

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNIČKI FAKULTET U BORU

Jelena V. Petrović

**HEMOMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA  
TEŠKIH METALA U ZEMLJIŠTU I IZDANCIMA  
PIONIRSKIH VRSTA KOJE RASTU U BLIZINI  
ZAGAĐENIH VODA U NEPOSREDNOJ  
OKOLINI RUDARSKO-METALURŠKOG  
KOMPLEKSA U BORU: ASPEKTI  
FITOEKSTRAKCIJE I BIOMONITORINGA**

doktorska disertacija

Bor, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE  
TECHNICAL FACULTY IN BOR

Jelena V. Petrović

**CHEMOMETRIC CHARACTERIZATION OF  
HEAVY METALS IN THE SOIL AND SHOOTS  
OF PIONEER SPECIES GROWING NEAR THE  
POLLUTED WATER BODIES IN THE CLOSE  
VICINITY OF MINING-METALURGICAL  
COMPLEX IN BOR: ASPECTS OF  
PHYTOEXTRACTION AND BIOMONITORING**

Doctoral Dissertation

Bor, 2023

**Mentor i komisija za odbranu doktorske disertacije**

**Mentor:**

**Dr Slađana Alagić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru

**Članovi komisije:**

**Dr Snežana Milić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu, Tehnički fakultet u Boru

**Dr Snežana Tošić, redovni profesor**  
Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet

**Dr Zoran Stevanović, viši naučni saradnik**  
Institut za rudarstvo i metalurgiju u Boru

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

## **Zahvalnica**

*Neizmerno se zahvaljujem mojoj dragoj mentorki dr Slađani Alagić, redovnom profesoru Tehničkog fakulteta u Boru, na nesebičnoj pomoći, podršci i sugestijama u svim fazama izrade ovog rada, kao i na tome što mi je uvek ulivala novu snagu i ohrabivala me.*

*Zahvaljujem se članovima komisije dr Snežani Milić, dr Snežani Tošić i dr Zoranu Stevanoviću na saradnji, podršci tokom studija, a i na pomoći i korisnim sugestijama tokom izrade rada.*

*Dugujem zahvalnost i direktoru Instituta za rudarstvo i metalurgiju Bor, dr Miletu Bugarinu, na svesrdnoj pomoći i na odobrenju izrade kompletnih hemijskih analiza, kao i mojim kolegama i koleginicama u Laboratoriji HTK na razumevanju, a posebno mr Mirjani Šteharnik, na pomoći u izradi hemijskih analiza, dr Stefanu Đorđievskom na izradi mape (Slika 21.) i dr Viši Tasiću na izradi Slike 23. Zahvaljujem se mom dragom kolegi Branku Stojčevskom na pomoći tokom uzorkovanja.*

*Veliku zahvalnost osećam prema mojim koleginicama Vojki Gardić, Mariji Milivojević, Radojki Jonović, dr Ljiljani Avramović, dr Danieli Urošević i Bori Stojadinoviću.*

*Zahvaljujem se i svojoj rodbini i prijateljima koji su bili moja velika podrška i snaga i bili uvek tu kada je trebalo.*

*Na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima MAMA JANI i TATA VELIBORU. Tata ostvarujem tvoj najveći san!!!*

# HEMOMETRIJSKA KARAKTERIZACIJA TEŠKIH METALA U ZEMLJIŠTU I IZDANCIMA PIONIRSKIH VRSTA KOJE RASTU U BLIZINI ZAGAĐENIH VODA U NEPOSREDNOJ OKOLINI RUDARSKO-METALURŠKOG KOMPLEKSA U BORU: ASPEKTI FITOEKSTRAKCIJE I BIOMONITORINGA

## Sažetak

Predmet i cilj ove doktorske disertacije je procena autentičnih biljnih fitoekstrakcionih i biomonitoring potencijala u odnosu na teške metale, u odabranim pionirskim biljnim vrstama koje rastu pored zagađenih voda u neposrednoj blizini rudarsko-metalurškog kompleksa u Boru i to korišćenjem hemometrijskog pristupa i izračunavanjem rata bioakumulacije za svaki metal(oid) u nadzemnim biljnim delovima (bioakumulacioni faktori izraženi kroz takozvane odnose mobilnosti, MR). Hemometrijski pristup realizovan je najsavremenijim analitičkim metodama za detekciju i kvantifikaciju metal(oid)a, kao što je masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom uz prethodno mikrotalasno rastvaranje pripremljenih uzoraka, koje su dalje bile kombinovane sa statističkim metodama kao što su: Pearson-ova korelaciona studija, hijerarhijska klaster analiza (HCA) i jednosmerna analiza varijanse (One-Way ANOVA). Posmatrani metal(oid)i bili su: Cu, Zn, Pb, As i Cd, a kao test-biljke za navedenu procenu, iskorišćene su dve zeljaste višegodišnje biljne vrste: mlečika suncogled (*Euphorbia helioscopia* L.) i obična kopriva (*Urtica dioica* L.), jer su jedino one bile pronađene na svih pet lokacija od interesa (osim koprive na jednoj od njih). Preciznije rečeno, kod ovih biljaka uzorkovani su i dalje analizirani njihovi nadzemni delovi (izdanci), kao i odgovarajući uzorci zemljišta/sedimenta. Dodatno, izvršena je i analiza nekih važnih zemljišnih parametara kao što su: pH, električni konduktivitet, EC, organska materija, OM i ukupni N i P, kao i procena njihovog uticaja na procese usvajanja i akumulacije ispitivanih metal(oid)a u sakupljenim biljnim izdancima.

