaži (Guo et al. 2014). Visok nivo akumulacije Fe predstavljen visokim vrednostima BCF se može objasniti hipoksičnim uslovima koji postoje u supstratu bogatom vodom u kome se očekuje da je gvožđe dominantno prisutno u  $Fe^{2+}$  obliku koji biljka lako usvaja (Ishimaru et al. 2006). Takođe, najviše vrednosti BCF koje su detektovane kod biljaka iz ultrakisele sredine na lokalitetu Bor 2 se mogu objasniti i većom dostupnošću  $Fe^{2+}$ . Ovako visoke detektovane koncentracije Fe u korenu svih biljaka mogu dovesti do nekontrolisanih oksidativnih procesa u ćeliji, budući da ono predstavlja redoks-aktivan metal čiji  $Fe^{2+}$  oblik učestvuje u Haber-Weiss i Fentonovoj reakciji i time povećava nivo oksidativnih oštećenja u ćeliji. Zbog niskog nivoa translokacije, sadržaj Fe u listovima ovih biljaka nije iznad granice fitotoksičnosti od  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ , iznad koje kod osetljivih biljaka dolazi do pojave nekrotičnih mrlja i drugih vidljivih znakova oštećenja (Kabata-Pendias 2011).

Sadržaj Mn u korenovima kontrolnih i biljaka iz Bora 1 uzorkovanih u septembru je viši od gornje granične vrednosti iznad koje Mn najčešće ispoljava fitotoksične efekte ( $>500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) kod većine biljaka (Kabata-Pendias 2011). Tako, u korenu biljaka iz Bora 1 izmerena koncentracija Mn čak 5 puta prevazilazi dati prag toksičnosti. Poznato je da su mobilnost i biodostupnost Mn visoko zavisni od reakcija koje kontrolišu ponašanje Mn u podlozi, kao što su proces oksidacije, redukcije i hidrolize. U hipoksičnim, odnosno redukujućim uslovima koji vladaju u podlozi trske mangan je dobro rastvorljiv i dominantno se nalazi u redukovanom  $Mn^{2+}$  koji je lako biodostupan. Jedina vrednost  $TF > 1$  je detektovana kod biljaka iz ultrakiselog supstrata Bora 2 (septembar) i ukazuje na značajnu translokaciju ovog metala u nadzemne delove biljke. Sličan sadržaj i distribucija Mn u biljci nađeni su za biljke *P. australis* sakupljene na jezerima u Poljskoj u blizini pašnjaka i poljoprivrednih zemljišta (Klink 2017), kao i sa zemljišta zagađenih rudarskim aktivnostima, sa nešto nižim stepenom translokacije Mn u nadzemni deo biljke (Cicero-Fernández et al. 2017). Poznato je da je Mn jedan od veoma mobilnih elemenata u okviru biljnog organizma, čiji je transport iz korena do listova efikasniji u odnosu na većinu drugih metala, što se može pripisati i njegovoj ulozi u esencijalnim biohemijskim procesima ćelije, kao što su biosinteza ATP-a, masnih kiselina i proteina (Millaleo et al. 2010).

Koncentracije Ni detektovane u korenovima svih biljaka oslikavaju stepen opterećenosti podloge ovim metalom, pa su najviše koncentracije detektovane u korenovima trske sa Rudnika koji sadrže i do 10 puta višu koncentraciju Ni u odnosu na koren biljaka sa ostalih lokaliteta. Sadržaj nikla u korenu kod svih biljaka u septembru, osim onih iz Bora 2 je unutar opsega vrednosti koje mogu izazvati toksične efekte na biljke (Krämer 2010). Najviša izmerena koncentracija, u korenovima biljaka iz Rudnika, šest puta prevazilazi donji predloženi prag fitotoksičnosti ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i daleko je viša od onih u biljkama sakupljenim na obalnim delovima reka opterećenih komunalnim otpadnim vodama (Bonanno & Giudice 2010) i biljaka sa veštačkih vlažnih staništa (Bragato 2006). Međutim, slične koncentracije Ni nađene su u podzemnim delovima biljaka *P. australis* koje su rasle na estuarskom sedimentu visoko zagađenom metalima (Cicero-Fernández et al. 2017). Jedino je  $TF > 1$  u Boru 2 i ukazuje na intenzivnu translokaciju Ni u nadzemni deo biljaka, dok je na ostalim lokalitetima ova translokacija značajno niža.

Koncentracija Zn u korenovima biljaka iz Rudnika je u okviru potencijalno fitotoksičnih vrednosti ( $500\text{--}1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Chaney 1989), što je očekivano s obzirom na to da sama flotaciona jalovina sadrži veoma visoke koncentracije ukupnog i pristupačnog Zn. Na drugim lokalitetima sadržaj Zn u korenu je višestruko viši u biljkama sa odlagališta jalovine (Bor 1 i Bor 2) u odnosu na kontrolne biljke, ali ispod potencijalno fitotoksičnih koncentracija. Koncentracije Zn u korenovima odgovaraju onim dobijenim u ranijim istraživanjima trske koja je rasla na odlagalištima jalovine rudnika metala (Zn, Cu, Pb, Ni, Au, Ag) (Stoltz & Greger 2002), ali su značajno više u odnosu na koncentracije u biljkama *P. australis* izloženim uticaju

poljoprivrednih, industrijskih i komunalnih otpadnih voda (Bragato et al. 2006; Klink 2017). I pored povišenih koncentracija u korenu ispitivanih biljaka sa tehnosola, koncentracije Zn u rizomima i nadzemnim delovima su u okviru vrednosti za koje se smatra da ne izazivaju oštećenja kod biljaka osetljivih na metale, što zajedno sa  $TF < 1$  pokazuje da nema značajnije translokacije Zn u nadzemne delove biljke. Ova imobilizacija Zn, ali i Cu, u okviru korenovog sistema se postiže vezivanjem za ćelijske zidove ćelija korteksa korena, ali i unutar samih ćelija gde su metali vezani za specifične male proteine sa helirajućom aktivnošću, čime se sprečava vezivanje metala za nespecifične proteine i narušavanje funkcionalnosti ćelije (Cobbett 2000; Hasan et al. 2017). Histoheмиjska detekcija Zn u podzemnim i nadzemnim delovima biljke pokazuje da je cink dominantno akumuliran u ćelijskim zidovima ćelija egzodermisa i ćelija korteksa korena, što predstavlja imobilizaciju Zn u ćelijskom zidu i jednu od tipičnih strategija odbrane biljaka od povećanih koncentracija metala u podlozi. Do imobilizacije dolazi usled vezivanja metala za funkcionalne grupe pektina i drugih komponenti ćelijskog zida prilikom apoplastičnog radijalnog kretanja kroz koren. Takođe, u rizomu, stablu i listu Zn je akumuliran u zidovima sklerenhimskih ćelija.

Zahvaljujući veoma visokoj koncentraciji i ukupnog i pristupačnog Pb u flotacionoj jalovini sa Rudnika, biljke su akumulirale značajnu količinu ovog elementa u korenu. Sadržaj olova u korenu biljaka iz Rudnika je prema Ross (1994) iznad opsega fitotoksičnosti za većinu biljaka ( $30\text{--}300\text{ mg kg}^{-1}$ ) i značajno je viši u odnosu na onaj izmeren u korenovima biljaka sa ostalih lokaliteta, a posebno kontrolnih biljaka. Zahvaljujući izuzetno niskom nivou transporta Pb u nadzemne delove, najveći udeo Pb se zadržava na nivou korena. Ovakvi rezultati su ranije prijavljeni za *P. australis* (Rocha et al. 2014; Prica et al. 2019), *Helianthus annuus* (Wińska-Krysiak et al. 2015), *Miscanthus x giganteus* (Korzeniowska & Stanisławska-Głubiak 2015; Pidlisnyuk et al. 2018; Andrejić et al. 2019), *Allium sativum* (Jiang & Liu 2010), *Nicotiana tabacum* (Gichner et al. 2008), kao i kod nekoliko vrsta metalofita i pseudometalofita (Dahmani et al. 2000). Poznato je da se efikasna prevencija transfera Pb u stelu korena postiže depozicijom Pb na ćelijskim zidovima kortikalnih ćelija, kao i Kasparijevim zadebljanjima endoderma (Seregin et al. 2004; Meyers et al. 2009; Jiang & Liu 2010). I pored toga što je koncentracija Pb daleko niža u listovima, ona je ipak najmanje dva puta viša od prosečne koncentracije zabeležene u biljkama iz nezagađenih sredina ( $5\text{ mg kg}^{-1}$ ) (Markert 1992). Histoheмиjska detekcija Pb u podzemnim i nadzemnim delovima biljke pokazuje da je i olovo dominantno akumulirano i imobilizovano u ćelijskim zidovima egzodermisa i korteksa korena, kao i zidovima sklerenhimskih ćelija rizoma, stabla i lista Pb.

Koncentracija bakra u korenovima biljaka svih ispitivanih lokaliteta, osim kontrole, višestruko prevazilazi fitotoksične vrednosti ( $25\text{--}40\text{ mg kg}^{-1}$ ) (Chaney 1989). Najviša zabeležena koncentracija, u korenu biljaka iz Bora 1, posledica je ekstremno visokog sadržaja Cu u datom tipu jalovine. Izmerena koncentracija Cu značajno je viša u odnosu na onu u korenu trske koja je rasla na metalima bogatom prirodnom sedimentu (Cicero-Fernández et al. 2017), kao i na sedimentu obalnog dela reke pod velikim uticajem urbanizacije i poljoprivrede (Bonanno 2011). Međutim, koncentracija bakra u nadzemnim delovima svih ispitivanih biljaka je značajno niža usled niske translokacije ovog elementa ( $TF < 1$ ), a kao rezultat taloženja Cu unutar egzodermalnih ćelija korteksa korena, kao i endodermu. I pored toga, koncentracija Cu u stablu i listovima biljaka sa lokaliteta Bor 2 je viša od gore navedenih koncentracija koje kod većine biljaka izazivaju negativne efekte. Ipak, za razliku od Pb i Zn, povišena akumulacija Cu se vizualizuje i u centralnom cilindru korena, pa je Cu uočljiv i unutar ćelija floema. Imobilizacija metala unutar ćelija postiže se vezivanjem za fitohelatna jedinjenja najčešće u vakuoli, čime nastaju inaktivni kompleksi sa metalom (Küpper et al. 2009; Tong et al. 2004). I pored toga, sadržaj Cu u nadzemnim delovima svih ispitivanih uzoraka trske je u okviru koncentracija karakterističnih za biljke sa Cu-neopterećenih podloga

(<20 mg kg<sup>-1</sup>), a time svakako niži od koncentracija pri kojima Cu kod većine biljaka ispoljava negativan uticaj.

Koncentracije Cd u korenu biljaka sa Rudnika u junu su značajno više u odnosu na korenove biljaka sa preostalih lokaliteta i nešto su više od donje granice za fitotoksičnost ovog metala (5–700 mg kg<sup>-1</sup>) prema Chaney (1989). Međutim, ova vrednost je značajno viša u odnosu na koncentracije datog elementa u korenu trske koja je rasla na metalima bogatoj podlozi (Cicero-Fernández et al. 2017) i sedimentu reke pod intenzivnim uticajem urbanizacije (Bonanno 2011). Iako Cd predstavlja neesencijalni element za metaboličke procese biljaka, on se veoma lako usvaja i akumulira u korenu i u listu većine biljaka, budući da interferira sa nekoliko makroelemenata (Ca, Mg, P, K) (Das et al. 1977) i istovremeno pokazuje visok afinitet ka vezivanju za sulfhidrilne (-SH) grupe proteina (Kabata-Pendias 2011). Tako, iako nisu unutar opsega fitotoksičnosti, koncentracije Cd u svim ispitivanim delovima biljaka sa svih lokaliteta, osim listova kontrolnih biljaka (<LDL) i stabala biljaka iz Bora 1, iznad su koncentracija detektovanih u biljkama iz nezagađenih sredina (0,01–0,3 mg kg<sup>-1</sup>; Allen 1989). Generalno niske koncentracije Cd u biljnim delovima su najčešće posledica njegove slabe dostupnosti u različitim tipovima sedimenta, posebno na pH vrednostima oko neutralne i u sredini u kojoj ima sulfida sa kojima Cd precipitira (Christensen & Huang 1999). U kiseloj sredini Cd se efikasnije usvaja korenom biljaka (Bingham et al. 1980; Kitagishi & Yamane 1981), čime se može objasniti daleko viši BCF kod biljaka koje su rasle u ultrakiselj sredini jezera Bor 2.

Najviša izmerena koncentracija Co je u korenovima biljaka iz Bora 1 i viša je od datog opsega fitotoksičnosti za ovaj element (15–50 mg kg<sup>-1</sup>) prema Kabata-Pendias (2001). I koncentracije Co u korenovima biljaka sa ostalih lokaliteta u septembru su unutar navedenog opsega, osim biljaka sa kontrolnog staništa. Detektovane koncentracije u korenovima biljaka su značajno više od onih zabeleženih kod trske rasle na sedimentu reke pod intenzivnim uticajem urbanizacije (Bonanno 2011), kao i kod biljaka *M. × giganteus* raslih na flotacionoj jalovini rudnika metala (Pb, Zn, Cu) (Andrejić 2021). Može se primetiti da i pored najviše koncentracije ukupnog i dostupnog Co u jalovini sa Rudnika, biljke ne sadrže višu koncentraciju ovog metala u odnosu na druge ispitivane biljke sa jalovišta, što se može objasniti time da apsorpcija Co korenom uključuje aktivan transport (Wiersma 1979). Ipak, i pored slabe mobilnosti u okviru biljnog organizma, kada se jednom nađe u ksilemu, transport Co u akropetalnom pravcu je transiracionim tokom, što je u skladu sa dobijenim rezultatima u nadzemnim delovima biljaka trske. Naime, koncentracije kobalta u listovima biljaka iz Bora 2 i Rudnika su takođe u opsegu fitotoksičnosti datog metala.

Koncentracija Cr najvišu vrednost ima u korenovima biljaka iz Rudnika, što višestruko prevazilazi prag za fitotoksičnost ovog metala (0,5 mg kg<sup>-1</sup>; Allen 1989). Na ostalim lokalitetima koncentracije hroma u svim biljnim delovima u septembru su takođe iznad date vrednosti. Ono što izdvaja hrom od većine drugih elemenata jeste sadržaj ovog metala u nadzemnim delovima biljaka, koji je veoma blizak vrednostima u korenu na većini ispitivanih lokaliteta. To potvrđuju i visoke vrednosti TF koje ukazuju na veoma značajan nivo translokacije u nadzemni deo biljaka. Slična distribucija Cr kao u ovom istraživanju dobijena je u istraživanju trske koja je rasla na metalima zagađenom sedimentu Cicero-Fernández et al. (2017). Ranija istraživanja ukazuju na veliku sposobnost trske da Cr akumulira na nivou podzemne biomase i nizak nivo translokacije u nadzemni deo biljaka (Marchand et al. 2014). U tom smislu, potrebna su dalja istraživanja koja uključuju ispitivanje usvajanja Cr unutar biljaka u različitim uslovima podloge, kao i proučavanja mehanizama distribucije i tolerancije na ovaj metal.

### 5.3. Fitoremedijacioni potencijal *Phragmites australis*

Fitoremedijacioni potencijal biljke ili njena sposobnost da apsorbuje zagađujuće materije iz podloge i akumulira ih bilo u nadzemnim ili podzemnim delovima, kao i fitoremedijaciona strategija koja bi mogla biti primenjena u remedijaciji metalima zagađenih podloga se može proceniti na osnovu konkretnih koncentracija usvojenih metala i korišćenjem biokoncentracionog, bioakumulacionog i translokacionog faktora.

Visoke koncentracije metala koje su prisutne u korenu biljaka, kao i veoma visoke vrednosti biokoncentracionog faktora ukazuju da *P. australis* poseduje visok fitoremedijacioni potencijal. Obična trska akumulira i zadržava ispitivane metale dominantno na nivou korenovog sistema i redukuje njihovu translokaciju u nadzemne delove biljke, što se uočava na osnovu velike razlike u koncentracijama metala između korena, stabla i lista, ali i na osnovu faktora koji ukazuju na izbegavanje kao dominantnu odbrambenu strategiju biljke. Za sve ispitivane metale je ustanovljen visok biokoncentracioni faktor koji je za većinu elemenata daleko viši od 1, sa izuzetkom olova u biljkama sa Rudnika. Generalno najviše vrednosti BCF su dobijene za Fe i Cr, što se može objasniti činjenicom da je mehanizam usvajanja Cr sličan onome kod Fe (Tiffin 1977). Poređenjem vrednosti BCF između biljaka uzorkovanih u dva perioda, junu i septembru iste godine, uočava se da su BCF viši kod biljaka u septembru, što ukazuje na koncentrovanje metala u korenu biljaka tokom vremena. Jedinu jasnu razliku pokazuje Zn koji je biljka usvajala intenzivije tokom perioda rasta (jun), pa su sve vrednosti BCF višestruko veće u odnosu na septembarsko uzorkovanje.