Rezultati ove disertacije i primenjeni hemometrijski pristup, kao i izračunavanje odgovarajućeg bioakumulacionog faktora za svaki metal(oid) u obe biljne vrste sa svake lokacije, obezbedili su brojne korisne informacije o fitoekstrakcionim i fitomonitoring potencijalima ispitivanih pionirskih vrsta, gde su najvažnije sledeće:

1) Prvo, pronađena je i analizirana biljka, tj. mlečika suncogled (*Euphorbia helioscopia* L.), za koju ranije nisu postojali literaturni podaci u odnosu na njene praktične fitoremedijacione i fitomonitoring potencijale.

2) Kada su u pitanju ispitivani uzorci zemljišta/sedimenta, rezultati statističke metode One-way ANOVA, pružili su dokaz da su detektovane koncentracije svakog pojedinog zemljišnog metal(oid)a značajno varirale, osim u slučaju Cd, gde su koncentracije varirale samo minimalno. Rezultati ove disertacije su takođe ukazali i na izuzetno visoke koncentracije Cu u svim uzorcima prikupljenim pored zagađenih voda u Boru i njegovoj najbližoj okolini i najvažnije - ove koncentracije bile su mnogo veće od propisanih graničnih (LV)- i remedijacionih (RV)- vrednosti, a takođe su bile u opsegu fitotoksičnih (zemljišnih) koncentracija. Fitotoksične koncentracije su bile dostignute i u slučaju zemljišnog As na dve lokacije u urbano/industrijskoj (UI) zoni. I u ovom slučaju, odgovarajući LV i RV, su bili prevaziđeni i to u velikoj meri. LV i RV za Cd su takođe bili prevaziđeni na istim UI lokacijama. Na jednoj od njih, LV i RV za Zn su takođe bili prevaziđeni, kao i za Pb na drugoj. Sve ostale koncentracije (u zemljištu/ sedimentu) nisu bile na nivoima koji bi se mogli smatrati povišenim, ili alarmantnim.

3) Ovi nalazi su dalje sugerisali da, generalno, najveći rizik za sve žive organizme, a posebno za prisutnu vegetaciju, može doći od zemljišnog Cu (na svim istraživanim mestima), a zatim i As (na mestima iz UI zone). Ipak, uprkos ovoj činjenici, obe ispitivane biljne vrste su normalno rasle na svojim prirodnim staništima, bez ispoljavanja bilo kakvih vidljivih simptoma toksičnosti Cu, ili As, što ih dalje kvalifikuje kao perspektivne kandidate za obnavljanje vegetacije na ugroženim mestima. Štaviše, obe biljne vrste bile su u stanju da tolerišu ekstremno visoke koncentracije Cu u svojim

izdancima. Praktično, u svim izdancima, ovaj element je bio najobilniji i sve detektovane koncentracije bile su na nivou fitotoksičnosti. Fitotoksične koncentracije su takođe bile otkrivene za Pb (u većini slučajeva) i za As (u nekoliko slučajeva). Sve ostale koncentracije metal(oid)a u izdancima, bile su na normalnim nivoima, a redosled obilnosti je bio: Cu > Zn > Pb > As > Cd (za svaku biljnu vrstu, na svakoj lokaciji). One-way ANOVA je dodatno pokazala veliki broj statistički značajnih razlika između detektovanih koncentracija pojedinih metal(oid)a u obe biljke. Najmanje statistički značajnih razlika (kod obe biljke) nađeno je u slučaju Cd i naročito As.

4) U najvećem broju slučajeva, najveća koncentracija svakog pojedinog metal(oid)a u ispitivanim izdancima, bila je zabeležena u slučaju mlečike suncogled (na svakoj lokaciji), što je ukazalo da generalno, ova biljna vrsta može razviti efikasnije mehanizme za usvajanje i akumulaciju metal(oid)a (preko lista, ili putem korena) od koprive, a posebno u pogledu Cu. Međutim, u osnovi, sposobnosti obe ispitivane biljke za usvajanje preko korena, tj. iz zemljišta/sedimenta nisu bile na nekim značajnijim nivoima, jer su vrednosti većine izračunatih MR bile mnogo niže od 1. Najefektniji rezultati uočeni su u slučaju Cu kod mlečike suncogled sa dve UI lokacije, gde su detektovane koncentracije u izdancima bile iznad nivoa odgovarajućih koncentracija u zemljištu ( $MR > 1$ ). One su takođe bile iznad nivoa koji je karakterističan za biljke hiperakumulatore, što je posebno interesantno za fitoremedijaciju, praktično, fitoekstrakciju. Kako su obe UI lokacije bile karakteristične i po niskim vrednostima pH zemljišta, jasno je da je, u Cu ekstrakciji, mlečika suncogled bila najefikasnija u okolnostima kiselog zemljišta, što je dodatno bilo potvrđeno i rezultatima izvedene Pearson-ove korelacione studije, dok je kopriva bila najefikasnija na mestima sa najvećim vrednostima EC (situacija sa ostalim metal(oid)ima nije bila tako uniformna i jednostavna). Takođe, bilo je jasno da su koncentracije skoro svih ispitivanih metal(oid)a u izdancima bile u negativnim korelacijama sa pH zemljišta, a u pozitivnim korelacijama sa sadržajem OM, dok je situacija sa EC zemljišta, kao i sa zemljišnim P i N bila komplikovanija. Interesantno - zemljišni N bio je u pozitivnim korelacijama sa detektovanim koncentracijama svih metal(oid)a u izdancima koprive i u negativnim korelacijama sa koncentracijama metal(oid)a u izdancima mlečike suncogled. Međutim, poslednje pomenute korelacije nisu bile na statistički značajnim, tj. pouzdanim nivoima. Rezultati iste statističke metode takođe su potvrdili da koncentracije metala u izdancima nisu uvek bile u pozitivnim korelacijama sa odgovarajućim koncentracijama u zemljištu (osim u slučaju As u mlečiki suncogled, gde je uočena jaka pozitivna korelacija sa zemljišnim As), ali su u isto vreme bile u značajnim pozitivnim korelacijama sa nekim drugim zemljišnim metalima: As-Pb, As-Cd i Cd-Pb kod mlečike suncogled i Zn-Cd kod koprive. Ovo sve ukazuje da, u većini slučajeva, koncentracije metal(oid)a u izdancima nisu bile u nekoj značajnijoj meri zavisne od odgovarajućih zemljišnih koncentracija, kao i da su neki metal(oid)i bili u kompeticiji pri usvajanju preko korena (korelacije sa negativnim predznakom), a neki ne (korelacije sa pozitivnim predznakom). Ovo u konačnom sugerise da su obe biljne vrste usvajale metal(oid)e pre svega u skladu sa svojim individualnim potrebama i takođe, sve ovo ide u prilog opšte poznate činjenice da biljke usvajaju metale ne samo preko korena, već i preko lista.

5) Isti nalazi dalje indikuju da su obe biljne vrste, u slučajevima izuzetno visokih (praktično - rizičnih) zemljišnih koncentracija, za većinu metal(oid)a, usvojile strategiju njihovog ograničenog usvajanja (preko korena). U suštini i pored svih razlika u usvajanju i akumulaciji metala između dve različite ispitivane biljne vrste (koje su bile uočene kroz primenjene analize), na bazi veoma niskih izračunatih vrednosti MR ( $< 1$ ), može se reći da su se, u odnosu na većinu metal(oid)a, obe biljne vrste, ponašale kao tolerantne, ali nehiperakumulatorske vrste, a moguće čak i kao ekskluderi.

6) Dobijeni rezultati, uključujući i rezultate HCA, korišćenjem Ward-ove metode, koji se odnose na klasifikaciju lokacija po zagađenosti, potvrdili su da izdanci obe ispitivane biljke ne mogu tačno da odraze postojeću situaciju u zemljištu, što ih dalje ne može preporučiti kao pouzdano sredstvo u fitomonitoringu zagađenja zemljišta.

7) Međutim, u slučaju zagađenja atmosferskog porekla, obe vrste mogu biti od koristi, jer su rezultati HCA sa primenjenom metodom povezivanja srednjih vrednosti između grupa, pokazali da obe biljne vrste imaju veoma dobar potencijal da odraze poreklo metal(oid)a u svojim izdancima (tj., predominantno iz - zemljišta/sedimenta, ili pak - iz atmosfere), pa su tako pružile i jednu

adekvatnu ilustraciju opšteg stepena zagađenosti u konkretnoj oblasti, u konkretno vreme (uzorkovanja), što znači da one mogu poslužiti kao precizno sredstvo u praćenju zagađenja jednog sezonskog i pre svega atmosferskog karaktera, praktično tokom kompletnog vegetacionog perioda i u osnovi, za procenu generalnog kvaliteta životne sredine. Ova poslednja metoda je takođe pružila uvid i u moguće izvore metal(oid)a u ispitivanoj oblasti, tako da je kombinacija ove poslednje pomenute vrste HCA i izračunavanja Pearson-ovih koeficijenata, uspešno ukazala:

- da se poreklo Cu u uzorcima zemljišta/sedimenta, u značajnom stepenu razlikuje u odnosu na ostale ispitivane metal(oid)e, kao i da se najmanje može pripisati zagađenju koje dolazi iz atmosfere, a pre svega iz topionice kao glavnog izvora ove vrste zagađenja u regionu Bora; poreklo Cu u zemljištu/sedimentu je predominantno prirodno, tj. geološko, ali svakako manjim delom potiče i od povremenih izlivanja zagađenih voda iz neposredne blizine; ostali metal(oid)i su takođe različitog porekla – i geološkog i antropogenog, ali pre svega atmosferskog, pa tek zatim i poreklom od izlivanja zagađenih voda,

- da je poreklo metal(oid)a u izdancima mlečike suncogled bilo najviše u vezi sa otpadnim gasovima emitovanim iz topionice, pri čemu su prednjačili metal(oid)i kao što su: Cu, As i Cd, što praktično znači da je mlečika usvajala metal(oid)e pre svega iz atmosfere (tj. preko listova), a manjim delom iz podloge (osim u slučajevima usvajanja Cu iz kiselog zemljišta) i

- da su izdanci koprive, iz atmosfere usvajali pre svega Zn i As (najvećim delom), dok su metali Cd i Pb verovatno poticali iz oba izvora: iz tla i iz atmosfere (i to prilično ujednačeno); konačno, najveći deo Cu u koprivi sa izabranih mesta u Borskom regionu bio je poreklom iz podloge na kojoj su biljke rasle.