Vrednosti BCF ukazuju na odbrambenu strategiju biljke, ali ne govore mnogo o količini metala koju biljka uklanja iz zagađene, a posebno iz ekstremno zagađene podloge, kao što je jalovina. Tako su najniže vrednosti BCF (Fe, Mn, Ni, Zn, Pb, Cd, Cr) zabeležene kod biljaka sa Rudnika koje većinu navedenih elemenata (Ni, Zn, Pb, Cu, Cd i Cr) akumuliraju u najvišim koncentracijama. Ova razlika između BCF i konkretnih akumuliranih koncentracija metala ukazuje na značaj hemijskih karakteristika podloge koje mogu umanjiti ili povećati dostupnost metala za apsorpciju korenom, kao i na postojanje određenog kapaciteta biljke za apsorpciju koji zavisi od mehanizama usvajanja specifičnog metala. Tako, niska pH supstrata povećava mobilnost, usvajanje i akropetalni transport Ni, Mn i Pb. Pored toga, u slabo dreniranoj i slabo aerisanoj podlozi tranzicioni metali koji se mogu naći u više oksidacionih stanja se javljaju pretežno u redukovanom obliku ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) koji su mobilniji i biodostupniji u odnosu na njihove oksidovane forme ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Pb}^{4+}$ ) (Kabata-Pendias 2011). Takođe i kisela sredina, kakva je u Boru 2, pospešuje hemijsku dezintegraciju minerala stene, dok  $\text{H}^+$  joni izbacuju monovalentne i dvovalentne katjone metala sa negativno naelektrisanih mesta na česticama supstrata čineći ih lakše dostupnim za usvajanje biljkama (Wei et al. 2020). Pored toga, određene razlike u stepenu apsorpcije i translokacije metala u akropetalnom pravcu mogu biti uslovljene i genetičkom varijabilnošću trske (Kühl et al. 1999; Eller & Brix 2012; Gao et al. 2012; Tripathee & Schäfer 2015).

Bioakumulacioni faktori su u najvećem broju slučajeva viši kod biljaka uzorkovanih u septembru, dok je BAF za Zn bio viši kod biljaka uzorkovanih u junu. Izuzetno više vrednosti BAF za Mn, Ni, Zn, Pb i Cu kod biljaka iz Bora 2 ukazuju da uslovi sredine mogu uticati i na proces translokacije metala u nadzemne delove.

Dobijeni rezultati pokazuju visok potencijal za fitostabilizaciju gotovo svih ispitivanih metala, budući da su vrednosti  $\text{BCF} > 1$ , a i  $\text{TF} < 1$  (Yoon et al. 2006). Prethodnim istraživanjima je potvrđen fitostabilizacioni potencijal *Phragmites australis* (Pérez-Sirvent et al. 2017; Prica et al. 2019), kao i mogućnost korišćenja svih delova trske u biomonitoringu kvaliteta sedimenta i vode (Bonanno & Giudice 2010). Iako u nadzemnim delovima biljke koncentracije metala nisu visoke, trska zbog velikog godišnjeg prinosa nadzemne biomase

može biti pogodna i za fitoekstrakciju ukoliko se žetva vrši u vreme najveće bioakumulacije metala od interesa (Klink 2017).

#### 5.4. Biohemijski odgovor *P. australis* na povišene koncentracije metala

Biljke koje naseljavaju podloge koje su opterećene povišenim koncentracijama metala retko kada su izložene samo jednom potencijalno toksičnom elementu. Naime, metaliferne stene su bogate većim brojem metala, a njihove koncentracije u biljci i specifični međusobni odnosi, kao i zaštitni mehanizmi biljke određuju njihov uticaj na fiziologiju, rastenje i preživljavanje biljke (Israr et al. 2011; Lou et al. 2017). Analiza biohemijskih parametara korena i lista biljaka *P. australis* koje su spontano rasle u plitkoj vodi jalovišta daje nam detaljan uvid u zaštitne mehanizme koji ovim biljkama omogućavaju uspešan opstanak i rast u uslovima značajno povišenih koncentracija PTE u podlozi i u biljnom organizmu.

##### 5.4.1. Uticaj povišenih koncentracija metala na biohemijske parametre u korenu *P. australis*

Jedan od analiziranih parametara je sadržaj rastvorljivih proteina čije promene u sadržaju predstavljaju indikator metaboličkih promena nastalih pod uticajem različitih tipova stresa (Singh & Tewari 2003). Tako povećan sadržaj ukupnih solubilnih proteina u korenu biljaka sa odlagališta jalovine u odnosu na kontrolu predstavlja uobičajeni odgovor složenog adaptivnog mehanizma ćelije sa ciljem smanjenja metalima indukovanoog stresa. Ovaj stimulatorni efekat povišenih koncentracija metala se ogleda u povećanoj biosintezi specifičnih grupa proteina kao što su proteini toplotnog šoka (engl. *heat shock proteins*) i proteolitički i antioksidativni enzimi koji su uključeni u homeostazu proteina i redoks stanja ćelije (Srivastava et al. 2005; Shu et al. 2012; Hasan et al. 2017; Georgiadou et al. 2018). Brojna ranija istraživanja su pokazala da značajno povišene koncentracije metala u korenu, kakve su detektovane u korenovima ispitivanih biljaka trske, najčešće izazivaju smanjenje sadržaja ukupnih solubilnih proteina. Do toga dolazi zbog narušavanja njihove biosinteze usled inhibicije aktivnosti metaloenzima uključenih u taj proces, i to zbog zamene njihovih metalnih kofaktora nekim od metala koji se u ćeliji nalazi u slobodnom obliku i narušavanja procesa pravilnog uvijanja proteina vezivanjem metala za funkcionalne grupe peptidnih lanaca. Rezultat ovoga je nastanak proteina nepravilne konformacije, agregacija proteina, oksidacija proteina u prisustvu povećane koncentracije ROS i degradacija oksidacijom oštećenih proteina (Nagoor 1999; Chrestensen et al. 2000; El-Amier et al. 2019). Međutim, rezultati dobijeni za trsku ukazuju na to da su mehanizmi uključeni u imobilizaciju metala u apoplastu i simplastu ćelija korteksa korena dovoljno efikasni da smanje nivo slobodnih jona metala u ćeliji i omoguće povećanu sintezu proteina koja je neophodna za održavanje funkcionalnosti ćelija korena, a koja se kod biljaka javlja kao tipičan odgovor ćelije na malo povišene koncentracije metala (Ghori et al. 2019).

Kako je ranije istaknuto, glavnu ulogu u pogledu zaštite ćelije od ROS imaju antioksidativni enzimi (Bhaduri & Fulekar 2012). Razlike u aktivnostima antioksidativnih enzima zavise od specifičnog odgovora konkretne biljne vrste (Mazhoudi et al. 1997; Gupta et al. 2010), vrste i koncentracija metala u biljci, njihovog sinergističkog/antagonističkog dejstva u ćeliji (Srivastava et al. 2006; Deef 2007; Esmailzadeh et al. 2017), kao i vremena ekspozicije (Chaoui & El Feriani 2005; Lou et al. 2017). Porast aktivnosti enzima može biti rezultat njegove stimulisane ekspresije u prisustvu povišene koncentracije nekog metala. Tako se na primer porast aktivnosti enzima beleži najčešće kada je biljka izložena samo jednom metalu u kratkotrajnim eksperimentima (Iannelli et al. 2002; Malar et al. 2014; Liu et al. 2018). Takođe, veliki broj istraživanja potvrđuje da aktivnost antioksidativnih enzima raste pri nižim koncentracijama metala, dok sa daljim porastom koncentracije ili dužine izloženosti

biljke dolazi do pada aktivnosti enzima (Farid et al. 2017; Kovačević et al. 2020). Međutim, nekada je negativni efekat metala toliki da je sama struktura enzima pogođena zbog čega dolazi do pada njegove aktivnosti ili aktivnosti enzima uključenih u njegovu biosintezu. Aktivnosti svih ispitivanih enzima (SOD, CAT, APX, POD, GR) u korenu u oba uzorkovanja su generalno značajno niže u odnosu na kontrolu, što ukazuje na određeni stepen inhibicije povezane sa povišenim koncentracijama metala i njihovim direktnim i indirektnim dejstvima u ćeliji.

SOD je ključni enzim u prevođenju superoksidnog anjona u vodonik peroksid, koji kasnije uklanjaju CAT i peroksidaze, i predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnih oštećenja. Redoks aktivni metali (Cu, Cr) koji su prisutni u visokim koncentracijama u korenovima svih biljaka sa jalovišta su veoma dobri donori elektrona, a predajom elektrona kiseoniku dovode do direktnog stvaranja superoksidnog radikala. Drugi, redoks-neaktivni metali prisutni u visokim koncentracijama (Pb, Zn) mogu izazvati supstituciju nekog od metalnih kofaktora SOD i inhibiciju aktivnosti enzima. Analiza koeficijenata korelacije i stehiometrijskih odnosa metala u korenu trske ukazuje na to da je pad u ukupnoj aktivnosti SOD posledica interferencije metala u višku (Zn, Cu, Cr) i metalnih kofaktora za SOD (Yamakura et al. 1995; Gallego et al. 1996; Shainberg et al. 2000; Jouili & El Feriani 2003; Sinha & Saxena 2006). Značajna pozitivna korelacija između aktivnosti SOD i koncentracije Mn u korenu (Prilog 12), kao i nizak odnos Mn:Zn u korenu biljaka iz Bora 2 i Rudnika koje su ispoljile najnižu aktivnost SOD u korenu, ukazuje na supstituciju mangana cinkom na aktivnom mestu enzima Mn SOD (Yamakura et al. 1995; Gallego et al. 1996; Dietz et al. 1999; Shainberg et al. 2000; Jouili & El Feriani 2003; Sinha & Saxena 2006; Zhao et al. 2012). Ova hipoteza je podržana visoko očuvanom aktivnošću SOD u korenu biljaka iz Bora 1 izloženih visokim koncentracijama Mn i značajno višim odnosom Mn:Zn, koji je sličan (jun), ili čak i nešto viši (septembar) od onoga kod kontrolnih biljaka. Stimulirajući efekat Mn na antioksidativni sistem, pre svega na aktivnost SOD i POD, i ranije je potvrđen kod nekoliko vrsta biljaka (González et al. 1998; Shi et al. 2006; Zhao et al. 2012). Povrh toga, nije isključeno da i antagonizam Zn-Pb doprinosi supresiji aktivnosti Cu/Zn SOD kod ovih istih biljaka na šta ukazuje nizak odnos Zn i Pb u korenu. Ranija istraživanja su pokazala da stres izazvan olovom dovodi do pada aktivnosti SOD u korenu biljaka *Sedum alfredii* (Zhang et al. 2007) i smanjuje ekspresiju različitih gena za SOD, što je potvrđeno kod *Lolium perenne* i *Festuca arundinacea* (Lou et al. 2017). Iako biljke sa redukovanom (Bor 2, Rudnik) i one sa očuvanom aktivnošću SOD (Bor 1) u septembru imaju veoma slične aktivnosti CAT, APX i GR, kao i sličan ukupan antioksidativni kapacitet korena, one se ipak značajno razlikuju po sposobnosti za uklanjanje slobodnih radikala. Biljke sa očuvanom aktivnošću SOD (Bor 1) imaju nizak stepen lipidne peroksidacije membrana, sličan onome kod kontrolnih biljaka, dok biljke sa redukovanom aktivnosti SOD imaju značajno viši stepen oksidativnih oštećenja lipida membrana. Ovo ukazuje na izuzetnu ulogu SOD u održavanju redoks homeostaze u metalima opterećenoj ćeliji, kao i na povećano stvaranje superoksidnog radikala u prisustvu navedenih metala. Visok stepen peroksidacije membranskih lipida je ranije zabeležen kod biljaka *Phragmites australis* izloženih povišenim koncentracijama Pb, Zn i Cu (Alfadul & Al-Fredan 2013), kao i kod *Spirodela polyrhiza* pri povišenim koncentracijama Cu i Hg (Singh et al. 2020) i *Ceratophyllum demersum* (Devi & Prasad 1998).

Aktivnosti CAT i APX su značajno inhibirane kod svih biljaka sa jalovišta, što je posebno naglašeno kod biljaka uzorkovanih u septembru, i negativno su korelisane sa koncentracijama Pb, Zn, Cu i Cr u korenu. Poredeći njihove aktivnosti pri različitim koncentracijama metala može se zaključiti da je inhibicija njihove aktivnosti posledica ne samo visokih koncentracija svakog od navedenih metala, već i njihovog sinergističkog dejstva u korenu. Ova inhibicija aktivnosti CAT može biti rezultat inaktivacije od strane ROS, smanjene sinteze enzima ili promene u organizaciji subjedinica ovog enzima (Verma & Dubey 2003). Tako je kod



*Eichornia crassipes* (Odjegba & Fasidi 2007) i *Zea mays* (Cui & Zhao 2011) ustanovljeno da pri značajnijem porastu koncentracije Zn dolazi do pada aktivnosti CAT, odnosno supresije aktivnosti enzima, kao i da povišene koncentracije Pb snižavaju aktivnost CAT kod *Jatropha curcas* (Shu et al. 2012). Takođe, ustanovljeno je da Cr snižava katalitičke aktivnosti ova dva enzima (Pandey et al. 2005; Hübner et al. 2010). Niža aktivnost APX i CAT se može objasniti ulogom Cr kao signalnog molekula koji može izazvati stvaranje ROS i time negativno uticati na aktivnost ova dva enzima (Mallick et al. 2010). Pored toga, CAT je metaloenzim koji sadrži Fe u porfirinskom prstenu, pa njegova aktivnost može biti umanjena supstitucijom gvožđa nekim od metala u višku, kao i smanjenom dostupnošću Fe usled kompeticije sa datim metalom (Sharma et al. 2003).

Aktivnost gvajakol peroksidaze je značajno niža kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu, pri čemu je sa porastom koncentracija metala, posebno Zn, Pb i Cd, taj pad sve izraženiji. Pad aktivnosti POD i ranije je zabeležen kod *Helianthus annuus* pri povišenim koncentracijama Cd i Cr (Gallego et al. 2002). Može se primetiti da što je niža aktivnost POD to je viši nivo peroksidacije membranskih lipida. Biljke sa najnižom POD aktivnošću ujedno ispoljavaju i najniže aktivnosti CAT i APX, što za rezultat ima povišeno generisanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji se u prisustvu trazicionih metala redukuje do hidroksilnih radikala koji direktno izazivaju oksidaciju membranskih lipida i povećanje LP.

Aktivnost GR je od svih ispitivanih enzima najmanje pogođena povišenim koncentracijama metala u korenu. Na sličan način je inhibirana kod svih biljaka sa jalovišta u septembarskom uzorkovanju i pod najvećim je uticajem povišenih koncentracija Cd, Cr, Cu i Zn. Snižavanje katalitičke sposobnosti GR u prisustvu povećane koncentracije Cr je dokazano kod vrsta *Lemna minor* (Lopez-Luna et al. 2009; Chen et al. 2015) i *Arabidopsis* sp. (Xu & Deng 2012). Može se pretpostaviti da je pad aktivnosti GR posledica ireverzibilne inaktivacije aktivnog mesta GSSG metalnim konjugatima glutationa koji se sastoje od dva molekula oksidovanog glutationa povezanih metalom (GS-[metal]-SG). Kada se ovaj metal-glutation konjugat veže za aktivno mesto na GR, metal je taj koji se vezuje za njegovo aktivno mesto umesto atoma sumpora iz oksidovanog glutationa (GSSG), što vodi ka ireverzibilnoj inhibiciji aktivnosti GR (Rubino 2015). Osim toga, povišene koncentracije metala mogu dovesti do iskorišćavanja glutationa u biosintezi fitohelatina čime se smanjuje ukupni sadržaj glutationa koji je dostupan u antioksidativnoj zaštiti ćelije i ukupna aktivnost GR čija je uloga u regeneraciji redukovang glutationa (GSH) iz oksidovane forme (GSSG) (Habibi 2014).

Značajan pad ukupnog antioksidativnog kapaciteta kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu, koji se uočava u septembru, ukazuje na znatnu potrošnju neenzimskih antioksidanata direktno uključenih u redukciju slobodnih radikala kao što su superoksid, tokoferoksil i alkoksil/peroksil radikali (Smirnov 2018). Međutim, uprkos redukovanom TAC, biljke iz Bora 1 imaju sličan LP kao kontrolne biljke što ukazuje na to da su neenzimski antioksidanti dovoljni u zaštiti od antioksidativnog stresa. Nasuprot tome, kod biljaka sa inhibiranom aktivnosti SOD neenzimske antioksidativne komponente nisu dovoljne u zaštiti od visoko reaktivnih superoksidnih radikala, koji dovode do oksidativnih oštećenja membrane. Međutim, značajno viši TAC u junu kod biljaka sa jalovišta u odnosu na kontrolu ukazuje na aktivaciju neenzimske komponente antioksidativnog sistema pri povišenim koncentracijama metala, kao i na to da je pri generalno nižim koncentracijama metala u odnosu na septembar ovaj vid zaštite dovoljan da neutrališe negativne efekte ROS, budući da su razlike u LP između kontrolnih i biljaka sa jalovišta značajno niže u odnosu na septembar. Takođe, iako biljke iz Bora 2 u korenu sadrže nešto niže koncentracije metala u odnosu na biljke iz Bora 1, aktivnost njihovih enzima i visok nivo peroksidacije membranskih lipida se može povezati sa dodatnim stresom – ultrakiselom reakcijom sredine u kojoj se koren nalazi. Naime, visoka koncentracija H<sup>+</sup> jona u korenu dovodi do povećanog stvaranja ROS, kao što su superoksidni radikal i vodonik peroksid i izaziva dodatni oksidativni stres (Shi et al. 2006;

Zhang et al. 2016). Zbog toga, biljke iz Bora 2 treba istovremeno da savladaju dva izazova – umanje negativne efekte povišenih koncentracija metala i da održe povoljnu pH vrednost u tkivima i ćelijama korena.

#### 5.4.2. Uticaj povišenih koncentracija metala na biohemijske parametre u listu *P. australis*

Različit biohemijski odgovor korenova i listova biljaka trske na povišene koncentracije metala proizilazi iz velikih razlika u koncentracijama, kao i različitim kombinacijama metala akumuliranih u ovim biljnim delovima.