**Ključne reči:** hemometrija, fitoremedijacija, fitoekstrakcija, biomonitoring, mlečika suncogled (*Euphorbia helioscopia* L.), obična kopriva (*Urtica dioica* L.), teški metal(oid)i, zemljište/sediment, biološka akumulacija

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Hemija, hemijska tehnologija i hemijsko inženjerstvo

**UDK broj:** 502/504(043.3)

502.175(043.3)

504.5(043.3)

549.25(043.3)

# CHEMOMETRIC CHARACTERIZATION OF HEAVY METALS IN THE SOIL AND SHOOTS OF PIONEER SPECIES GROWING NEAR THE POLLUTED WATER BODIES IN THE CLOSE VICINITY OF MINING-METALLURGICAL COMPLEX IN BOR: ASPECTS OF PHYTOEXTRACTION AND BIOMONITORING

## Abstract

The objective and goal of this doctoral dissertation is the evaluation of authentic plant phytoextraction and biomonitoring potentials with regard to heavy metals in the selected pioneer plant species, which are growing near polluted water bodies in the close vicinity of the mining/metallurgical complex in Bor, using a chemometric approach and the calculation of bioaccumulation rates for each metal(oid) in the aboveground plant parts (bioaccumulation factors expressed through the so called mobility ratios, MRs). Chemometric approach was realized by the most current analytical methods for metal(oid)s detection and quantification such as inductively coupled plasma-mass spectrometry with previous microwave digestion of the samples, which further were combined with the statistical methods such as: Pearson's correlation study, hierarchical cluster analysis (HCA), and one-way analysis of variance (One-Way ANOVA). The observed metal(oid)s were: Cu, Zn, Pb, As, and Cd, while the two herbaceous perennial plant species: sun spurge (*Euphorbia helioscopia* L.), and common nettle (*Urtica dioica* L.) were used as the test-plants for the mentioned evaluation, because only they were found at all five locations of interest (except the common nettle at one of them). Precisely speaking, from these plants were collected and then analyzed their aboveground parts (shoots), as well as the corresponding samples of soil/sediment. In addition, the analysis of some important soil parameters such as: pH, electrical conductivity, EC, organic matter, OM, and the total N, and P, was done, as well as the estimation of their influence on the processes of the uptake and accumulation of the investigated metal(oid)s in the collected plant shoots.

The results of this dissertation and the applied chemometric approach, as well as the calculation of related bioaccumulation factor for each metal(oid) in both plant species from each location, provided numerous informative data on the phytoextraction and biomonitoring potentials of the investigated pioneer species, where the most important are the following:

1) Firstly, it was found and analyzed the plant, namely, the sun spurge (*Euphorbia helioscopia* L.), for which, there was no any literature data regarding their practical phytoextraction and biomonitoring potentials.

2) As for the investigated samples of soil/sediment, the results of the statistical method One-way ANOVA, offered evidence that the detected concentrations of each individual soil metal(oid) varied significantly, except in the case of Cd, where the concentrations varied only minimally. The results of this dissertation also pointed to the extremely high concentrations of Cu in all samples collected near polluted water bodies in Bor and its close vicinity, and most importantly – these concentrations were much higher than the defined limit (LV)- and remediation (RV)-values, and also, they were in the range of phytotoxic (soil) concentrations. Phytotoxic concentrations were reached in the case of soil As at the two locations in urban/industrial (UI) zone, too. In this case, the related LV, and RV were exceeded in a high quantity. LV, and RV for Cd were also surpassed at the same UI locations. At one of them, LV, and RV for Zn were surpassed too, as well as for Pb at the other. All other concentrations (in soil/sediment) were not at the levels that could be considered elevated or alarming.

3) These findings are further suggested that, generally, the greatest risk for all living organisms, and especially for the present vegetation, may come from the soil Cu (at all investigated sites), and then from the soil As (at the sites from UI zone). However, in spite of this fact, the growth of both investigated plant species was normal at their natural habitats, without the expression of any of visible toxicity symptoms of Cu or As, which further qualifies them as prospective candidates for revegetation of endangered sites. What is more, both plant species were capable to tolerate



extremely high Cu concentrations in their shoots. Practically, in all shoots, this element was the most abundant and all detected concentrations were at the level of phytotoxicity. Phytotoxic concentrations were also found for Pb (in most cases), and for As (in several cases). All other concentrations of metal(oid)s in the shoots were at normal levels; the order of abundance was: Cu > Zn > Pb > As > Cd (for each plant species, at each location). Additionally, one-way ANOVA showed a great number of statistically significant differences between the detected concentrations of individual metal(oid)s in both plants. The minimum of statistically significant differences (for both plants) was found in the case of Cd, and especially As.

4) In most cases, the highest concentration of each individual metal(oid) in the investigated shoots was recorded in the case of sun spurge (at each location), which pointed that, in general, this plant species can develop more effective mechanisms for the uptake and accumulation of metal(oid)s (via leaf or via root) than nettle, especially with regard to Cu. However, basically, the capabilities of both investigated plants regarding the uptake via root, i.e. from the soil/sediment, were not at some significant levels; namely, the values of most calculated MRs were much lower than 1. The most effective results were noticed in the case of Cu in sun spurge from the two UI locations, where the detected shoot concentrations were above the corresponding soil concentrations (MRs > 1). They were also above the level characteristic for plant hyperaccumulators, which is especially interesting for phytoremediation, practically, phytoextraction. Given that both UI locations were characterised with their low values of soil pH, it is clear that in Cu extraction, sun spurge was the most efficient in the circumstances of acidic soils, which was additionally confirmed also by the results of the performed Pearson correlation study; the nettle was the most efficient at the sites with the highest EC values (the situation with other metal(oid)s was not so uniform and simple). It was also clear that the concentrations of almost all investigated metal(oid)s in the shoots were in negative correlations with soil pH, but in positive correlations with OM content, whereas the situation with soil EC, as well as with soil P, and N was more complicated. Interestingly – soil N was in positive correlations with the detected concentrations of all metal(oid)s in nettle shoots and in negative correlations with the metal(oid)s concentrations in the shoots of sun spurge. However, the recently mentioned correlations were not at the statistically significant, i.e. confident levels. The results of the same statistical method also confirmed that the concentrations of metal(oid)s in the shoots were not always in positive correlations with the corresponding soil concentrations (except in the case of As in sun spurge, where a strong positive correlation with soil As was noticed), but simultaneously, they were in significant positive correlations with some other soil metal(oid)s: As-Pb, As-Cd, and Cd-Pb in the case of sun spurge, and Zn-Cd in the case of nettle. This all points that, in most cases, the concentrations of metal(oid)s in shoots were not dependent, in some significant extent, on the corresponding soil concentrations, as well as that some metal(oid)s were in competition during the root uptake (correlations with negative sign), whereas some of them were not (correlations with positive sign). In final, this all suggests that both plant species assimilated metal(oid)s predominately in accordance with their individual needs, and also, this all is in favour of a well known fact that plants assimilate metal(oid)s not only via root but also via leaf.

5) The same findings indicate further that, in the cases of very high (practically - dangerous) soil concentrations, both plant species adopted a strategy of limited root uptake, for most metal(oid)s. Mainly, regardless all differences in metal(oid)s uptake and accumulation between the two different plant species (that were perceived through the applied analyses), on the basis of very low values of the calculated MRs (< 1), it can be said, that, regarding most metals, both plant species acted as tolerant but nonaccumulator species, possible even as excluders.

6) The obtained results, including the results of HCA, using the Ward's method, which are related to the classification of location according to their contamination, confirmed that the shoots of both investigated plants can not reflect accurately, the existing situation in the soil, which further, can not recommend them as a confident tool in soil phytomonitoring.

7) However, in the case of contamination of atmospheric origin, both species can be of use, because the results of HCA with the applied method of average linkage between groups, showed that both plant species have a very good potential to reflect the origin of metal(oid)s in their shoots (i.e.,

predominately from the soil/sediment, or from the atmosphere). They offered an adequate illustration of a general extent of contamination in the concrete area, in the actual time (of sampling), which means that they can serve as an accurate tool in the screening of contamination of a seasonal and the atmospheric character, practically, during the complete vegetation period, and basically, for the estimation of a general environmental quality. Also, the last method offered an insight into the possible sources of metal(oid)s in the examined area, so that, the combination of the last kind of HCA and the calculation of Pearson's coefficients is successfully pointed that:

- the origin of Cu in the soil/sediment samples differ, in a significant extent, from the other investigated metal(oid)s, as well as that it can be less ascribed to the contamination of atmospheric origin, and above all – to the smelter plant as the main source of this kind of contamination in the region of Bor; the origin of Cu in the soil/sediment is predominately natural, i.e., geogenic, but in a less part it comes from the occasional overflows of polluted waters in the close vicinity; the rest of metal(oid)s are also of different origin – geogenic and anthropogenic, but primarily, they come from the atmosphere and then from the occasional overflows of polluted waters,
- the origin of metal(oid)s in the shoots of sun spurge is mostly linked to the waste gases emitted from the smelter, where Cu, As, and Cd, were leading metal(oid)s, which means that the sun spurge assimilated metal(oid)s predominately from the atmosphere (via leaves), and in a less extent, from the ground (except in the cases of Cu assimilation from the acidic soil) and
- the shoots of the common nettle assimilated Zn, and As mostly from the atmosphere, while Cd and Pb originated probably from both sources, i.e., from the ground and from the atmosphere (pretty evenly); finally, the greatest part of Cu in the nettle from the selected sites in the Bor region, was from the ground where the plants were growing.

**Key words:** chemometry, phytoremediation, phytoextraction, biomonitoring, sun spurge (*Euphorbia helioscopia* L.), common nettle (*Urtica dioica* L.), heavy metal(oid)s, soil/sediment, biological accumulation

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** Chemistry, chemical technology, and chemical engineering

**UDK number:** 502/504(043.3)

502.175(043.3)

504.5(043.3)

549.25(043.3)

# Sadržaj

<b>1. Uvod: Hemometrijsko određivanje teških metala u biljnom i zemljišnom materijalu sa posebnim akcentom na aspekte biomonitoringa i fitoremedijacije.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Teorijske osnove sa literaturnim pregledom podataka.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Fitoremedijacija i biomonitoring – dve ekološke metode u kontroli i zaštiti životne sredine u odnosu na teške metale.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Biljna mobilizacija i usvajanje metala preko korena.....	6
2.1.1.1. Transport koren-nadzemna tkiva.....	11
2.1.1.2. Transport u okviru ćelije.....	12
2.1.2. Biljno usvajanje metala preko listova.....	12
2.1.3. Različite uloge biljaka u procesima fitoremedijacije i biomonitoringa teških metala.....	13
2.1.3.1. Taktike biljaka u borbi protiv toksičnih efekata metala kao ključni činilac efikasnog fitoremedijacijskog procesa.....	13
2.1.3.1.1. Strategije biljaka u borbi protiv toksičnosti metala na nivou ćelijskih mehanizama.....	15
2.1.3.1.2. Strategije biljaka u borbi protiv metalnog stresa vezano za mehanizme postizanja rezistentnosti/tolerantnosti prema istim.....	15
2.1.4. Metode fitoremedijacije.....	17
2.1.4.1. Fitostabilizacija.....	17
2.1.4.2. Fitoekstrakcija do akumulacije i hiperakumulacije.....	18
2.1.4.3. Fitovolatilizacija.....	21
2.1.5. Značaj biljnog usvajanja metala za biomonitoring.....	22
<b>2.2. Hemometrija u analizi metala iz zemljišnih i biljnih uzoraka sa akcentom na značaj za fitoremedijaciju i biomonitoring.....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Metode hemijske detekcije i karakterizacije metala kao deo hemometrijskog pristupa u analizi zemljišnih i biljnih uzoraka.....	24
2.2.1.1. Atomska spektrometrija.....	25
2.2.1.1.1. Masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom.....	27
2.2.2. Statističke metode kao deo hemometrijskog pristupa u analizi metala zemljišnih i biljnih uzoraka.....	30
2.2.2.1. Kratki pregled najčešće korišćenih statističkih metoda.....	31
<b>2.3. Primeri hemometrijskog pristupa u analizi metala zemljišnih i biljnih uzoraka sa posebnim akcentom na fitoremedijaciju i biomonitoring.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Osnovne polazne hipoteze i cilj rada.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Eksperimentalni deo.....</b>	<b>49</b>
4.1. Opis mesta istraživanja.....	49
4.2. Opis ispitivanih biljnih vrsta.....	59
4.3. Uzorkovanje, priprema i analiza biljnog i zemljišnog materijala.....	62