Analiza sadržaja fotosintetskih pigmenata se često koristi za procenu stresa kod biljaka budući da pored svetlosti, temperature, mineralne ishrane, faze razvoja i starosti lista, koncentracija fotosintetskih pigmenata u velikoj meri zavisi i od efekata povišene koncentracije jednog ili više metala u listu (Li et al. 2018). Štaviše, promene u njihovim koncentracijama često su povezane sa smanjenom fotosintetskom efikasnošću i vidljivim simptomima fitotoksičnosti (Croft et al. 2017). Tako sadržaj hlorofila *a* u listovima svih biljaka, osim onih sa Rudnika, pokazuje blagi trend smanjenja s vremenom, dok koncentracije hlorofila *b* i ukupnih karotenoida ispoljavaju značajan pad u septembru. Ovo smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka je u skladu sa ranijim istraživanjima Šesták (1963), Bertamini & Nedunchezian (2002) i Mauromicale et al. (2006). Zabeleženi pad koncentracija pigmenata u septembru, kada je i najveća bioakumulacija govoto svih ispitivanih metala, može se donekle povezati i sa negativnim efektima koje metali u povišenim koncentracijama imaju na biosintezu i razgradnju pigmenata. To je i ranije potvrđeno kod biljaka *Arabidopsis thaliana* (Cu, Mn, Pb, Zn) (Baek et al. 2012), *Brassica juncea* (Cd) (Mobin & Khan 2007), kukuruza (Cd) (Ekmekci et al. 2008), pšenice (Cd, Zn) (Paunov et al. 2018), *Vicia faba* (Pb, Cu, Cd) (Saadaoui et al. 2022), *Eruca sativa* (Cd) (Waheed et al. 2022), *Jatropha curcas* (Pb) (Shu et al. 2012), *Spirodela polyrhiza* (Cu) (Singh et al. 2020) i različitih genotipova topole (Cd, Cu, Cr, Zn) (Chandra & Kang 2016). Potencijalni mehanizmi dejstva akumuliranih metala su supstitucija  $Mg^{2+}$  u molekulu hlorofila nekim od metala sličnog radijusa i naelektrisanja, zatim inhibicija sinteze i/ili pojačana degradacija pigmenata (Ghasemi et al. 2009), kao i oksidativna oštećenja tilakoidnih membrana hloroplasta usled povišenog nivoa lipidne peroksidacije (Sytar et al. 2013).

Međutim, kod biljaka sa Rudnika se uočava nešto drugačiji trend promena, pa su koncentracije Chl *a* i Chl *b* značajno povećane u odnosu na jun, dok je sadržaj ukupnih karotenoida slabije redukovano u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta, ukazujući na akumulirane metale kao razlog ovih promena. Naime, povećane koncentracije metala mogu smanjiti, ali i povećati sadržaj fotosintetskih pigmenata, što zavisi od vrste biljke, tipa i koncentracije metala, njihovog uticaja na biosintezu i degradaciju pigmenata, kao i uloge pomoćnih pigmenata u zaštiti od metalima indukovanoog stresa u ćeliji (Sinha et al. 2003; Kachout et al. 2012).

Ipak, najistaknutiji je pad koncentracija ukupnih karotenoida kod svih biljaka u septembru. Karotenoidi predstavljaju neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite, budući da se i sami oksiduju, čime se objašnjava njihova povećana potrošnja u uslovima povišene koncentracije PTE. Ipak, oni su znatno manje efikasni u odnosu na enzimsku komponentu (Di Mascio 1989; Sies & Stahl 1995; Stahl & Sies 2003). Takođe, karotenoidi preuzimaju višak energije tokom ekscitiranog stanja hlorofila i na taj način sprečavaju nastanak ROS i dalja oksidativna oštećenja ćelijskih struktura (Taiz & Zeiger 2002).

Listovi svih biljaka sa jalovišta imaju visok ukupni antioksidativni kapacitet u oba uzorkovanja, sličan onome kod kontrolnih biljaka. Ovo ukazuje na relativno nizak nivo stvaranja ROS usled malo povišenih koncentracija pojedinih metala u listovima, kao i na dobru

zaštitu od oksidativnih oštećenja baziranu na neenzimskoj komponenti koju u ćeliji čine različite grupe jednjenja.

Slobodni fenoli predstavljaju široku grupu jedinjenja koja ima višestruku ulogu u biljnom organizmu. Naime, učestvuju u uklanjanju ROS u procesu oksidacije i polimerizacije fenolnih jedinjenja pod dejstvom klase III peroksidaza koje kao supstrat koriste  $H_2O_2$  (Welinder & Gajhede 1993; Barcelo & Poschenrieder 2002; Takahama 2004). Izražen skok u koncentraciji slobodnih fenola kod biljaka iz Bora 1 i Bora 2, čiji listovi u septembru sadrže povišene koncentracije nekoliko metala bez poznate biološke uloge (Cd, Pb, Cr), ukazuje na njihovu važnu ulogu u uklanjanju nastalih ROS, a posebno vodonik peroksida. Takođe, ukazuje i na potencijalnu direktnu helaciju metala u višku fenolnim jedinjenjima, kao što je ranije pokazano za Pb, Cr i Hg kod *Nymphaea* sp. (Lavid et al. 2001) i kod *Zea mays* pri izloženosti biljaka povišenim koncentracijama Pb, Cu i Cd (Kisa et al. 2016).

Za razliku od korenova biljaka sa jalovišta koji sadrže značajno više koncentracije proteina u odnosu na kontrolu, sadržaj proteina u njihovim listovima je veoma sličan onome kod kontrolnih biljaka. Ovo se može povezati sa generalno niskim koncentracijama metala koje u listovima u junu i septembru (sa izuzetkom Pb i Cr) nisu iznad fitotoksičnih nivoa. Ipak, nešto viši sadržaj proteina koji je zabeležen u septembru kod svih biljaka sa jalovišta u odnosu onaj u junu bi se mogao objasniti indukcijom sinteze proteina sa ulogom u održavanju proteinske i redoks homeostaze u ćeliji (Gupta et al. 2010; Jiang & Liu 2010).

Najviša aktivnost SOD u junu kod biljaka iz Bora 2, kao i smanjena aktivnost u septembru kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika ukazuje na povišene koncentracije i stehiometrijske odnose pojedinih metala kao faktore koji bi mogli da imaju uticaj na aktivnost ovog metaloenzima. Tako su uzorci trske iz Bora 2 u junu sadržali najviše koncentracije Pb i Cd u listovima i imali višestruko niži odnos Mn:Cu i Mn:Zn u odnosu na biljke sa ostalih lokaliteta i ujedno najviši odnos Cu:Zn. Ranija istraživanja su dokazala povišenu aktivnost SOD, i to samo Cu,Zn-SOD, kod leguminoza i klijanaca soje u prisustvu umereno povišenih koncentracija Pb i Cd, kao rezultat uticaja ovih metala na regulaciju Cu,Zn-SOD na transkripcionom i posttranslacionom nivou (Rucińska et al. 2004; Sobkowiak et al. 2004; Pawlak et al. 2009; Pan et al. 2019). S druge strane, značajno niže aktivnosti SOD koje su detektovane kod biljaka iz Bora 2 i Rudnika u septembru se mogu povezati sa specifičnim odnosima između akumuliranih metala. Tako je ustanovljeno je da je u listu trske pri postojećim koncentracijama metala aktivnost SOD negativno korelisana sa koncentracijom Fe, Pb i Zn, što je ranije pokazano kod *Sorghum bicolor* (Jawad Hassan et al. 2020). Ako se uporede stehiometrijski odnosi metala, uočava se da biljke sa ova dva lokaliteta imaju najniže koncentracije Mn u listovima i uočljivo viši odnos Fe:Mn i Zn:Mn što ukazuje na to da promenjena homeostaza između mangana i Fe i Zn i može imati inhibitoran efekat na SOD (Hu et al. 2022).

Aktivnosti CAT i APX su visoko pozitivno korelisane i pokazuju isti obrazac aktivnosti. Blagi pad aktivnosti oba enzima detektovan je samo u biljkama iz Bora 2 i indukovano je povišenim koncentracijama Pb, Zn, Cu i Cd koje su negativno korelisane sa aktivnošću ova dva enzima i u okviru vrednosti koje su toksične za većinu biljaka (Kabata-Pendias 2011). Može se očekivati da ovako povišena koncentracija ima negativno dejstvo na biosintezu ovih enzima, kao i na strukturu CAT kao metaloenzima.

Istovremeno povećanje aktivnosti gvajakol peroksidaze (POD), koja kao supstrat koristi fenole, ukazuje na povećanu produkciju vodonik peroksida i značaj ovog enzima i povećane količine fenolnih jedinjenja u njegovom uklanjanju (Takahama 2004). Njihova efikasnost u uklanjanju viška  $H_2O_2$  se ogleda i u stabilnom nivou lipidne peroksidacije koja je u listovima u septembru ostala slična onoj u junu, kao i onoj kod kontrolnih biljaka. Nasuprot tome, pri manjem povećanju koncentracije Pb detektovan je porast aktivnosti enzima koji

uklanjaju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: CAT i APX (Bor 1, Rudnik) i POD (Rudnik), što je već opisano kod biljaka izloženih niskim koncentracijama Pb kao što su *Wolffia arrhiza*, *Lolium perenne* i *Eichhornia crassipes* (Piotrowska et al. 2009; Li et al. 2012; Malar et al. 2014). Ovi rezultati još jednom potvrđuju suprotne efekte niskih i visokih doza metala na aktivnosti enzima antioksidativnog sistema.

Enzim glutation reduktaza koji je uključen u regeneraciju redukovano glutationa nije ispoljio statistički značajne razlike u aktivnosti između biljaka sa različitih lokaliteta. Samo u listovima biljaka sa Rudnika GR pokazuje nešto višu aktivnost. Dok je aktivnost GR kod kontrolnih biljaka i biljaka iz Bora 1 bila vidno niža u septembru u odnosu na jun, u listovima biljaka iz Bora 2 i Rudnika je zadržana na prethodnom nivou ukazujući na veću količinu glutationa i potrebu biljke za uklanjanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kroz AsA-GSH ciklus.

## 6. ZAKLJUČCI

- Visoke koncentracije pseudototalnih i pristupačnih metala u jalovini ukazuju na potencijalni negativni uticaj jalovišta na okolnu životnu sredinu. Ovaj uticaj proizilazi iz raznošenja finih čestica jalovine vetrom u okolne ekosisteme, kao i proceđivanjem metala kroz slojeve jalovine do podzemnih voda.
- Biljke trske kontinuirano izložene stresu usled visokih koncentracija PTE u podlozi, kao i nedostatka markoelemenata, poseduju zaštitne mehanizme pre svega bazirane na efikasnoj imobilizaciji metala i antioksidativnim mehanizmima zaštite.
- Zahvaljujući niskom stepenu translokacije većine analiziranih metala u nadzemne delove ( $TF < 1$ ), kao i intenzivnom usvajanju podzemnim delovima biljaka ( $BCF > 1$ ), najveći deo metala se zadržava na nivou korena, a koncentracije u listovima biljaka ostaju u okviru normalnih vrednosti. To omogućava neometano odvijanje fizioloških procesa i obezbeđuje biljkama trske značajnu ekološku prednost i uspešan rast i preživljavanje u ekstremno nepovoljnim edafskim uslovima.
- Akumulacija metala u različitim biljnim tkivima trske zavisi od vrste metala i zasniva se na imobilizaciji u ćelijskom zidu/vakuoli biljnih ćelija.
- Različite koncentracije i međusobni odnosi PTE dovode do drugačijih efekata na biohemijski odgovor i antioksidativne mehanizme zaštite kod biljaka sa različitim lokaliteta.
- Niske koncentracije stimulišu, dok visoke koncentracije PTE inhibiraju aktivnost enzima. Međutim, stopa inhibicije aktivnosti enzima zavisi od konkretnog enzima, koncentracija metala u biljkama i njihovih odnosa i međusobnih interakcija.
- U slučaju visokih koncentracija metala optimalni stehiometrijski odnosi metala mogu da ublaže negativne efekte na aktivnost enzima.
- Kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama PTE SOD ima jedinstvenu i nemeđeljivu ulogu u održavanju redoks homestaze u ćeliji.
- Značajna inhibicija aktivnosti enzima, pad ukupnog antioksidativnog kapaciteta i povećan stepen lipidne peroksidacije membrana sugerišu da pri veoma visokim koncentracijama metala mehanizmi uključeni u imobilizaciju i detoksifikaciju ne mogu u potpunosti da ograniče njihovu toksičnost.
- *Phragmites australis* se može dugoročno gajiti u cilju fitostabilizacije jalovine i drugih metalima opterećenih supstrata bogatih vodom, kao i za rizofiltraciju otpadnih voda zagađenih visokim koncentracijama više metala, kao što su one iz flotacionih jalovišta, pre njihovog ispuštanja u prirodne akvatične ekosisteme.

## 7. LITERATURA

- Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007) Specific roles of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 143(4), 1720–1738.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aghajanzadeh TA, Prajapati DH, Burow M (2020) Copper toxicity affects indolic glucosinolates and gene expression of key enzymes for their biosynthesis in Chinese cabbage. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 66(9), 1288–1301.
- Ahmad MSA, 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. *Biological Trace Element Research*, 144, 1229–1239.
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, 51, 167–173.
- Alaboutdi KA, Ahmed B, Brodie G (2018) Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 123–127.
- Alagić SČ, Šerbula SS, Tošić SB, Pavlović AN, Petrović JV (2013) Bioaccumulation of arsenic and cadmium in birch and lime from the Bor region. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(4), 671–682.
- Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, De la Guardia MD (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany*, 45(12), 1893–1898.
- Alfadul SM, Al-Fredan MA (2013) Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on *Phragmites australis* metabolism, metal accumulation and distribution. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 38, 11–19.
- Ali S, Abbas Z, Seleiman MF, Rizwan M, Yavaş İ, Alhammad BA, Shami A, Hasanuzzaman M, Kalderis D (2020) Glycine betaine accumulation, significance and interests for heavy metal tolerance in plants. *Plants*, 9(7), 896.
- Allen SE (1989) Chemical analysis of ecological material. Blackwell Scientific Publications.
- Almeida AM, Villalobos E, Araújo SS, Leyman BVDP, Alfaro-Cardoso L, Fevereiro PS, Torné JM, Santos DM (2005) Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica*, 146, 165–176.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–1341.
- Amao Y, Ohashi A (2008) Effect of Mn ion on the visible light induced water oxidation activity of photosynthetic organ grana from spinach. *Catalysis Communications*, 10(2), 217–220.
- Ambrosini VG, Rosa DJ, de Melo GWB, Zalamena J, Cella C, Simão DG, Brunetto G (2018) High copper content in vineyard soils promotes modifications in photosynthetic parameters and morphological changes in the root system of 'Red Niagara' plantlets. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 89–98.
- Andreini C, Bertini I, Rosato A (2009) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research*, 42(10), 1471–1479.
- Andrejić (2021) Ispitivanje fitoremedijacionog i adaptivnog potencijala *Miscanthus × giganteus* (Poaceae) gajenog na odlagalištu flotacione jalovine na planini Rudnik (disertacija), Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- 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.
- Andrejić G, Šinžar-Sekulić J, Prica M, Dželetović Ž, Rakić T (2019) Phytoremediation potential and physiological response of *Miscanthus × giganteus* cultivated on fertilized and non-

- fertilized flotation tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 34658–34669.
- Antić M, Jović N (1965) Geneza i osobine zemljišta Beljskog lovno-šumskog područja, Bilten LŠG, 3, 25–36.
- Antić M, Jović N, Avdalović V (1990) Pedologija, Beograd: Naučna knjiga.
- Antonangelo JA, Zhang H (2019) Heavy metal phytoavailability in a contaminated soil of northeastern Oklahoma as affected by biochar amendment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 33582–33593.
- Antonijević MM, Dimitrijević MD, Milic SM, Nujkic MM (2012) Metal concentrations in the soils and native plants surrounding the old flotation tailings pond of the Copper Mining and Smelting Complex Bor (Serbia). *Journal of Environmental Monitoring*, 14(3), 866–877.
- Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, Rodrigo MAM, Adam V, Fujita M, Kizek R, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2015) Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Frontiers in Plant Science*, 6, 192.
- Arim AL, Quina MJ, Gando-Ferreira LM (2019) Uptake of trivalent chromium from aqueous solutions by xanthate pine bark: Characterization, batch and column studies. *Process Safety and Environmental Protection*, 121, 374–386.
- Arivoli A, Mohanraj R, Seenivasan R (2015) Application of vertical flow constructed wetland in treatment of heavy metals from pulp and paper industry wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 13336–13343.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82, 1227–1338.
- Assunção AG, Schat H, Aarts MG (2003) *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159(2), 351–360.
- Azouzi R, Charef A, Hamzaoui AH (2015) Assessment of effect of pH, temperature and organic matter on zinc mobility in a hydromorphic soil. *Environmental Earth Sciences*, 74(4), 2967–2980.
- Baek SA, Han T, Ahn SK, Kang H, Cho MR, Lee SC, Im KH (2012) Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, 28(4), 446–452.
- Bakkaus E, Gouget B, Gallien JP, Khodja H, Carrot H, Morel JL, Collins R (2005) Concentration and distribution of cobalt in higher plants: the use of micro-PIXE spectroscopy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 231(1–4), 350–356.
- Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2003) Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Functional Plant Biology*, 30(1), 57–64.
- Balestrasse KB, Noriega GO, Batlle A, Tomaro ML (2005) Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules. *Free Radical Research*, 39(2), 145–151.
- Ballottari M, Mozzo M, Girardon J, Hienerwadel R, Bassi R (2013) Chlorophyll triplet quenching and photoprotection in the higher plant monomeric antenna protein Lhcb5. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(38), 11337–11348.
- Banu MNA, Hoque MA, Watanabe-Sugimoto M, Matsuoka K, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2009) Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 166(2), 146–156.