<b>4.4. Procesuiranje rezultata dobijenih hemijskom analizom.....</b>	<b>65</b>
<b>5. Rezultati i diskusija.....</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Rezultati za mlečiku i koprivu iz Oštrelja sa kraćom diskusijom.....</b>	<b>77</b>
<b>6. Zaključak.....</b>	<b>78</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>81</b>
<b>Prilozi.....</b>	<b>92</b>



# 1. Uvod: Hemometrijsko određivanje teških metala u biljnom i zemljišnom materijalu sa posebnim akcentom na aspekte biomonitoringa i fitoremedijacije

Problemi uzrokovani teškim metalima antropogenog porekla, a naročito poreklom od rudarskih i metalurških aktivnosti prisutni su na nivou celog sveta (Guarino i sar. 2019; Schreck i sar. 2020). Oni obično proizvode jake negativne efekte kroz masivne emisije otpadnih gasova, ili kroz neadekvatno odlaganje velikih količina čvrstog, ili tečnog otpada obogaćenog metalima (da Silva i sar. 2017) i to kako u najbližem lokalnom okruženju, tako i u kompletnoj biosferi (Bačeva i sar. 2014; Ličina i sar. 2017; Pavoni i sar. 2017; Perlatti i sar. 2015; Shutcha i sar. 2015). Zato i menadžment zagađenih sfera životne sredine predstavlja temu od globalnog interesa, a posebno u odnosu na zemljište kao dobro poznati (prirodni) rezervoar različitih polutantata, tj. zagađujućih materija (Pavoni i sar. 2017; Petrović i sar. 2021).

Međutim, često, ne postoje jednostavna rešenja za efektivno "izlečenje" kontaminiranih medijuma, ili za kontrolu negativnog uticaja teških metala na žive organizme. Brojne tehnologije bazirane na različitim fizičkim, električnim, termalnim, hemijskim, ili biološkim procesima bile su testirane u cilju dobijanja pouzdanih i tačnih podataka u odnosu na njihovu efektivnost pri redukciji, ili totalnom uklanjanju teških metala sa kontaminiranih mesta. Izvedeni testovi pokazali su mnoge afirmativne, ali u isto vreme i brojne negativne rezultate za svaki pojedini, ili kombinovani pristup. Na prvom mestu, potencijali različitih tehnologija bili su razmatrani na bazi njihove efikasnosti, trajanju, koštanju, i eventualnim (dodatnim) poremećajima tretiranih matriksa. Tokom poslednjih decenija, jedna nova "zeleni" tehnologija, poznata kao fitoremedijacija, bila je prezentovana i uvedena u praksu kao relativno jednostavna, jeftina i ekološka (eng. *environmentally-friendly*) metoda, kako u odnosu na zagađenu vodu i vazduh, tako i na zemljište, kao veoma važan, ali i ekstremno slabo obnovljivi (praktično - neobnovljivi) prirodni resurs. U slučaju zemljišta, bilo je pokazano da fitoremedijacija, iako dugotrajni proces (baziran na specifičnim biljnim kapacitetima za toleranciju metala), može potpuno da ukloni, ili bar da imobilize metale na velikim kontaminiranim površinama i to na jedan vrlo efikasan i bezbedan način, popravljajući istovremeno fizičke, hemijske i biološke karakteristike tretirane podloge (Elshamy i sar. 2019; Liu i sar. 2018; Petrović i sar. 2021).

Može se reći da su više, tj. vaskularne kopnene biljke vrlo specifično organizovani živi organizmi sa jedinstvenim ekobiološkim karakteristikama. One istovremeno reaguju sa tri sfere životne sredine – zemljištem, vodom i vazduhom zahtevajući samo jedan relativno skroman unos osnovnih nutrijenata (Alagić i sar. 2015a; Cunningham i Ow 1996; Schnoor i sar. 1995). Naime, za normalan razvoj i rast biljaka potrebno je održati koncentracije esencijalnih metala kao što su gvožđe, Fe, mangan, Mn, bakar, Cu, cink, Zn, nikal, Ni i kobalt, Co, u okviru takozvanih optimalnih vrednosti (stanje poznato kao homeostaza). Nažalost, kada koncentracije navedenih metala pređu optimalne vrednosti, oni mogu ispoljiti i svoje toksične osobine (takozvana fitotoksičnost); ovo se uobičajeno iskazuje kroz neke vidljive pojave kao što su: smanjenje biomase, hlороza lišća (praktično, smanjenje intenziteta procesa fotosinteze), usporavanje rasta korena, itd. Na ćelijskom, tj., celularnom nivou, posledice izloženosti povišenim koncentracijama esencijalnih metala mogu biti: raspadanje membrane, gubitak jona, peroksidacija molekula fosfolipida, oštećenje DNK/RNK (dezoksi-ribonukleinska kiselina / ribonukleinska kiselina) i konačno, odumiranje ćelije (Tabela 1.). Iz ovih razloga, navedeni metali se često nazivaju – potencijalno toksični, PTM i takođe, često se ubrajaju u toksične, tj. teške metale (Alagić 2022). Ipak, treba naglasiti da je fitotoksičnost pre svega povezana sa neesencijalnim, tj. tipičnim teškim metalima: kadmijumom, Cd, živom, Hg, olovom, Pb, pa čak i hromom, Cr, kao i metaloidom arsenom, As, koji po definiciji ne igraju nikakvu značajnu ulogu u biljkama i koji imaju izuzetno niske pragove toksičnosti (Tabela

1.). Zbog svoje izuzetne toksičnosti, metaloid As se često posmatra kao klasičan teški metal (Alagić 2014, 2022; Flora i sar. 2008; Lin i Aarts 2012; Rascio i Navari-Izzo 2011; Nagajyoti i sar. 2010; Vamerali i sar. 2010).

**Tabela 1.** Uloga metala u biljkama i mogući toksični efekti sa odgovarajućim koncentracijama (Alagić 2014)

Metal	Funkcija u biljkama	Toksični efekti	Normalne koncentracije (mg/kg suve mase, SM)	Prag toksičnosti u tkivu biljaka (mg/kg SM)
<b>Cu</b>	Redoks aktivan; odlučujući kofaktor komponenata lanca transporta elektrona u mitohondrijama i hloroplastu; konstituent brojnih enzima; važna uloga u kvalitetu reprodukcije i roda biljne kulture; asimilacija CO <sub>2</sub> i sinteza ATP.	Usporen biljni rast i hloroza lišća.	4-15 5-20	15-20 2-100
<b>Mn</b>	Konstituent enzima; aktivacija enzima; fotosinteza; neophodan u reproduktivnoj fazi; otpornost na biotičke i abiotičke stresove.	Redukcija fotosinteze i pojava nekrotičnih braon fleka na listovima.	15-100 20-1000	170-2000 300-500
<b>Pb</b>	/	Inhibicija enzimske aktivnosti vezivanjem na sulfhidrilne grupe, vodni disbalans, promene u permeabilnosti membrane i poremećaj mineralne ishrane.	1-13 0,2-20	10-20 30-300
<b>Zn</b>	Konstituent enzima i ćelijske membrane; aktivacija enzima; transkripcija DNK; učešće u reprodukciji i određivanju roda i kvaliteta biljnih kultura; otpornost na biotičke i abiotičke stresove; čvorovanje kod mahuna i fiksacija azota; redoks neaktivan.	Ograničen rast korena i izdanka, kao i hloroza pre svega mladog lišća. Višak cinka može izazvati deficitarnost u bakru, manganu i fosforu.	8-100 1-400	150-200 100-400
<b>As</b>	/	Direktno - dezintegracija ćelijskih struktura, ili indirektno – zamena esencijalnih metala. Redukcija rasta, bledoća korena, venjenje lišća, pojava ljubičastog obojenja. Kompeticija sa fosforom prilikom usvajanja.	0,02-7 0,09-1,5	>20 5-10 5-20
<b>Fe</b>	Redoks aktivan; odlučujući kofaktor komponenata lanca transporta elektrona u mitohondrijama i hloroplastu, te je važan za fotosintezu, respiraciju i asimilaciju sulfata.	Produkcija slobodnih radikala koja ireverzibilno oštećuje celularne strukture i membranu; redukcija fotosinteze i prinosa.	140	/
<b>Cd</b>	/	Direktno - oštećenje ćelijske strukture, ili indirektno – zamena esencijalnih metala. Inhibicija metabolizma gvožđa, hloroza; inhibicija disanja i transporta elektrona u procesu oksidativne fosforilacije; inhibicija transpiracije kao i stominih pokreta.	0,1-2,4	5-10 10-20 5-30
<b>Cr</b>	/	Hloroza i zaostajanje u rastu. Veće koncentracije mogu da utiču i na klijanje semena, vodni režim i sintezu hloroplasta.	0,2-1 0,03-14	1-2 5-30
<b>Ni</b>	Konstituent enzima; aktivacija ureaze.	Hloroza koja podseća na hlorozu izazvanu nedostatkom gvožđa. Nepovoljno utiče ne samo na translokaciju Fe, već i na samo njegovo usvajanje; poremećaji u balansu nutritijenata, vode i funkciji ćelijske membrane.	1 0,02-5	20-30 10 kod osetljivih vrsta 50 kod umereno tolerantnih vrsta 10-100
<b>Hg</b>	/	U dvovalentnom stanju remeti transpiracioni tok kod biljaka, interferiše sa mitohondrijalnom aktivnošću i oštećuje lipide membrane.	0,005-0,02 0,005-0,17	1-3

Najniža koncentracija nekog esencijalnog elementa koja proizvodi toksičan efekat u biljnom tkivu i u krajnjem dovodi i do odumiranja biljke, definisana je kao "gornji kritični nivo", dok nasuprot tome, "donji kritični nivo" definiše minimalno potrebnu količinu tog elementa koja je dovoljna za preživljavanje biljke. Između ovih graničnih vrednosti, nalaze se pomenute optimalne koncentracije, tj. koncentracije koje obezbeđuju nesmetano odvijanje biljne fiziologije, pa samim tim i normalan biljni rast i razvoj (Alagić 2014, 2022; Aloway 2013).