- Barcelo J, Poschenrieder C (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 75–92.
- Barrutia O, Epelde L, García-Plazaola JI, Garbisu C, Becerril JM (2009) Phytoextraction potential of two *Rumex acetosa* L. accessions collected from metalliferous and non-metalliferous sites: effect of fertilization. *Chemosphere*, 74(2), 259–264.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Becker M, Asch F (2005) Iron toxicity in rice - conditions and management concepts. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 558–573.
- Bertamini M, Nedunchezian N (2002) Leaf age effects on chlorophyll, Rubisco, photosynthetic electron transport activities and thylakoid membrane protein in field grown grapevine leaves, *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 799–803.
- Bhaduri AM, Fulekar MH (2012) Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 11, 55–69.
- Bhargava A, Carmona FF, Bhargava M, Srivastava S (2012) Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals: A review. *Journal of Environmental Management*, 105, 103–120.
- Bhatia M, Goyal D (2014) Analyzing remediation potential of wastewater through wetland plants: a review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 33(1), 9–27.
- Bingham FT, Page AL, Strong JE (1980) Yield and cadmium content of rice grain in relation to addition rates of cadmium, copper, nickel, and zinc with sewage sludge and liming. *Soil Science*, 130(1), 32.
- Bonanno G (2011) Trace element accumulation and distribution in the organs of *Phragmites australis* (common reed) and biomonitoring applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 1057–1064.
- Bonanno G, Giudice RL (2010) Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological indicators*, 10(3), 639–645.
- Boonyapookana B, Upatham ES, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Singhakaew S (2002) Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duckweed *Wolffia globosa*. *International Journal of Phytoremediation*, 4(2), 87–100.
- Bosnić D, Bosnić P, Nikolić D, Nikolić M, Samardžić J (2019) Silicon and iron differently alleviate copper toxicity in cucumber leaves. *Plants*, 8(12), 554.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bragato C, Brix H, Malagoli M (2006) Accumulation of nutrients and heavy metals in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel and *Bolboschoenus maritimus* (L.) Palla in a constructed wetland of the Venice lagoon watershed. *Environmental Pollution*, 144(3), 967–975.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Bremner JM (1996) Nitrogen-total. In: Sparks DL (ed.) *Methods of soil analysis, Part 3. Chemical methods*, pp. 1085–1121, Soil Science Society of America -Book Series 5.3, Madison.
- Brix H, Schierup H (1989) The use of aquatic macrophytes in water pollution control. *Ambio*, 28(2), 100–107.



- Cakmak I, Marshner H (1993) Effect of zinc nutritional status on superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. In: Barrow NJ (ed.) *Plant nutrition-from genetic engineering field practice*, pp. 133–137, Kluwer, The Netherlands.
- Chandra R, Kang H (2016) Mixed heavy metal stress on photosynthesis, transpiration rate, and chlorophyll content in poplar hybrids. *Forest Science and Technology*, 12(2), 55–61.
- Chaney RL (1989) Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food-chains. In: Bnayahu Bar-Yosef, Barrow NJ, Goldshmid J (eds.), *Ecological studies 74: Inorganic contaminants in the vadose zone*, pp. 140–158, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chaoui A, El Feriani E (2005) Effect of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 23–31.
- Chatterjee J, Chatterjee C (2000) Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109(1), 69–74.
- Chatterjee J, Chatterjee C (2003) Management of phytotoxicity of cobalt in tomato by chemical measures. *Plant Science*, 164(5), 793–801.
- Chen G, Ren L, Zhang J, Reed BM, Zhang D, Shen X (2015) Cryopreservation affects ROS-induced oxidative stress and antioxidant response in *Arabidopsis* seedlings. *Cryobiology*, 70, 38–47.
- Chen S, Wang Q, Lu H, Li J, Yang D, Liu J, Yan C (2019) Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia obovata* under Cd and Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 134–143.
- Choudhary A, Kumar A, Kaur N (2020) ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Diversity*, 42(1), 33–43.
- Chrestensen CA, Starke DW, Mielal JJ (2000) Acute cadmium exposure inactivates thioltransferase (Glutaredoxin), inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl-mixed disulfides, and initiates apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26556–26565.
- Christensen TH, Haung PM (1999) Solid phase cadmium and the reaction of aqueous cadmium with soil surfaces. In: McLaughlin MJ, Singh BR (eds.), *Cadmium in Soils and Plants*, pp. 65–96, Kluwer, London.
- Cicero-Fernández D, Peña-Fernández M, Expósito-Camargo JA, AntizarLadislao B (2017) Long-term (two annual cycles) phytoremediation of heavy metal-contaminated estuarine sediments by *Phragmites australis*. *New Biotechnology*, 38, 56–64.
- Clairmont KB, Hagar WG, Davis EA (1986). Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus. *Plant Physiology*, 80(1), 291–293.
- Clemens S (2006) Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 319–332.
- Clijsters H, Van Assche F (1985) Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynthesis Research*, 7, 31–40.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159–182.
- Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825–832.
- Cohu CM, Pilon M (2007) Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiologia Plantarum*, 129(4), 747–755.
- Colzi I, Doumet 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. *Environmental and Experimental Botany*, 72(1), 77–83.

- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11(2), 80–88.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A (2006) Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 449–459.
- Croft H, Chen JM, Luo X, Bartlett P, Chen B, Staebler RM (2017) Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity. *Global Change Biology*, 23(9), 3513–3524.
- Cui Y, Zhao N (2011) Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant, Soil and Environment*, 57(1), 34–39.
- Cuypers 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. *Frontiers in Plant Science*, 25(7), 470.
- Dahmani-Muller H, Van Oort F, Gélie B, Balabane M (2000) Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 109(2), 231–238.
- Das K, Dang R, Shivananda TN, Sur P (2005) Interaction between phosphorus and zinc on the biomass yield and yield attributes of the medicinal plant stevia (*Stevia rebaudiana*). *The Scientific World Journal*, 5, 390–395.
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Das P, Samantaray S, Rout GR (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98, 29–36.
- Davies BE (1976) Mercury content of soil in Western Britain with special reference to contamination from base metal mining. *Geoderma*, 16(3), 183–192.
- Davies BE (1977) Heavy metal pollution of British agricultural soils with special reference to the role of lead and copper mining. In: *Proceedings of the International Seminar on Soil Environment and Fertility Management in Intensive Agriculture*, p. 394, University College in Wales, Dyfed.
- Davies FT, Puryear JD, Newton RJ, Egilla JN, Grossi JAS (2002) Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *Journal of Plant Nutrition*, 25(11), 2389–2407.
- De Dordot S, Lutts S, Bertin P (2005) Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an inter specific rice. *Journal of Plant Nutrition*, 28(1), 20.
- De Filippis LF, Ziegler H (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *Journal of Plant Physiology*, 142(2), 167–172.
- De Souza MP, Lytle CM, Mulholland MM, Otte ML, Terry N (2000) Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard. *Plant Physiology*, 122(4), 1281–1288.
- Deef HE (2007) Copper treatments and their effects on growth, carbohydrates, minerals and essential oils contents of *Rosmarinus officinalis* L. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(3), 322–328.
- Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141(2), 330–335.
- Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Holzer R, Feller U (2004) Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3), 253–266.

- Devi SR, Prasad MNV (1998) Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, 138(2), 157–165.
- Devries W, Lofts S, Tipping E, Meili M, Groenenberg JE, Schutze G (2002) Impact of soil properties on critical concentrations of cadmium, lead, copper, zinc and mercury in soil and soil solution in view of ecotoxicological effects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 191, 47–89.
- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 532–538.
- Di Toppi LS, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105–130.
- Dietz KJ, Baier M, Krämer M (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.), *Heavy metal stress in plants: From Molecules to Ecosystems*, pp. 73–97, Springer, Berlin.
- Du Laing G, Rinklebe J, Vandecasteele B, Meers E, Tack FM (2009) Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: a review. *Science of the Total Environment*, 407(13), 3972–3985.
- Dube BK, Tewari K, Chatterjee J, Chatterjee C (2003) Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere*, 53(9), 1147–1153.
- Džamić R, Stevanović D, Jakovljević M (1996) Određivanje ukupnog azota u zemljištu semimikro-Kjeldahl-ovom metodom – modifikacija po Bremneru – 1960. *Praktikum iz agrohemije*, pp. 31–33, Poljoprivredni fakultet Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Ebbs SD, Kochian LV (1997) Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, 26(3), 776–781.
- Egner H, Riehm H, Domingo WR (1960) Untersuchungen über die chemische Bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Boden. II. *Chemische Extraktionsmethoden zur Phosphor- und Kaliumbestimmung. Kungliga Lantbrukshögskolans Annaler*, 26, 199–215.
- Ekmekci Y, Tanyolç D, Ayhan B (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 165(6), 600–611.
- El-Amier Y, Elhindi K, El-Hendawy S, Al-Rashed S, Abd-ElGawad A (2019) Antioxidant system and biomolecules alteration in *Pisum sativum* under heavy metal stress and possible alleviation by 5-aminolevulinic acid. *Molecules*, 24, 4194.
- Eller F, Brix H (2012) Different genotypes of *Phragmites australis* show distinct phenotypic plasticity in response to nutrient availability and temperature. *Aquatic Botany*, 103, 89–97.
- Eller F, Skálová H, Caplan JS, Bhattarai GP, Burger MK, Cronin JT, Guo WY, Guo X, Hazelton ELG, Kettenring KM, Lambertini C, McCormick MK, Meyerson LA, Mozdzer TJ, Pyšek P, Sorrell BK, Whigham DF, Brix H (2017) Cosmopolitan species as models for ecophysiological responses to global change: the common reed *Phragmites australis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1833.
- Esmailzadeh M, Karbassi A, Bastami KD (2017) Antioxidant response to metal pollution in *Phragmites australis* from Anzali wetland. *Marine Pollution Bulletin*, 119(1), 376–380.
- Farid M, Ali S, Rizwan M, Ali Q, Abbas F, Bukhari SAH, Saeed R, Wu L (2017) Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morpho-physiological and biochemical alterations in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 90–102.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(1), 243–282.

- Feigl F, Suter HA (1942). Analytical use of sodium rhodizonate. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 14(10), 840–842.
- Feldman AW, Hanks RW(1968) Phenolic content in the roots and leaves of tolerant and susceptible citrus cultivars attacked by *Radopholus similis*. *Phytochemistry*, 7(1), 5–12.
- Fernando DR, Lynch JP (2015) Manganese phytotoxicity: new light on an old problem. *Annals of Botany*, 116(3), 313–319.
- Fodor A, Szabo-Nagy A, Erdei L (1995) The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology*, 147(1), 87–92.
- Fountoulakis M, Sabathianakis G, Kritsotakis I, Kabourakis E, Manios T (2017) Halophytes as vertical-flow constructed wetland vegetation for domestic wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 583, 432–439.
- Foy CD, Weil RR, Coradetti CA (1995) Differential manganese tolerances of cotton genotypes in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 18(4), 685–706.
- Foyer C, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 2–25.
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative Stress in Plants. *Physiologia Plantarum*, 92(4), 696–717.
- Freinbichler W, Colivicchi MA, Stefanini C, Bianchi L, Ballini C, Misini B, Weinberger P, Linert W, Vareslija D, Tipton KF, Della Corte L (2011) Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2067–2079.
- Freisinger E (2009) Metallothioneins in Plants. In: Sigel A, Sigel H, Sigel RKO (eds.), *Metallothioneins and Related Chelators*, 5, pp. 107–153, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Gajewska E, Sklodowska M, Slaba M, Mazur J (2006) Effect of nickel on antioxidative enzymes activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50, 653–659.
- Gall HL, Philippe F, Domon JM, Gillet F, Pelloux J, Rayon C (2015) Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4(1), 112–166.
- Gallego S, Benavides M, Tomaro M (2002) Involvement of an antioxidant defence system in the adaptive response to heavy metal ions in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation*, 36, 267–273.
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121, 151–159.
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik NS, Groppa MD, Benavides MP (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, 83, 33–46.
- Gao L, Tang S, Zhuge L, Nie M, Zhu Z, Li B, Yang J (2012) Spatial genetic structure in natural populations of *Phragmites australis* in a mosaic of saline habitats in the Yellow River delta, China. *PLoS ONE*, 7(8), e43334.
- Gapper C, Dolan L (2006) Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology*, 141(2), 341–345.
- Garg N, Manchanda G (2009) ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems*, 143(1), 81–96.
- Gaur A, Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science*, 528–534.
- Georgiadou EC, Kowalska E, Patla K, Kulbat K, Smolińska B, Leszczyńska J, Fotopoulos V (2018) Influence of heavy metals (Ni, Cu, and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 862.

- Ghasemi K, Ghasemi Y, Ebrahimzadeh MA (2009) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(3), 277–281.
- Ghori NH, Ghori T, Hayat MQ, Imadi SR, Gul A, Altay V, Ozturk M (2019) Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807–1828.
- Ghosh M, Singh SP (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 1–18.
- Gichner T, Žnidar I, Száková J (2008) Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652(2), 186–190.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Gimeno-Garcia E, Andreu V, Boluda R (1996) Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution*, 92(1), 19–25.
- Glavonjić TMJ, Brankov JJ, Miljanović D (2018) Residents' perception toward protected areas - Carska Bara Special Nature Reserve (Vojvodina, Serbia). *Geographica Pannonica*, 22(4).
- González A, Steffen KL, Lynch JP (1998) Light and excess manganese implications for oxidative stress in common bean. *Plant Physiology*, 118(2), 493–504.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32(6), 481–494.
- Grove JH, Ellis BG (1980) Extractable chromium as related to soil pH and applied chromium. *Soil Science Society of America Journal*, 44(2), 238–242.
- Gruenhagen L, Jager IJ (1985) Effect of heavy metals on growth and heavy metals content of *Allium porrum* and *Pisum sativum*. *Angewandte Botanik*, 59, 11–28.
- Guo H, Chen H, Hong C, Jiang D, Zheng B (2017) Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 14, 119–128.
- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M (2008) Over expressing GSHI and AsPCSI simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72(7), 1020–1026.
- Guo J, Qin S, Rengel Z, Gao W, Nie Z, Liu H, Li C, Zhao P (2019) Cadmium stress increases antioxidant enzyme activities and decreases endogenous hormone concentrations more in Cd-tolerant than Cd-sensitive wheat varieties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 380–387.
- Guo L, Ott DW, Cutright TJ (2014) Accumulation and histological location of heavy metals in *Phragmites australis* grown in acid mine drainage contaminated soil with or without citric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 105, 46–54.
- Gupta DK, Huang HG, Huang XE, Yang XE, BHN R, Inouhe M (2010) The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatin but the glutathione. *Journal of Hazardous materials*, 177(1–3), 437–444.
- Habashi F (2013) Zinc, physical and chemical properties. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (eds.), *Encyclopedia of Metalloproteins*, Springer, New York, NY.
- Habibi G (2014) Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation, scavenging and signaling in plants. In: *Oxidative damage to plants*, 557–584, Academic Press.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322.
- Hasan MK, Cheng Y, Kanwar MK, Chu XY, Ahammed GJ, Qi ZY (2017) Responses of plant proteins to heavy metal stress - A Review. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1492.

- Hasanuzzaman M, Bhuyan MB, Parvin K, Bhuiyan TF, Anee TI, Nahar K, Hossen Shahadat M, Zulfiqar F, Alam Mahabub M, Fujita M (2020) Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8695.
- Hassan MU, Chattha MU, Khan I, Chattha MB, Aamer M, Nawaz M, Ali A, Khan MAU, Khan TA (2019) Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities - a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 12673–12688.
- Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Karenlampi SO (2011) Plant metallothioneins - metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, 13(2), 225–232.
- Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR (2007) Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(10), 1106–1116.
- Hawkes HA (1977) Eutrophication of rivers - effects, causes and control. In: Calley AG, Forster CF, Stafford DA (eds.), *Treatment of industrial effluents*, pp. 159–192, Hodder and Stoughton, London.
- Haydon MJ, Cobbett CS (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist*, 174(3), 499–506.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189–198.
- Hegedus A, Erdei S, Horvath G (2001) Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science*, 160(6), 1085–1093.
- Hernández-Crespo C, Oliver N, Bixquert J, Gargallo S, Martín M (2015) Comparison of three plants in a surface flow constructed wetland treating eutrophic water in a Mediterranean climate. *Hydrobiologia*, 774(1), 183–192.
- Hinchman RR, Negri MC, Gatliff EG (1995) Phytoremediation: using green plants to clean up contaminated soil, groundwater, and wastewater (No. ANL/ES/CP-89941; CONF-960804-38). Argonne National Lab.(ANL), Argonne, IL (United States).
- Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57(12), 1332–1334.
- 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.
- Hu CH, Wang PQ, Zhang PP, Nie XM, Li BB, Tai L, Liu WT, Li WQ, Chen KM (2020) NADPH Oxidases: The Vital Performers and Center Hubs during Plant Growth and Signaling. *Cells*, 9(2), 437.
- Hu SH, Jinn TL (2022) Impacts of Mn, Fe, and oxidative stressors on MnSOD activation by AtMTM1 and AtMTM2 in *Arabidopsis*. *Plants*, 11(5), 619.
- Huang X, Wang L, Zhu S, Ho SH, Wu J, Kalita PK, Ma F (2018) Unraveling the effects of arbuscular mycorrhizal fungus on uptake, translocation, and distribution of cadmium in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 43–50.
- Hübner R, Astin KB, Herbert RJH (2010) 'Heavy metal'-time to move on from semantics to pragmatics? *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 1511–1514.
- Hurry CR, James EA, Thompson RM (2013) Connectivity, genetic structure and stress response of *Phragmites australis*: issues for restoration in a salinising wetland system. *Aquatic Botany*, 104, 138–146.

- Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A (2002) Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 977–982.
- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsuhashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2006) Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *The Plant Journal*, 45(3), 335–346.
- ISO 10390/1994 Soil quality – determination of pH.
- Israr M, Jewell A, Kumar D, Sahi SV (2011) Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *Journal of Hazardous materials*, 186(2–3), 1520–1526.
- Izosimova A (2005) Modelling the interaction between calcium and nickel in the soil-plant system. *Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)*, 288, 9.
- Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A (2004) Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*, 218(5), 721–728.
- Jabeen R, Ahmad A, Iqbal M (2009) Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *Botanical Review*, 75, 339–364.
- Jackson ML (1958) Soil chemical analysis, pp. 214–221, Prentice Hall Inc., Englewood,
- Jawad Hassan M, Ali Raza M, Ur Rehman S, Ansar M, Gitari H, Khan I, Wajid M, Ahmed M, Abbas Shah G, Peng Y, Li Z (2020) Effect of cadmium toxicity on growth, oxidative damage, antioxidant defense system and cadmium accumulation in two sorghum cultivars. *Plants*, 9(11), 1575.
- Jiang S, Weng B, Liu T, Su Y, Liu J, Lu H, Yan C (2017) Response of phenolic metabolism to cadmium and phenanthrene and its influence on pollutant translocations in the mangrove plant *Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco (Ac). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 290–297.
- Jiang W, Liu D (2010) Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biology*, 10, 1–8.
- Johnstone TC, Nolan EM (2015) Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Transactions*, 44(14), 6320–6339.
- Jones Jr JB, Case VW (1990) Sampling, handling, and analyzing plant tissue samples. *Soil testing and plant analysis*, 3, 389–427.
- Joseph L, Jun BM, Flora JR, Park CM, Yoon Y (2019) Removal of heavy metals from water sources in the developing world using low-cost materials: A review. *Chemosphere*, 229, 142–159.
- Jouili H, el Feriani E (2003) Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. *Comptes Rendus Biologies*, 326(7), 639–644.
- Juwarkar AS, Shende GB (1986) Interaction of Cd-Pb effect on growth yield and content of Cd, Pb in barley. *Indian Journal of Environmental Health*, 28(3), 235–243.
- Kabata-Pendias A (2011) Trace elements in soils and plants. 4th ed. Boca Raton: CRC Press.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Kachout SS, Bouraoui NK, Jaffel K, Rejeb MN, Leclerc JC, Ouerghi Z (2012) Water deficit-induced oxidative stress in leaves of Garden Orach (*Atriplex hortensis*). *Research Journal of Biotechnology*. 7(4), 46–52.
- Kahkonen MP, Heinonen M (2003) Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628–633.
- Kaji T, Suzuki M, Yamamoto C, Mishima A, Sakamoto M, Kozuka H (1995) Severe damage of cultured vascular endothelial cell monolayer after simultaneous exposure to cadmium and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 168–172.

- Kámán-Tóth E, Dankó T, Gullner G, Bozsó Z, Palkovics L, Pogány M (2019) Contribution of cell wall peroxidase- and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species to *Alternaria brassicicola*-induced oxidative burst in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, 20(4), 485–499.
- Kettenring KM, Mock KE, Zaman B, McKee M (2016) Life on the edge: reproductive mode and rate of invasive *Phragmites australis* patch expansion. *Biological Invasions*, 18, 2475–2495.
- Kettenring KM, Whigham DF, Hazelton ELG, Gallagher SK, Weiner HM (2015) Biotic resistance, disturbance, and mode of colonization impact the invasion of a widespread, introduced wetland grass. *Ecological Applications*, 25(2), 466–480.
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553–2562.
- Kisa D, Elmastaş M, Öztürk L, Kayır Ö (2016) Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Applied Biological Chemistry*, 59, 813–820.
- Kitagishi K, Yamane I (1981) Heavy metal pollution in soils of Japan, p. 302, Japan Science Society Press, Tokyo.
- Klink A (2017) A comparison of trace metal bioaccumulation and distribution in *Typha latifolia* and *Phragmites australis*: implication for phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 3843–3852.
- Korzeniowska J, Stanislawska-Glubiak E (2015) Phytoremediation potential of *Miscanthus giganteus* and *Spartina pectinata* in soil contaminated with heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11648–11657.
- Kovačević M, Jovanović Ž, Andrejić G, Dželetović Ž, Rakić T (2020) Effects of high metal concentrations on antioxidative system in *Phragmites australis* grown in mine and flotation tailings ponds. *Plant and Soil*, 453, 297–312.
- Kováčik J, Klejdus B, Hedbavny J, Štork F, Bačkor M (2009) Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320(1), 231–242.
- Krämer U (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 517–534.
- Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research*, 98, 551–564.
- Krieger-Liszkay A, Trebst A (2006) Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany*, 57(8), 1677–1684.
- Kühl H, Koppitz H, Rolletschek H, Kohl JG (1999) Clone specific differences in a *Phragmites australis* stand: I. Morphology, genetics and site description. *Aquatic Botany*, 64, 235–246.
- Kukier U, Peters CA, Chaney RL, Angle JS, Roseberg RJ (2004) The effect of pH on metal accumulation in two Alyssum species. *Journal of Environmental Quality*, 33(6), 2090–2102.
- Küpper H, Andresen E (2016) Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8, 269–285.
- Kupper H, Gotz B, Mijovilovich A, Kupper FC, Meyer-Klaucke W (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation, and toxicity in *Crassula helmsii* as a new copper accumulator. *Plant Physiology*, 151(2), 702–714.
- Kurt-Gür G, Demirci H, Sunulu A, Ordu E (2018) Stress response of NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase in *Gossypium hirsutum* L. grown under copper toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 (31), 31679–31690.



- Lam KS (1999) Biodegradation of xanthate by microbes isolated from a tailings lagoon and a potential role for biofilm and plant/microbe associations, Ph.D. Thesis, Western Sydney University, Penrith, Australia.
- Lan W, Zhang J, Hu Z, Ji M, Zhang X, Zhang J, Li F, Yao G (2018) Phosphorus removal enhancement of magnesium modified constructed wetland microcosm and its mechanism study. *Chemical Engineering Journal*, 335, 209–214.
- Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E (2001) The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). *Planta*, 212, 323–331.
- Lee BH, Scholz M (2007) What is the role of *Phragmites australis* in experimental constructed wetland filters treating urban runoff? *Ecological Engineering*, 29(1), 87–95.
- Lee CW, Choi JM, Pak CH (1996) Micronutrient toxicity in seed geranium (*Pelargonium × hortorum* Baley). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(1), 77–82.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(8), 673–682.
- Lewis S, Donkin ME, Depledge MH (2001) Hsp 70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aqua Toxicology*, 51(3), 277–291.
- Li H, Luo H, Li D, Hu T, Fu J (2012) Antioxidant enzyme activity and gene expression in response to lead stress in perennial ryegrass. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(2), 80–85.
- Li HF, Gray C, Mico C, Zhao FJ, McGrath SP (2009) Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils. *Chemosphere*, 75(7), 979–986.
- Li J, Cao X, Jia X, Liu L, Cao H, Qin, Li M (2021) Iron deficiency leads to chlorosis through impacting chlorophyll synthesis and nitrogen metabolism in *Areca catechu* L. *Frontiers in Plant Science*, 12, 710093.
- Li Y, He N, Hou J, Xu L, Liu C, Zhang J, Wang Q, Zhang X, Wu X (2018) Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6, 64.
- Li Z, McLaren RG, Metherell AK (2004) The availability of native and applied soil cobalt to ryegrass in relation to soil cobalt and manganese status and other soil properties. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47(1), 33–43.
- Liang Y, Zhu H, Bañuelos G, Yan B, Zhou Q, Yu X, Cheng X (2017) Constructed wetlands for saline wastewater treatment: a review. *Ecological Engineering*, 98, 275–285.
- Liu J, Wang J, Lee S, Wen R (2018) Copper-caused oxidative stress triggers the activation of antioxidant enzymes via ZmMPK3 in maize leaves. *PLoS ONE*, 13(9):e0203612.
- Loneragan JF (1988) Distribution and movement of manganese in plants. In: Graham RD, Hannam RJ, Uren NC (eds.), *Manganese in soils and plants*, pp. 113–124, Kluwer, Dordrecht.
- Longnecker NE, Robson AD (1993) Distribution and transport of zinc in plants. In: *Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on 'Zinc in Soils and Plants'*, The University of Western Australia, pp. 79–91, Springer Netherlands.
- Lopez-Luna J, Gonzalez-Chavez MC, Esparza-Garcia FJ, Rodriguez-Vazquez R (2009) Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 829–834.
- Lou Y, Zhao P, Wang D, Amombo E, Sun X, Wang H, Zhuge Y (2017) Germination, physiological responses and gene expression of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) growing under Pb and Cd. *PLoS ONE*, 12(1):e0169495.

- Luo Y, Li WM, Wang W (2008). Trehalose: Protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress? *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 378–384.
- Malar S, Shivendra Vikram S, Jc Favas P, Perumal V (2014) Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths (*Eichhornia crassipes* (Mart.)). *Botanical Studies*, 55(1), 1–11.
- Mallick S, Sinam G, Mishra RK, Sinha S (2010) Interactive effects of Cr and Fe treatments on plants growth, nutrition and oxidative status in *Zea mays* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 987–995.
- Marchand L, Nsanganwimana F, Oustrière N, Grebenshchykova Z, Lizama-Allende K, Mench M (2014) Copper removal from water using a bio-rack system either unplanted or planted with *Phragmites australis*, *Juncus articulatus* and *Phalaris arundinacea*. *Ecological Engineering*, 64, 291–300.
- Marchiol L, Assolari S, Sacco P, Zerbi G (2004) Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*, 132(1), 21–27.
- Maric M, Antonijevic M, Alagic S (2013) The investigation of the possibility for using some wild and cultivated plants as hyperaccumulators of heavy metals from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(2), 1181–1188.
- 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, 1–30.
- Marschner H (1986) Mineral nutrition of higher plants, p. 674, Academic Press, London.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed., Academic Press, Toronto.
- Marschner H (2012) Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3rd ed., Academic Press, London.
- Marschner H, Oberle H, Cakmak I, Römheld V (1990) Growth enhancement by silicon in cucumber (*Cucumis sativus*) plants depends on imbalance in phosphorus and zinc supply. *Plant and Soil*, 124, 211–219.
- Martins LL, Mourato MP, Cardoso AI, Pinto AP, Mota AM, Goncalves DLS, de Varennes A (2011) Oxidative stress induced by cadmium in *Nicotiana tabacum* L.: effects on growth parameters, oxidative damage and antioxidant responses in different plant parts. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1375–1383.
- Matysik J, Alia BB, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*, 82(5), 525–532.
- Mauromicale G, Ierna A, Marchese M (2006) Chlorophyll fluorescence and chlorophyll content in field-grown potato as affected by nitrogen supply, genotype, and plant age. *Photosynthetica*, 44, 76–82.
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Science*, 127(2), 129–137.
- McGrath SP, Zhao FJ (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 277–282.
- Meyers DE, Kopittke PM, Auchterlonie GJ, Webb RI (2009) Characterization of lead precipitate following uptake by roots of *Brassica juncea*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 28(11), 2250–2254.
- Mijovilovich A, Leitenmaier B, Meyer-Klaucke W, Kroneck PM, Gotz B, Kupper H (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. II. Different mechanisms for copper versus cadmium detoxification in the copper-sensitive cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype). *Plant Physiology*, 151(2), 715–731.

- Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 173–193.
- Millaleo R, Reyes-Diaz M, Ivanov AG, Mora ML, Alberdi M (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 10(4), 470–481.
- Minkina T, Rajput V, Fedorenko G, Fedorenko A, Mandzhieva S, Sushkova S, Yao J (2020) Anatomical and ultrastructural responses of *Hordeum sativum* to the soil spiked by copper. *Environmental Geochemistry and Health*, 42 (1), 45–58.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends In Plant Science*, 16(6), 300–309.
- Mobin M, Khan NA (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164(5), 601–610.
- Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK (2007) Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camella sinensis* (L.) O Kuntze. *Environmental Toxicology*, 22(4), 368–374.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459–481.
- Moreno-López AY, González-López ME, Manríquez-González R, González-Cruz R, Pérez-Fonseca AA, Gómez C, Flores-Cano JV, Robledo-Ortíz JR (2019) Evaluation of the Cr (VI) adsorption performance of xanthate polysaccharides supported onto agave fiber-LDPE foamed composites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230, 1–21.
- Morzck E Jr, Funicelli NA (1982) Effect of lead and on germination of *Spartina alterniflora* Losiel seeds at various salinities. *Environmental and Experimental Botany*, 22(1), 23–32.
- Mourato M, Reis R, Martins LL (2012) Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, 12, 1–17.
- Mozdzer TJ, Zieman JC, McGlathery KJ (2010) Nitrogen uptake by native and invasive temperate coastal macrophytes: importance of dissolved organic nitrogen. *Estuaries and Coasts*, 33, 784–797.
- Mukherji S, Maitra P (1976) Toxic effects of lead growth and metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) seeds mitosis of onion (*Allium cepa*) root tip cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 14, 519–521.
- Mulkeen C, Williams C, Gormally M, Healy M (2017) Seasonal patterns of metals and nutrients in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel in a constructed wetland in the west of Ireland. *Ecological Engineering*, 107, 192–197.
- Mydy LS, Chigumba DN, Kersten RD (2021) Plant copper metalloenzymes as prospects for new metabolism involving aromatic compounds. *Frontiers in Plant Science*, 12, 692108.
- Mykleby PM, Lenters JD, Cutrell GJ, Herrman KS, Istanbuluoglu E, Scott DT, Twine TE, Kucharik CJ, Awada T, Soylu ME (2016) Energy and water balance response of a vegetated wetland to herbicide treatment of invasive *Phragmites australis*. *Journal of Hydrology*, 539, 290–303.
- Nable RO, Houtz, RL, Cheniae GM (1988) Early inhibition of photosynthesis during development of Mn toxicity in tobacco. *Plant Physiology*, 86(4), 1136–1142.
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199–216.

- Nagoor S (1999) Physiological and biochemical responses of cereal seedlings to graded levels of heavy metals. II. Effects on protein metabolism in maize seedlings. *Advances in plant sciences*, 12, 425–433.
- Naing AH, Kim CK (2021) Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711–1723.
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael AJ, Tohge T, Yamazaki M, Saito K (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant Journal*, 77(3), 367–379.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- native plants surrounding the old flotation tailings pond of the Copper Mining and Smelting Complex Bor (Serbia). *Journal of Environmental Monitoring*, 14, 866–877.
- Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 463–470.
- Neelima P, Reddy KJ (2002) Interaction of copper and cadmium with seedlings growth and biochemical responses in *Solanum melongena*. *Nature, Environment and Pollution Technology*, 1(3), 285–290.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249–279.
- Odjegba VJ, Fasidi IO (2007) Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. *The Environmentalist*, 27, 349–355.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7828–7853.
- Ozturk Y, Bicak O, Ekmekci Z (2022) Effects of residual xanthate on flotation efficiency of a Cu-Zn sulfide ore. *Minerals*, 12(3), 279.
- Paivoke H (1983) The short term effect of zinc on growth anatomy and acid phosphate activity of pea seedlings. *Annals of Botany*, 20, 307–309.
- Palma JM, Sandalio LM, Corpas FJ, Romero-Puertas MC, McCarthy I, Del Rio LA (2002) Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 521–530.
- Pan C, Lu H, Yu J, Liu J, Liu Y, Yan C (2019) Identification of Cadmium-responsive *Kandelia obovata* SOD family genes and response to Cd toxicity. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 230–238.
- Pandey N, Sharma CP (2002) Effect of heavy metals  $\text{CO}_2^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4), 753–758.
- Pandey V, Dixit V, Shyam R (2005) Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*, 61(1), 40–47.
- Pandolfini T, Gabbrielli R, Comparini C (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant, Cell & Environment*, 15(6), 719–725.
- Pansu M, Gautheyrou J (2006) Handbook of soil analysis: mineralogical, organic and inorganic methods, Springer Science & Business Media.
- Parr PD, Taylor FG Jr (1982) Germination and growth effects of hexavalent chromium in Orocol TL (a corrosion inhibitor) on *Phaseolus vulgaris*. *Environment International*, 7(3), 197–202.

- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255–265.
- Paunov M, Koleva L, Vassilev A, Vangronsveld J, Goltsev V (2018) Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 787.
- Pawlak S, Firych A, Rymer K, Deckert J (2009) Cu,Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 741–747.
- Pehlivan E, Ozkan A M, Dinc S, Parlayici S (2009) Adsorption of Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> ion on dolomite powder. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 1044–1049.
- Peralta JR, Gardea Torresdey JL, Tiemann KJ, Gomez E, Arteaga S, Rascon E (2001) Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(6), 727.
- Pérez-Sirvent C, Hernández-Pérez C, Martínez-Sánchez MJ, García-Lorenzo ML, Bech J (2017) Metal uptake by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Journal of Soils and Sediments*, 17, 1384–1393.
- Phaenark C, Pokethitiyook P, Kruatrachue M, Ngernsansaruay C (2009) Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng zinc mine area. *International Journal of Phytoremediation*, 11, 479–495.
- Pidlisnyuk VV, Erickson LE, Trögl J, Shapoval PY, Popelka J, Davis LC, Stefanovska RT, Hettiarachchi GM (2018) Metals uptake behaviour in plant during growth at the contaminated soil from the military site in Sliač, Slovakia. *Polish Journal of Chemical Technology*, 20(2), 1–7.
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15–39.
- Piotrowska A, Bajguz A, Godlewska-Żyłkiewicz B, Czerpak R, Kamińska M (2009) Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 507–513.
- Polle A, Otter T, Seifert F (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 53–60.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 537–548.
- Prasad KVS, Saradhi PP, Sharmila P (1999) Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany*, 42(1), 1–10.
- Prasad MNV (2005) Plants that accumulate and/or exclude toxic trace elements play an important role in phytoremediation. In: *Trace Elements in the Environment*, pp. 541–566, CRC Press.
- Prasad MNV, Freitas H (2005) Metal-tolerant plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. In: *Trace Elements in the Environment*, pp. 501–524, CRC Press.
- 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.
- Purakayastha TJ, Viswanath T, Bhadraray S, Chhonkar PK, Adhikari PP, Suribabu K (2008) Phytoextraction of zinc, copper, nickel and lead from a contaminated soil by different species of Brassica. *International Journal of Phytoremediation*, 10(1), 61–72.
- R version 3.5.1, R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rahman H, Sabreen S, Alam S, Kawai S (2005) Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393–404.
- Rainbird B, Bentham RH, Soole KL (2018) Rhizoremediation of residual sulfonylurea herbicides in agricultural soils using *Lens culinaris* and a commercial supplement. *International Journal of Phytoremediation*, 20(2), 104–113.
- Rakić T, Jakovljević K, Sabovljević A, Mišljenović T, Sabovljević M (2021) Metalofite: biologija i primena u fitoremedijaciji, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Ramel F, Birtic S, Cuiñé S, Triantaphylidès C, Ravanat JL, Havaux M (2012) Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology*, 158(3), 1267–1278.
- Randelović D (2015) Geobotanička i biogeohemijska karakterizacija rudničke otkrivke u Boru i mogućnost primene rezultata u remedijaciji (disertacija), Beograd, Univerzitet u Beogradu.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169–181.
- Rasheed R, Iqbal M, Ashraf MA, Hussain I, Shafiq F, Yousaf A, Zaheer A (2017) Glycine betaine counteracts the inhibitory effects of waterlogging on growth, photosynthetic pigments, oxidative defence system, nutrient composition, and fruit quality in tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(4), 385–391.
- Raskin I, Smith RD, Salt D. (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2), 221–226.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012) Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990.
- Reddy AM, Kumar SG, Jyotsnakumari G, Thimmanayak S, Sudhakar C (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.), *Chemosphere*, 60(1), 97–104.
- Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds.), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, pp. 193–229, Wiley, New York.
- Rocha ACS, Almeida CMR, Basto MCP, Vasconcelos MTS (2014) Antioxidant response of *Phragmites australis* to Cu and Cd contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109, 152–160.
- Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sup>2-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant, Cell & Environment*, 27(9), 1122–1134.
- Ros R, Cook DT, Martinez-Cortina C, Picazo I (1992) Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, atpase hydrolytic activity and protonpumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) Shoots. *Journal of Experimental Botany*, 43(11), 1475–1481.
- Ross SM (1994) Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. In: Ross SM (ed.), *Toxic metals in soil-plant systems*, pp. 3–25, Wiley, Chichester.
- Rout GR, Sanghamitra S, Das P (2000) Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and non-tolerant populations of *Echinochloa colona* (L). *Chemosphere*, 40(8), 855–859.
- Rubino FM (2015) Toxicity of Glutathione-Binding Metals: A Review of Targets and Mechanisms. *Toxics*, 3(1), 20–62.
- Rucin'ska R, Sobkowiak R, Gwo'z'dz' EA (2004) Genotoxicity of lead in lupine root cells as evaluated by the comet assay. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 519–528.

- Rzyski P, Niedzielski P, Klimaszyk P, Poniedziałek B (2014) Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and *Phragmites australis* inhabiting a municipal water reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 3199–3212.
- Saadaoui W, Gamboa-Rosales H, Sifuentes-Gallardo C, Durán-Muñoz H, Abrougui K, Mohammadi A, Tarchoun N (2022) Effects of lead, copper and cadmium on bioaccumulation and translocation factors and biosynthesis of photosynthetic pigments in *Vicia faba* L. (Broad Beans) at different stages of growth. *Applied Sciences*, 12(18), 8941.
- Salimpour SI, Khavazi, K, Nadian H, Besharati H, Miransari M (2010) Enhancing phosphorous availability to canola ('*Brassica napus*' L.) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. *Australian Journal of Crop Science*, 4(5), 330–334.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NP, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13(5), 468–474.
- Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 643–648.
- Schat H, Sharma SS, Vooijs R (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 477–482.
- Schmferger MEV (2001) Phytochelatin: complexation of metals and metalloids, studies on the phytochelatin synthase, PhD Thesis, Munich University of Technology (TUM), Munich.
- Schmidt SB, Husted S (2019) The Biochemical Properties of Manganese in Plants. *Plants*, 8(10), 381.
- Schmohl N, Pilling J, Fisahn J, Horst WJ (2000) Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 109(4), 419–427.
- Sengar RS, Gautam M, Sengar RS, Garg, SK, Sengar K, Chaudhary, R (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 196, 73–93.
- Seregin IV, Kozhevnikova AD (2011) Histochemical methods for detection of heavy metals and strontium in the tissues of higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58, 721–727.
- Seregin IV, Shpigun LK, Ivanov VB (2004) Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology*, 51, 525–533.
- Shaheen SM, Abdelrazek MA, Elthoth M, Moghanm FS, Mohamed R, Hamza A, El-Habashi N, Wang J, Rinklebe J (2019) Potentially toxic elements in saltmarsh sediments and common reed (*Phragmites australis*) of Burullus coastal lagoon at North Nile Delta, Egypt: a survey and risk assessment. *Science of The Total Environment*, 649, 1237–1249.
- Shainberg O, Rubin B, Rabinowitch HD, Libal Y, Tel-Or E (2000) Acclimation of beans to oxidative stress by treatment with sublethal iron levels. *Journal of Plant Physiology*, 157(1), 93–99.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31(5), 739–753.
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Pathmanabhan G, Sudhagar R, Avudainayagam S (2004) Uptake and phytoaccumulation of chromium by selected tree species. India.
- Sharma A, Kapoor D, Wang J, Shahzad B, Kumar V, Bali AS, Jasrotia S, Zheng B, Yuan H, Yan D (2020) Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. *Plants*, 9(1), 100.
- Sharma DC, Sharma CP, Tripathi RD (2003) Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere*, 51, 63–68.
- Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 35–52.

- Sharma SS, Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711–726.
- Shi QH, Zhu ZJ, Li J, Qian QQ (2006) Combined effects of excess Mn and low pH on oxidative stress and antioxidant enzymes in cucumber roots. *Agricultural Sciences in China*, 5(10), 767–772.
- Shu X, Yin L, Zhang Q, Wang W (2012) Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 893–902.
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383.
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6), 1315S–1321S.
- Singh H, Kumar D, Soni V (2020) Copper and mercury induced oxidative stresses and antioxidant responses of *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 23, 100781.
- Singh PK, Tewari RK (2003) Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology*, 24(1), 107–112.
- Sinha S, Bhatt K, Pandey K, Singh S, Saxena R (2003) Interactive metal accumulation and its toxic effects under repeated exposure in submerged plant *Najas indica* Cham. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 0696–0704.
- Sinha S, Guptha M, Chandra P (1997) Oxidative Stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (i.f) Royle: response of antioxidants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(3), 286–291.
- Sinha S, Saxena R (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62(8), 1340–1350.
- Siqueira Freitas D, Wurr Rodak B, Rodrigues dos Reis A, De Barros Reis F, Soares de Carvalho T, Schulze J, Carbone Carneiro M, Guimaraes Guilherme LR (2018) Hidden nickel deficiency? Nickel fertilization via soil improves nitrogen metabolism and grain yield in soybean genotypes. *Frontiers in Plant Science*, 9, 614.
- Smirnoff N (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 116–129.
- Sobkowiak R, Rymer K, Rucin'ska R, Deckert J (2004) Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 219–222.
- Soil Survey Division Staff. (1993) Soil Survey Manual, United States Department of Agriculture Handbook 18, Washington.
- Somasekharaiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxidase in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum*, 85(1), 85–89.
- Srivastava J, Kalra SJ, Naraian R (2014) Environmental perspectives of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex. Steudel. *Applied Water Science*, 4(3), 193–202.
- Srivastava S, Mishra S, Dwivedi S, Baghel VS, Verma S, Tandon PK, Rai UN, Tripathi RD (2005) Nickel phytoremediation potential of broad bean, *Vicia faba* L., and its biochemical responses. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74, 715–724.
- Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Gupta DK (2006) Copper-induced stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquatic Toxicology*, 80(4), 405–415.



- Stadtman ER, Oliver CN (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2005–2008.
- Stahl W, Sies H (2003) Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–351.
- Stanković S, Morić I, Pavić A, Vojnović S, Vasiljević B, Cvetković V (2015) Bioleaching of copper from old flotation tailings samples (Copper Mine Bor, Serbia). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 80(3), 391–405.
- StClair SB, Lynch JP (2004) Photosynthetic and antioxidative enzyme responses of sugar maple and red maple seedlings to excess manganese in contrasting light environments. *Functional Plant Biology*, 31, 1005–1014.
- Stiborova M, Pitrichova M, Brezinova A (1987) Effect of heavy metal ions in growth and biochemical characteristic of photosynthesis of barley and maize seedlings. *Biologia Plantarum*, 29, 453–467.
- Stojanović JN, Radosavljević SA, Tošović RD, Pačevski AM, Radosavljević-Mihajlović AS, Kašić VD, Vuković NS (2018) A review of the Pb-Zn-Cu-Ag-Bi-W polymetallic ore from the Rudnik orefield, Central Serbia. *Geoloski anali Balkanskoga poluostrva*, 79(1), 47–69.
- Stoltz E, Greger M (2002) Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 47(3), 271–280.
- Subrahmanyam D, Rathore VS (2001) Influence of Mn toxicity on photosynthesis in ricebean (*Vigna umbellata*) seedlings. *Photosynthetica*, 38(3), 449–453.
- Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzałka K, Prasad MNV (2013) Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 985–999.
- Šesták Z (1963) Changes in the chlorophyll content as related to photosynthetic activity and age of leaves. *Photochemistry and Photobiology*, 2(2), 101–110.
- Taiz L, Zeiger E (2002) Photosynthesis: physiological and ecological considerations. *Plant Physiology*, 9, 172–174.
- Taiz L, Zeiger E (2002) *Plant Physiology*, 3rd ed., Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.
- Takahama U (2004) Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3, 207–219.
- Talbot MJ, White RG (2013) Methanol fixation of plant tissue for scanning electron microscopy improves preservation of tissue morphology and dimensions. *Plant Methods*, 9, 1–7.
- Tang KH, Blankenship RE (2013) Photosynthetic Electron Transport. In: Roberts GCK (ed) *Encyclopedia of Biophysics*, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tang SR, Wilke BM, Brooks RR, Tang SR (2001) Heavy-metal uptake by metal tolerant *Elsholtzia haichowensis* and *Commelina communis* from China. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(5–6), 895–905.
- Teuchies J, Jacobs S, Oosterlee L, Bervoets L, Meire P (2013) Role of plants in metal cycling in a tidal wetland: Implications for phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 445, 146–154.
- Thomas F, Malick C, Endreszl EC, Davies KS (1998) Distinct responses to copper stress in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Physiologia Plantarum*, 102(3), 360–368.
- Tiffin LO (1977) The form and distribution of metals in plants: an overview. In *Biological implications of metals in the environment*, pp. 315–334, TIC, Oak Ridge, TN, CONF-750929.
- Timperio AM, Egidi MG, Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 71(4), 391–411.
- Tong YP, Kneer R, Zhu YG (2004) Vacuolar compartmentalization: a second - generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9(1), 7–9.
- Torres MA (2010) Ros in Biotic Interactions. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 414–429.

- Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, 37(1), 1–13.
- Tripathee R, Schäfer KVR (2015) Above-and belowground biomass allocation in four dominant salt marsh species of the eastern United States. *Wetlands*, 35, 21–30.
- Truu J, Truu M, Espenberg M, Nõlvak H, Juhanson J (2015) Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: a review. *The Open Biotechnology Journal*, 9(1).
- Tuteja N, Singh MB, Misra MK, Bhalla PL, Tuteja R (2001) Molecular mechanisms of DNA damage and repair: Progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 337–397.
- Tyurin IV (1965) Agrochemical methods of soil analysis, Nauka, Moscow
- Uddin MN, Robinson RW (2018) Can nutrient enrichment influence the invasion of *Phragmites australis*? *Science of The Total Environment*, 613, 1449–1459.
- Van Assche F, Cardinaels C, Clijsters H (1988) Induction of enzyme capacity on plants as a result of heavy metal toxicity, dose response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with treated with zinc and cadmium. *Environmental Pollution*, 52(2), 103–115.
- Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell & Environment*, 13(3), 195–206.
- Van den Ende W, Valluru R (2009) Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 9–18.
- Vasile GG, Tenea AG, Dinu C, Iordache AMM, Gheorghe S, Mureseanu M, Pascu LF (2021) Bioavailability, accumulation and distribution of toxic metals (As, Cd, Ni and pb) and their impact on *Sinapis alba* plant nutrient metabolism. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(24), 12947.
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO (2009) Comparative analysis of the contribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 63–67.
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164(4), 645–655.
- Violante AUDN, Cozzolino VUDN, Perelomov LPSU, Caporale AG, Pigna MUDN (2010) Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 268–292.
- Vymazal J (2013) Emergent plants used in free water surface constructed wetlands: a review. *Ecological Engineering*, 61, 582–592.
- Vymazal J, Březinová T (2016) Accumulation of heavy metals in aboveground biomass of *Phragmites australis* in horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment: a review. *Chemical Engineering Journal*, 290, 232–242.
- Vymazal J, Krópfelová L (2005) Growth of *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* in constructed wetlands for wastewater treatment in the Czech Republic. *Ecological Engineering*, 25, 606–621.
- Waheed A, Haxim Y, Islam W, Ahmad M, Ali S, Wen X, Khan KA, Ghramh HA, Zhang Z, Zhang D (2022) Impact of cadmium stress on growth and physio-biochemical attributes of *Eruca sativa* Mill. *Plants*, 2022, 11(21), 2981.
- Wan X, Lei M, Yang J (2017) Two potential multi-metal hyperaccumulators found in four mining sites in Hunan Province, China. *Catena*, 148, 67–73.
- Warne MS, Heemsbergen D, Stevens D, McLaughlin M, Cozens G, Whatmuff M, Broos K, Barry G, Bell M, Nash D, Pritchard D, Penney N (2008) Modeling the toxicity of copper and zinc salts to wheat in 14 soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(4), 786–792.
- Wei B, Yu J, Cao Z, Meng M, Yang L, Chen Q (2020) The availability and accumulation of heavy metals in greenhouse soils associated with intensive fertilizer application. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 5359.

- Welinder KG & Gajhede M (1993) In: Welinder KG, Rasmussen SK, Penel C, Greppin H (eds.). *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, pp. 35–42, University of Geneva, Geneva.
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313.
- Wiersma D, Van Goor BJ (1979) Chemical forms of nickel and cobalt in phloem of *Ricinus communis*. *Physiologia Plantarum*, 45(4), 440–442.
- Wingler A (2002) The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry*, 60(5), 437–440.
- Winska-Krysiak M, Koropacka K, Gawronski S (2015) Determination of the tolerance of sunflower to lead-induced stress. *Journal of Elementology*, 20(2).
- Wojcik M, Tukiendorf A (2004) Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 44(1), 71–80.
- Wu S (1994) Effect of manganese excess on the soybean plant cultivated under various growth conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 17(6), 993–1003.
- Xie QE, Yan XL, Liao XY, Li X (2009) The arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* L. *Environmental Science & Technology*, 43(22), 8488–8495.
- Xu F, Deng J (2012) Effects of salicylic acid on germination of soybean seed under chromium stress. *Soybean Science*, 31, 852–854.
- Yamakura F, Kobayashi K, Ue H, Konno M (1995) The pH-dependent changes of the enzymic activity and spectroscopic properties of iron-substituted manganese superoxide dismutase. A study on the metal-specific activity of Mn-containing superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 227(3), 700–706.
- Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ (2006) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368(2–3), 456–464.
- Yu J, Wang X, Ning K, Li Y, Wu H, Fu Y, Zhou D, Guan B, Lin Q (2012) Effects of salinity and water depth on germination of *Phragmites australis* in coastal wetland of the Yellow River Delta. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 40(10), 1154–1158.
- Yuan M, He H, Xiao L, Zhong T, Liu H, Li S, Deng P, Ye Z, Jing Y (2014) Enhancement of Cd phytoextraction by two *Amaranthus* species with endophytic *Rhizobium* sp. JN27. *Chemosphere*, 103, 99–104.
- Zahra N, Hafeez MB, Shaikat K, Wahid A, Hasanuzzaman M (2021) Fe toxicity in plants: Impacts and remediation. *Physiologia Plantarum*, 173(1), 201–222.
- Zeid IM (2001) Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments. *Biologia Plantarum*, 44, 111–115.
- Zhang FL, Niu B, Wang YC, Chen F, Wang SH, Xu Y, Jiang LD, Gao S, Wu J, Tang L, Jia, YJ (2008) A novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science*, 174(5), 510–518.
- Zhang FQ, Wang YS, Lou ZP, Dong JD (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere*, 67, 44–50.
- Zhang M, Smith JAC, Harberd NP, Jiang C (2016) The regulatory roles of ethylene and reactive oxygen species (ROS) in plant salt stress responses. *Plant Molecular Biology*, 91, 651–659.
- Zhang S, Chen H, He D, He X, Yan Y, Wu K, Wei H (2020) Effects of exogenous organic acids on Cd tolerance mechanism of *Salix variegata* Franch. under Cd stress. *Frontiers in Plant Science*, 11, 594352.
- Zhang ZC, Gao X, Qiu BS (2008) Detection of phytochelatin in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* exposed to cadmium and lead. *Phytochemistry*, 69(4), 911–918.
- Zhao H, Wu L, Chai T, Zhang Y, Tan J, Ma S (2012) The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology*, 169(13), 1243–1252.

Zhao Y, Xia X, Yang Z (2013) Growth and nutrient accumulation of *Phragmites australis* in relation to water level variation and nutrient loadings in a shallow lake. *Journal of Environmental Sciences*, 25(1), 16–25.

## 8. PRILOZI

Prilog 1. Koncentracije metala u različitim biljnim delovima *Phragmites australis* u junu 2018. godine ( $M \pm SD$ , mg  $kg^{-1}$ ). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

JUN 2018.	Deo biljke	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
Carska bara	koren	1289 ± 94 <sup>a</sup>	127,0 ± 23,5 <sup>a</sup>	12,3 ± 4,3 <sup>c</sup>	55,3 ± 2,7 <sup>a</sup>	5,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,6 ± 1,7 <sup>b</sup>	8,4 ± 1,7 <sup>b</sup>
	rizom	42,3 ± 8,5 <sup>b</sup>	18,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,5 ± 2,0 <sup>b</sup>	15,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	1,3 ± 0,7 <sup>a</sup>
	stablo	292 ± 4 <sup>d</sup>	26,2 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>bc</sup>	23,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	5,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	6,1 ± 2,1 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>
	list	15,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	108 ± 4 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>	20,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	8,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	5,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>
Bor 1	koren	2856 ± 153 <sup>b</sup>	356 ± 85 <sup>d</sup>	6,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	327 ± 7 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>	1004 ± 32 <sup>c</sup>	4,1 ± 0,3 <sup>c</sup>	27,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>
	rizom	18,5 ± 6,9 <sup>a</sup>	23,0 ± 1,8 <sup>bc</sup>	3,3 ± 1,7 <sup>ab</sup>	21,1 ± 4,6 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>	45,3 ± 4,2 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>	7,0 ± 0,7 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>
	stablo	7,3 ± 1,6 <sup>a</sup>	19,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>	77,5 ± 2,6 <sup>c</sup>	<LDL <sup>ab</sup>	18,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,7 <sup>b</sup>
	list	21,5 ± 3,5 <sup>b</sup>	172 ± 3 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,0 <sup>c</sup>	37,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	1,7 ± 1,2 <sup>ac</sup>	16,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	4,1 ± 0,6 <sup>ab</sup>	1,8 ± 0,4 <sup>b</sup>
Bor 2	koren	5291 ± 387 <sup>c</sup>	146 ± 13 <sup>b</sup>	<LDL <sup>a</sup>	296 ± 1 <sup>b</sup>	11,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	590 ± 31 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,1 ± 1,0 <sup>b</sup>
	rizom	179 ± 40 <sup>c</sup>	22,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	32,6 ± 3,5 <sup>c</sup>	2,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	42,0 ± 4,0 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	6,6 ± 1,9 <sup>c</sup>
	stablo	39,8 ± 8,6 <sup>c</sup>	16,0 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	41,8 ± 6,6 <sup>b</sup>	<LDL <sup>b</sup>	39,9 ± 0,2 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	3,7 ± 1,3 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,3 <sup>c</sup>
	list	30,1 ± 2,7 <sup>c</sup>	81,2 ± 4,0 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	58,0 ± 3,6 <sup>d</sup>	2,0 ± 1,0 <sup>ac</sup>	52,9 ± 1,7 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	5,6 ± 2,6 <sup>b</sup>	7,0 ± 2,6 <sup>c</sup>
Rudnik	koren	1744 ± 42 <sup>b</sup>	204 ± 1 <sup>c</sup>	61,8 ± 0,5 <sup>d</sup>	570 ± 8 <sup>d</sup>	67,1 ± 2,0 <sup>c</sup>	1017 ± 33 <sup>d</sup>	15,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	14,1 ± 1,9 <sup>c</sup>	28,4 ± 5,0 <sup>c</sup>
	rizom	50,0 ± 6,8 <sup>b</sup>	20,0 ± 1,8 <sup>ab</sup>	7,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	33,4 ± 1,1 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	20,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>c</sup>	5,6 ± 1,3 <sup>bc</sup>	2,7 ± 0,4 <sup>b</sup>
	stablo	13,4 ± 3,0 <sup>b</sup>	28,6 ± 4,6 <sup>c</sup>	6,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	101 ± 15 <sup>d</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>c</sup>	18,1 ± 1,6 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>d</sup>	4,4 ± 2,4 <sup>a</sup>	2,8 ± 1,6 <sup>bc</sup>
	list	23,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	204 ± 10 <sup>d</sup>	2,3 ± 0,4 <sup>bc</sup>	28,9 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,4 <sup>bc</sup>	14,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>bc</sup>	2,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,0 <sup>c</sup>

Prilog 2. Koncentracija metala u različitim biljnim delovima *Phragmites australis* u septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ ,  $mg\ kg^{-1}$ ). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

SEPTEMBAR 2018.	Deo biljke	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
Carska bara	koren	11790 ± 722 <sup>c</sup>	879 ± 45 <sup>c</sup>	10,4 ± 3,0 <sup>b</sup>	45,8 ± 5,4 <sup>a</sup>	5,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	31,5 ± 1,4 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	12,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,9 <sup>a</sup>
	rizom	43,2 ± 18,4 <sup>a</sup>	44,8 ± 4,8 <sup>c</sup>	4,4 ± 2,6 <sup>ab</sup>	5,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,6 ± 2,7 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	7,8 ± 2,8 <sup>a</sup>	9,6 ± 1,8 <sup>b</sup>
	stablo	19,7 ± 10,5 <sup>b</sup>	51,5 ± 6,0 <sup>c</sup>	6,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	20,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	8,5 ± 1,3 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	4,9 ± 2,4 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,9 <sup>b</sup>
	list	55,0 ± 9,7 <sup>a</sup>	313 ± 12 <sup>c</sup>	5,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	17,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	6,1 ± 3,5 <sup>a</sup>	11,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	<LDL <sup>a</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	16,1 ± 3,5 <sup>b</sup>
Bor 1	koren	4676 ± 80 <sup>a</sup>	2612 ± 234 <sup>d</sup>	12,2 ± 3,0 <sup>b</sup>	148 ± 14 <sup>c</sup>	22,1 ± 1,6 <sup>b</sup>	2228 ± 318 <sup>d</sup>	5,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	60,4 ± 5,3 <sup>d</sup>	14,6 ± 0,5 <sup>b</sup>
	rizom	402 ± 9 <sup>b</sup>	35,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	16,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	26,6 ± 0,4 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>	8,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	12,8 ± 0,6 <sup>c</sup>
	stablo	65,7 ± 33,8 <sup>c</sup>	71,8 ± 6,4 <sup>d</sup>	1,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	50,3 ± 2,5 <sup>c</sup>	10,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	12,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	9,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	12,4 ± 0,9 <sup>c</sup>
	list	191 ± 47 <sup>b</sup>	389 ± 5 <sup>d</sup>	3,4 ± 1,6 <sup>a</sup>	30,7 ± 5,6 <sup>b</sup>	16,2 ± 4,8 <sup>b</sup>	14,4 ± 2,1 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	13,0 ± 2,7 <sup>b</sup>	15,2 ± 4,1 <sup>b</sup>
Bor 2	koren	12085 ± 150 <sup>c</sup>	176 ± 1 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	85,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	32,0 ± 1,7 <sup>c</sup>	543 ± 4 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	21,2 ± 4,0 <sup>b</sup>	12,9 ± 2,4 <sup>b</sup>
	rizom	917 ± 147 <sup>d</sup>	29,5 ± 1 <sup>a</sup>	6,3 ± 1,5 <sup>b</sup>	30,9 ± 3,0 <sup>c</sup>	23,2 ± 2,1 <sup>d</sup>	33,0 ± 1,2 <sup>d</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	11,2 ± 0,7 <sup>b</sup>	13,1 ± 3,1 <sup>b</sup>
	stablo	7,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	38,2 ± 3,3 <sup>a</sup>	5,5 ± 1,8 <sup>bc</sup>	38,6 ± 4,8 <sup>b</sup>	22,2 ± 3,9 <sup>d</sup>	34,5 ± 0,7 <sup>d</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>c</sup>	17,0 ± 0,2 <sup>d</sup>	14,8 ± 0,6 <sup>d</sup>
	list	162 ± 4 <sup>b</sup>	243 ± 42 <sup>b</sup>	9,5 ± 0,7 <sup>b</sup>	46,8 ± 7,4 <sup>c</sup>	26,0 ± 3,8 <sup>c</sup>	62,5 ± 10,6 <sup>d</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>c</sup>	18,0 ± 3,1 <sup>b</sup>	17,3 ± 1,9 <sup>b</sup>
Rudnik	koren	9961 ± 233 <sup>b</sup>	411 ± 22 <sup>b</sup>	32,0 ± 2,7 <sup>c</sup>	246 ± 12 <sup>d</sup>	312 ± 19 <sup>d</sup>	702 ± 100 <sup>c</sup>	6,6 ± 0,5 <sup>c</sup>	35,6 ± 3,4 <sup>c</sup>	17,2 ± 3,5 <sup>b</sup>
	rizom	476 ± 24 <sup>c</sup>	46,5 ± 1,5 <sup>c</sup>	6,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	49,0 ± 0,3 <sup>d</sup>	15,9 ± 3,2 <sup>c</sup>	19,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	16,6 ± 0,2 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
	stablo	186 ± 22 <sup>d</sup>	43,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	5,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	66,8 ± 11,1 <sup>d</sup>	13,9 ± 0,9 <sup>c</sup>	15,5 ± 0,0 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>	13,6 ± 2,8 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
	list	157 ± 32 <sup>b</sup>	187 ± 4 <sup>a</sup>	9,2 ± 1,6 <sup>b</sup>	33,9 ± 3,4 <sup>b</sup>	14,1 ± 5,5 <sup>b</sup>	17,5 ± 0,4 <sup>c</sup>	<LDL <sup>a</sup>	20,1 ± 4,6 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>a</sup>

Prilog 3. Koncentracije (%) ispitivanih elemenata u korenu, rizomu, stablu i listu *Phragmites australis* sa flotacionog odlagališta jalovine „Rudnik” detektovane EDS-om.

Element	Koren (epidermis, egzodermis i deo primarne kore)	Koren (centralni cilindar)	Rizom	Stablo	List
Fe	0,21	0,58	0,91	0,42	-
Pb	1,45	1,71	-	2,53	1,73
Zn	0,15	0,36	-	-	0,14
Cu	0,45	0,17	-	-	-

Prilog 4. Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listu (Chl *a*, Chl *b*, Tot Carot, Chl (*a+b*), Chl *a/b*) *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , mg kg<sup>-1</sup>). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Lokalitet	Period uzorkovanja	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Tot Carot	Chl( <i>a+b</i> )	Chl( <i>a/b</i> )
Carska bara	jun	6,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	6,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,5 <sup>a</sup>
	septembar	6,4 ± 2,2 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	7,4 ± 1,9 <sup>a</sup>	9,1 ± 1,3 <sup>b</sup>
Bor 1	jun	8,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,2 ± 1,1 <sup>b</sup>	10,5 ± 1,0 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,2 <sup>ab</sup>
	septembar	8,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	8,5 ± 0,7 <sup>b</sup>
Bor 2	jun	5,4 ± 1,3 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	6,1 ± 1,6 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>b</sup>
	septembar	4,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	5,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	10,4 ± 5,8 <sup>a</sup>
Rudnik	jun	6,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>	5,0 ± 1,2 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,4 <sup>ab</sup>
	septembar	11,5 ± 2,0 <sup>c</sup>	1,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	13,9 ± 2,0 <sup>c</sup>	6,5 ± 0,4 <sup>a</sup>

Prilog 5. Koncentracije fenola (slobodnih, vezanih, ukupnih) u listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , mg kg<sup>-1</sup>). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Lokalitet	Period uzorkovanja	Slobodni fenoli	Vezani fenoli	Ukupni fenoli
Carska bara	jun	1,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,2 <sup>c</sup>
	septembar	1,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Bor 1	jun	0,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,3 <sup>ab</sup>
	septembar	2,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
Bor 2	jun	0,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
	septembar	1,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,6 <sup>a</sup>
Rudnik	jun	1,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,6 <sup>bc</sup>
	septembar	1,2 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,7 <sup>a</sup>

Prilog 6. Ukupan antioksidativni kapacitet (TAC) u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , %). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann–Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Lokalitet	Period uzorkovanja	TAC	
		koren	list
Carska bara	jun	45,7 ± 5,4 <sup>a</sup>	88,4 ± 6,7 <sup>ab</sup>
	septembar	68,8 ± 12,6 <sup>b</sup>	91,2 ± 0,5 <sup>b</sup>
Bor 1	jun	54,2 ± 3,2 <sup>a</sup>	91,8 ± 0,9 <sup>b</sup>
	septembar	47,8 ± 6,6 <sup>ab</sup>	90,9 ± 2,8 <sup>b</sup>
Bor 2	jun	79,3 ± 8,0 <sup>b</sup>	90,4 ± 1,3 <sup>b</sup>
	septembar	47,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	92,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
Rudnik	jun	77,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	83,3 ± 5,5 <sup>a</sup>
	septembar	50,0 ± 4,6 <sup>a</sup>	86,0 ± 1,9 <sup>a</sup>

Prilog 7. Koncentracija MDA u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , mg kg<sup>-1</sup>). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann–Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Lokalitet	Period uzorkovanja	MDA	
		koren	list
Carska bara	jun	7,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	37,2 ± 9,4 <sup>b</sup>
	septembar	5,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	7,6 ± 4,5 <sup>a</sup>
Bor 1	jun	8,9 ± 1,5 <sup>ab</sup>	15,8 ± 4,9 <sup>a</sup>
	septembar	5,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	10,4 ± 1,2 <sup>a</sup>
Bor 2	jun	10,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	11,3 ± 3,6 <sup>a</sup>
	septembar	14,1 ± 3,4 <sup>b</sup>	9,5 ± 3,0 <sup>a</sup>
Rudnik	jun	9,8 ± 3,6 <sup>ab</sup>	30,1 ± 11,0 <sup>b</sup>
	septembar	13,0 ± 1,4 <sup>b</sup>	14,6 ± 7,9 <sup>a</sup>

Prilog 8. Koncentracija proteina u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , mg kg<sup>-1</sup>). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann–Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Lokalitet	Period uzorkovanja	Proteini	
		koren	list
Carska bara	jun	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
	septembar	0,20 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Bor 1	jun	0,80 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>a</sup>
	septembar	0,40 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Bor 2	jun	0,60 ± 0,16 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
	septembar	0,55 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,0 <sup>a</sup>
Rudnik	jun	0,78 ± 0,28 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
	septembar	0,65 ± 0,10 <sup>c</sup>	1,1 ± 0,0 <sup>a</sup>



Prilog 9. Aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT, APX, POD, GR) u korenu i listu *Phragmites australis* u junu i septembru 2018. godine ( $M \pm SD$ , U  $\text{mg}^{-1}$  protein). Statistički značajne vrednosti koncentracija među lokalitetima prikazane su različitim slovima prema Mann-Whitney U testu ( $p < 0,05$ ).

Enzim	Deo biljke	Carska bara		Bor 1		Bor 2		Rudnik	
		jun	septembar	jun	septembar	jun	septembar	jun	septembar
SOD	koren	6,66 ± 0,14 <sup>bc</sup>	10,22 ± 1,78 <sup>c</sup>	4,0 ± 0,13 <sup>b</sup>	11,06 ± 1,03 <sup>c</sup>	3,48 ± 0,48 <sup>a</sup>	4,66 ± 0,16 <sup>a</sup>	4,32 ± 0,08 <sup>c</sup>	5,75 ± 0,80 <sup>b</sup>
	list	1,98 ± 0,73 <sup>ab</sup>	1,57 ± 0,28 <sup>b</sup>	2,81 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,53 ± 1,95 <sup>b</sup>	3,44 ± 0,31 <sup>c</sup>	0,83 ± 0,26 <sup>a</sup>	1,94 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,48 <sup>ab</sup>
CAT	koren	1,87 ± 0,29 <sup>b</sup>	5,46 ± 0,41 <sup>d</sup>	0,49 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,15 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,08 <sup>a</sup>
	list	6,36 ± 0,82 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,41 <sup>b</sup>	9,92 ± 0,95 <sup>b</sup>	9,59 ± 0,53 <sup>c</sup>	6,57 ± 1,26 <sup>a</sup>	5,18 ± 1,14 <sup>a</sup>	8,71 ± 1,52 <sup>ab</sup>	8,46 ± 1,69 <sup>bc</sup>
APX	koren	0,45 ± 0,18 <sup>bc</sup>	1,36 ± 0,75 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,11 ± 0,03 <sup>a</sup>
	list	4,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,20 <sup>b</sup>	6,32 ± 0,99 <sup>b</sup>	7,59 ± 0,60 <sup>c</sup>	4,68 ± 1,02 <sup>a</sup>	3,81 ± 0,79 <sup>a</sup>	5,41 ± 1,46 <sup>ab</sup>	6,84 ± 1,47 <sup>bc</sup>
POD	koren	18,24 ± 5,31 <sup>d</sup>	35,50 ± 12,83 <sup>c</sup>	12,01 ± 1,44 <sup>c</sup>	21,85 ± 8,80 <sup>bc</sup>	2,54 ± 0,13 <sup>a</sup>	21,39 ± 3,36 <sup>b</sup>	6,22 ± 2,07 <sup>b</sup>	9,96 ± 1,89 <sup>a</sup>
	list	2,72 ± 2,18 <sup>a</sup>	2,89 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,44 ± 0,85 <sup>a</sup>	3,57 ± 0,65 <sup>b</sup>	3,84 ± 1,2 <sup>a</sup>	5,27 ± 1,24 <sup>bc</sup>	6,98 ± 0,69 <sup>b</sup>	8,29 ± 2,44 <sup>c</sup>
GR	koren	0,36 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,04 <sup>a</sup>
	list	0,22 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,24 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,0 <sup>bc</sup>	0,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,0 <sup>c</sup>

Prilog 10. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, POD, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u korenu trske u junu 2018. godine. ( $p < 0,05$ ).

	LP	TAC	Proteini	APX	POD	CAT	GR	SOD	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
LP	1,000																
TAC	0,392	1,000															
Proteini	<b>0,790</b>	0,531	1,000														
APX	-0,399	<b>-0,783</b>	-0,357	1,000													
POD	<b>-0,587</b>	<b>-0,811</b>	-0,573	<b>0,776</b>	1,000												
CAT	-0,469	<b>-0,846</b>	-0,503	<b>0,902</b>	<b>0,881</b>	1,000											
GR	-0,266	-0,098	-0,056	0,483	0,231	0,315	1,000										
SOD	-0,133	-0,392	-0,336	0,056	0,441	0,231	<b>-0,580</b>	1,000									
Fe	0,503	<b>0,629</b>	<b>0,734</b>	-0,469	<b>-0,734</b>	<b>-0,587</b>	0,147	<b>-0,601</b>	1,000								
Mn	0,469	0,266	0,503	-0,476	-0,252	-0,357	-0,399	0,063	0,280	1,000							
Ni	-0,366	-0,134	-0,416	-0,042	0,416	0,162	-0,521	<b>0,641</b>	<b>-0,746</b>	0,141	1,000						
Zn	0,133	<b>0,678</b>	0,413	<b>-0,615</b>	-0,434	<b>-0,594</b>	-0,469	0,140	0,259	0,462	0,380	1,000					
Pb	0,231	<b>0,758</b>	0,125	<b>-0,812</b>	-0,573	<b>-0,669</b>	-0,520	0,053	0,117	0,249	0,394	<b>0,619</b>	1,000				
Cu	0,238	0,413	0,483	-0,434	-0,294	-0,434	-0,427	0,175	0,224	0,559	0,268	<b>0,867</b>	0,278	1,000			
Cd	0,350	0,476	0,497	<b>-0,608</b>	-0,385	-0,559	<b>-0,622</b>	0,182	0,217	<b>0,769</b>	0,366	<b>0,860</b>	0,473	<b>0,909</b>	1,000		
Co	-0,140	-0,266	0,140	0,196	0,396	0,238	-0,207	0,340	-0,193	0,459	0,395	0,424	-0,300	<b>0,711</b>	<b>0,592</b>	1,000	
Cr	0,042	0,303	-0,275	-0,437	-0,310	-0,408	-0,563	0,296	-0,387	-0,049	0,546	0,296	<b>0,713</b>	0,056	0,232	-0,310	1,000

Prilog 11. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), sadržaj hlorofila *a* i *b*, ukupnih karotenoida (Tot Carot), Chl (*a+b*), Chl (*a/b*), ukupnih fenola (Tot Ph), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, POD, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u listu trske u junu 2018. godine. ( $p < 0,05$ ).

	LP	TAC	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Tot Carot	Chl ( <i>a+b</i> )	Chl ( <i>a/b</i> )	Tot Ph	Proteini	APX	POD	CAT	GR	SOD
LP	1,000													
TAC	-0,189	1,000												
Chl <i>a</i>	-0,056	0,126	1,000											
Chl <i>b</i>	0,133	0,000	<b>0,923</b>	1,000										
Tot Carot	0,000	0,357	<b>0,734</b>	<b>0,706</b>	1,000									
Chl ( <i>a+b</i> )	-0,077	0,259	<b>0,909</b>	<b>0,706</b>	<b>0,643</b>	1,000								
Chl ( <i>a/b</i> )	<b>-0,594</b>	0,105	0,063	-0,210	-0,140	0,217	1,000							
Tot Ph	<b>0,720</b>	-0,315	-0,266	-0,056	-0,315	-0,301	<b>-0,587</b>	1,000						
Proteini	0,161	0,154	<b>-0,608</b>	<b>-0,587</b>	-0,350	-0,552	0,098	0,042	1,000					
APX	-0,098	-0,217	0,503	0,336	0,231	<b>0,594</b>	0,427	-0,301	-0,524	1,000				
POD	0,154	-0,350	0,077	-0,007	-0,203	0,231	0,301	0,287	-0,406	<b>0,706</b>	1,000			
CAT	-0,091	0,007	0,503	0,308	0,259	<b>0,643</b>	0,483	-0,245	-0,503	<b>0,951</b>	<b>0,762</b>	1,000		
GR	0,371	<b>0,601</b>	-0,077	-0,091	0,336	0,105	-0,427	0,126	0,105	-0,168	-0,091	-0,021	1,000	
SOD	<b>-0,671</b>	0,378	-0,042	-0,182	-0,161	0,070	0,427	<b>-0,643</b>	0,028	-0,063	-0,210	-0,035	0,014	1,000
Fe	<b>-0,587</b>	-0,189	-0,364	-0,476	-0,399	-0,245	0,399	-0,434	-0,014	0,063	0,133	0,007	-0,133	<b>0,699</b>
Mn	0,497	-0,231	0,154	0,147	0,266	0,266	-0,147	0,420	-0,210	0,490	<b>0,699</b>	0,538	0,371	-0,531
Ni	0,238	-0,210	0,463	0,552	0,491	0,367	-0,238	0,160	-0,509	<b>0,630</b>	0,498	<b>0,594</b>	0,121	-0,420
Zn	<b>-0,867</b>	0,007	-0,035	-0,126	-0,105	-0,063	0,524	<b>-0,685</b>	-0,175	0,175	-0,007	0,133	-0,336	0,762
Pb	-0,101	-0,211	-0,187	-0,148	0,140	-0,257	0,359	-0,179	0,226	0,242	0,265	0,234	-0,117	-0,140
Cu	<b>-0,783</b>	0,105	-0,077	-0,210	-0,133	-0,007	0,483	<b>-0,671</b>	-0,147	0,133	0,007	0,119	-0,112	<b>0,874</b>
Cd	<b>-0,782</b>	0,021	-0,063	-0,141	-0,099	-0,099	<b>0,669</b>	<b>-0,606</b>	-0,035	0,211	0,120	0,218	-0,380	<b>0,641</b>
Co	-0,252	0,028	-0,294	-0,140	-0,189	-0,524	-0,007	-0,182	<b>0,587</b>	<b>-0,636</b>	<b>-0,741</b>	<b>-0,713</b>	-0,371	0,238
Cr	-0,535	-0,366	-0,479	-0,542	-0,514	-0,394	0,416	-0,246	0,070	0,049	0,254	-0,014	-0,289	0,528

Prilog 11. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), sadržaj hlorofila *a* i *b*, ukupnih karotenoida (Tot Carot), Chl (*a+b*), Chl (*a/b*), ukupnih fenola (Tot Ph), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, POD, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u listu trske u junu 2018. godine. ( $p < 0,05$ ). \*nastavak

	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
Fe	1,000								
Mn	-0,175	1,000							
Ni	-0,306	<b>0,705</b>	1,000						
Zn	<b>0,797</b>	-0,378	-0,107	1,000					
Pb	0,218	0,382	0,329	0,296	1,000				
Cu	<b>0,895</b>	-0,322	-0,214	<b>0,944</b>	0,172	1,000			
Cd	<b>0,683</b>	-0,246	-0,039	<b>0,930</b>	0,542	<b>0,831</b>	1,000		
Co	0,021	<b>-0,720</b>	-0,463	0,238	0,086	0,098	0,268	1,000	
Cr	<b>0,937</b>	-0,070	-0,215	<b>0,746</b>	0,385	<b>0,775</b>	<b>0,716</b>	0,092	1,000

Prilog 12. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, GPX, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u korenu trske u septembru 2018. godine. ( $p < 0,05$ )

	LP	TAC	Proteini	APX	POD	CAT	GR	SOD	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
LP	1,000																
TAC	-0,119	1,000															
Proteini	<b>0,599</b>	-0,315	1,000														
APX	<b>-0,762</b>	0,315	<b>-0,921</b>	1,000													
POD	-0,308	0,182	<b>-0,753</b>	<b>0,657</b>	1,000												
CAT	<b>-0,657</b>	0,392	<b>-0,932</b>	<b>0,965</b>	<b>0,748</b>	1,000											
GR	-0,070	0,483	-0,539	0,524	0,315	<b>0,608</b>	1,000										
SOD	<b>-0,755</b>	0,238	-0,560	<b>0,671</b>	0,259	<b>0,678</b>	0,259	1,000									
Fe	0,287	0,322	-0,063	0,021	0,406	0,056	0,070	-0,503	1,000								
Mn	<b>-0,825</b>	0,049	-0,490	0,538	0,280	0,517	-0,112	<b>0,860</b>	-0,552	1,000							
Ni	0,070	0,203	0,445	-0,448	<b>-0,622</b>	-0,455	-0,371	0,224	-0,413	0,238	1,000						
Zn	0,266	-0,413	<b>0,760</b>	<b>-0,762</b>	<b>-0,748</b>	<b>-0,804</b>	<b>-0,678</b>	-0,147	-0,552	0,056	<b>0,741</b>	1,000					
Pb	<b>0,755</b>	-0,315	<b>0,862</b>	<b>-0,916</b>	<b>-0,811</b>	<b>-0,923</b>	-0,364	<b>-0,636</b>	-0,175	<b>-0,594</b>	0,420	<b>0,727</b>	1,000				
Cu	-0,091	-0,538	0,434	-0,406	-0,455	-0,427	<b>-0,636</b>	0,168	<b>-0,741</b>	0,434	0,490	<b>0,811</b>	0,350	1,000			
Cd	0,242	-0,536	<b>0,635</b>	<b>-0,669</b>	<b>-0,630</b>	<b>-0,708</b>	<b>-0,620</b>	-0,133	<b>-0,658</b>	0,109	0,546	<b>0,928</b>	<b>0,690</b>	<b>0,823</b>	1,000		
Co	-0,021	-0,552	0,399	-0,392	-0,441	-0,399	<b>-0,580</b>	0,182	<b>-0,769</b>	0,406	0,462	<b>0,783</b>	0,378	<b>0,972</b>	<b>0,851</b>	1,000	
Cr	0,448	-0,510	<b>0,585</b>	<b>-0,692</b>	-0,566	<b>-0,692</b>	<b>-0,650</b>	-0,245	-0,441	-0,056	0,490	<b>0,804</b>	<b>0,727</b>	<b>0,699</b>	<b>0,872</b>	<b>0,783</b>	1,000

Prilog 13. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), sadržaj hlorofila *a* i *b*, ukupnih karotenoida (Tot Carot), Chl (*a+b*), Chl (*a/b*), ukupnih fenola (Tot Ph), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, GPX, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u listu trske u septembru 2018. godine. ( $p < 0,05$ )

	LP	TAC	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Tot Carot	Chl ( <i>a+b</i> )	Chl ( <i>a/b</i> )	Tot Ph	Proteini	APX	POD	CAT	GR	SOD
LP	1,000													
TAC	-0,098	1,000												
Chl <i>a</i>	0,315	<b>-0,699</b>	1,000											
Chl <i>b</i>	0,294	<b>-0,664</b>	<b>0,748</b>	1,000										
Tot Carot	-0,105	0,140	0,028	-0,350	1,000									
Chl ( <i>a+b</i> )	0,322	<b>-0,713</b>	<b>0,993</b>	<b>0,783</b>	-0,021	1,000								
Chl ( <i>a/b</i> )	-0,063	0,182	-0,168	-0,049	-0,343	-0,098	1,000							
Tot Ph	0,007	0,028	0,028	-0,329	0,273	-0,014	-0,028	1,000						
Proteini	0,119	-0,545	0,469	0,154	0,545	0,434	<b>-0,608</b>	0,084	1,000					
APX	0,406	-0,469	0,566	<b>0,636</b>	-0,196	<b>0,587</b>	0,336	0,224	-0,070	1,000				
POD	0,364	-0,441	0,476	0,420	0,245	0,434	<b>-0,853</b>	0,021	<b>0,713</b>	0,098	1,000			
CAT	0,385	-0,329	0,531	<b>0,643</b>	-0,322	0,559	0,441	0,217	-0,252	<b>0,958</b>	-0,035	1,000		
GR	0,056	-0,343	0,371	0,364	0,112	0,308	<b>-0,706</b>	-0,413	0,510	-0,154	<b>0,664</b>	-0,238	1,000	
SOD	0,146	0,071	-0,374	0,050	-0,477	-0,306	0,477	-0,445	-0,224	-0,071	-0,331	-0,021	-0,142	1,000
Fe	-0,056	-0,140	0,294	0,021	0,196	0,266	-0,497	0,063	0,238	-0,049	0,399	-0,133	0,126	<b>-0,776</b>
Mn	-0,154	0,448	-0,273	-0,245	-0,168	-0,238	<b>0,727</b>	0,392	<b>-0,706</b>	0,322	<b>-0,699</b>	0,448	<b>-0,860</b>	-0,043
Ni	0,063	-0,175	0,000	0,028	0,049	-0,035	<b>-0,776</b>	-0,490	0,434	-0,531	<b>0,594</b>	<b>-0,636</b>	<b>0,755</b>	-0,068
Zn	0,077	0,112	-0,007	-0,154	0,154	-0,070	<b>-0,846</b>	-0,084	0,294	-0,448	<b>0,622</b>	-0,510	0,524	-0,498
Pb	-0,098	0,280	-0,175	-0,315	0,182	-0,238	<b>-0,692</b>	-0,014	0,112	-0,434	0,413	-0,490	0,322	-0,569
Cu	0,168	0,084	0,021	-0,105	0,210	-0,042	<b>-0,881</b>	-0,126	0,385	-0,420	<b>0,713</b>	-0,503	<b>0,608</b>	-0,413
Cd	-0,071	<b>0,593</b>	-0,396	-0,552	0,123	-0,444	-0,396	0,299	-0,172	-0,403	0,127	-0,377	-0,119	-0,473
Co	0,287	-0,231	0,357	0,252	0,077	0,336	<b>-0,720</b>	-0,364	0,448	-0,196	<b>0,706</b>	-0,287	0,559	-0,381
Cr	-0,238	0,469	<b>-0,587</b>	<b>-0,622</b>	-0,273	-0,552	0,301	0,259	-0,406	-0,455	-0,517	-0,343	<b>-0,699</b>	0,153

Prilog 13. Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) za stepen lipidne peroksidacije membrana (LP), ukupan antioksidativni kapacitet (TAC), sadržaj hlorofila *a* i *b*, ukupnih karotenoida (Tot Carot), Chl (*a+b*), Chl (*a/b*), ukupnih fenola (Tot Ph), aktivnost antioksidativnih enzima (APX, GPX, CAT, GR, SOD) i koncentracije metala u listu trske u septembru 2018. godine. ( $p < 0,05$ ) \*nastavak

	Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	Co	Cr
Fe	1,000								
Mn	-0,070	1,000							
Ni	0,350	-0,860	1,000						
Zn	0,699	-0,490	0,776	1,000					
Pb	0,762	-0,217	0,594	0,937	1,000				
Cu	0,601	-0,594	0,818	0,979	0,874	1,000			
Cd	0,571	0,202	0,198	0,717	0,851	0,634	1,000		
Co	0,741	-0,601	0,783	0,832	0,692	0,839	0,347	1,000	
Cr	0,056	0,497	-0,217	0,000	0,140	-0,119	0,489	-0,210	1,000

## Biografija autora

Milijana Ž. Kovačević rođena je 23.7.1992. godine u Kninu. Osnovnu školu i srednju Farmaceutsko-fizioterapeutsku školu završila je u Beogradu. Biološki fakultet, smer Ekologija i zaštita životne sredine, upisala je 2011. godine i diplomirala 2015. godine sa prosečnom ocenom 8,92, a master studije na istom smeru završila je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,6. Master rad pod naslovom „Uticaj različitih koncentracija cinka u podlozi na fotosintezu, količinu pigmenata i parametre rasta hibrida *Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize” odbranila je sa ocenom 10. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu Ekologija biljaka i fitogeografija upisala je 2016. godine.

Na Biološkom fakultetu zaposlena je kao istraživač pripravnik 14.4.2018. godine na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz programa osnovnih istraživanja pod nazivom: „Biodiverzitet biljnog sveta Srbije Balkanskog poluostrva - procena, održivo korišćenje i zaštita“ (OI173030). Od 2016. godine učestvovala je u realizaciji praktične nastave na kursevima Ekologija biljaka i Opšta ekologija biljaka, a od 22.1.2021. godine zaposlena je kao asistent na Katedri za ekologiju i geografiju biljaka Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Autor ili koautor je 5 naučnih radova u međunarodnim časopisima, 7 saopštenja na skupovima od međunarodnog i 2 saopštenja na skupovima od nacionalnog značaja. Koautor je bitno poboljšanog tehničkog rešenja na nacionalnom nivou.

Član je Srpskog društva za fiziologiju biljaka.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Миљана Ж. Ковачевић

Број индекса Е3002/2016

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала

- 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 Милијана Ж. Ковачевић

Број индекса Е3002/2016

Студијски програм Екологија/ Екологија биљака и фитогеографија

Наслов рада Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Роасеае) са одлагалишта јаловине рудника метала

Ментор проф. др Тамара Ракић, редовни професор, Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена 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 страницама 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:

Адаптабилност и фиторемедијациони потенцијал врсте *Phragmites australis* (Poaceae) са одлагалишта јаловине рудника метала

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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.