Ovde treba napomenuti da, osim preko korena, biljke mogu usvajati metale i preko listova (iz kontaminiranih čestica prašine), pa se ova pojava može iskoristiti ne samo za (delimično) uklanjanje metala iz atmosfere (Kirkham 2006), već i u različitim procedurama biomonitoringa, kao još jedne ekološke i ekonomski isplative metode za kontrolu i zaštitu životne sredine; osim toga, neusvojeni deo atmosferske prašine, može biti zadržan na gornjoj površini lišća, što daje izvanrednu mogućnost procene jednog istinskog profila atmosferskog zagađenja u kontaminiranoj oblasti, tako da su mnogi autori u svojim biomonitoring testovima koristili upravo neoprano lišće (Alagić i sar. 2013, 2015a, 2019, Alagić 2022; Dmuchowski i Bytnerowicz 2009; Dimitrijević i sar. 2016; Hofman i sar. 2013; Mingorance i sar. 2007; Simon i sar. 2011, 2014; Tošić i sar. 2016; Weber i sar. 2014); pojedini autori su u ove svrhe koristili čak i korenje, ali rezultati nisu bili na značajnijem nivou (Alagić i sar. 2015a, 2019, Alagić 2022; Mertens i sar. 2005).

Kako bi se procene biljnih potencijala za eventualnu primenu u biomonitoringu i fitoremedijaciji uradile na ispravan i tačan način, neophodno je primeniti ne samo najsavremenije hemijske metode za kvalitativnu i kvantitativnu detekciju teških metala, već se u ovaj process moraju uključiti i različite statističke metode za procesuiranje rezultata dobijenih izabranim hemijskim metodama; ovde je veoma značajno i izračunavanje namenskih bioloških faktora koji ukazuju na rate akumulacije, ili obogaćenja u različitim biljnim delovima. Kombinovanje metoda hemijske i statističke analize, takozvani hemometrijski pristup, danas predstavlja najznačajniji i najpouzdaniji način za izvođenje pravilnih zaključaka o sposobnostima ispitivanih biljnih vrsta da razviju određene strategije u odnosu na borbu sa toksičnim efektima teških metala i tako se prilagode agresivnim uslovima koji vladaju u zagađenim područjima, što je u konačnom i najvažnije za donošenje ispravnih zaključaka o mogućoj primeni ovih biljaka u biomonitoringu i fitoremedijaciji (Alagić i sar. 2017, 2019; Alagić 2022). Ova doktorska disertacija se upravo bavi konkretno odabranim, pionirskim biljnim vrstama iz grada Bora i neposredne okoline, primenjujući pomenuti, najsavremeniji, hemometrijski pristup, kao i obračun rata akumulacije u nadzemnim biljnim delovima, istovremeno ukazujući na značaj primenjenog pristupa.



## 2. Teorijske osnove sa literaturnim pregledom podataka

### 2.1. Fitoremedijacija i biomonitoring – dve ekološke metode u kontroli i zaštiti životne sredine u odnosu na teške metale

Zbog sve izraženijih problema sa teškim metalima u životnoj sredini, brojne metode praćenja, kao i njihovog uklanjanja iz zagađenih voda, atmosfere i posebno zemljišta, bile su razvijene i preduzete u cilju monitoringa i uklanjanja, ili barem smanjenja koncentracija ovih opasnih zagađujućih materija u čovekovom neposrednom okruženju.

Kada je u pitanju zemljište, kako navode Liu i sar. (2018), postoji više od 5 000 000 mesta na svetu, sa oko 20 000 000 ha površine, kontaminiranih različitim teškim metal(oid)ima. Isti autori smatraju da ovo može značajno i veoma nepovoljno da utiče na ljudsko zdravlje i to preko lanaca ishrane, jer naravno, biljke, zajedno sa potrebnim nutrijentima i korisnim metalima, iz zemljišta usvajaju i tipične teške metale koji ispoljavaju jedino negativne efekte, ne samo u biljkama, već i u biljojedim životinjama i konačno i u ljudima koji se često nalaze na vrhovima lanaca ishrane.

Liu i sar. (2018) ističu da se brojne tehnike, koje su bile razvijene u cilju remedijacije zemljišta mogu podeliti u dve glavne grupe:

- 1) *in-situ* i
- 2) *ex-situ*.

*In-situ* tehnike, odnosno, tehnike koje se primenjuju, tj., kojima se deluje na samom mestu kontaminacije, ovi autori su dalje podelili u sledeće kategorije:

- 1a) fizičke (površinsko zatvaranje i enkapsulacija),
- 1b) hemijske (ispiranje zemljišta i imobilizacija),
- 1c) električne (elektrokinetičke i vitrifikacija) i
- 1d) biološke (bioremedijacija i fitoremedijacija),

dok su *ex-situ* tehnike, koje se primenjuju van mesta zagađenja podelili na:

- 2a) fizičke (iskopavanje),
- 2b) hemijske (pranje zemljišta i solidifikacija) i
- 2c) termalne (vitrifikacija).

Sve navedene tehnike razlikuju se po primenjenim mehanizmima, te svaka pokazuje neku svoju posebnost, prednost, ili pak ograničenje, kao što se to može uočiti iz Tabele 2.:

**Tabela 2.** Mehanizmi, prednosti, ograničenja i moguće aplikacije raspoloživih remedijacionih tehnika za zemljišta kontaminirana teškim metalima (Liu i sar. 2018)

Remedijacione tehnike	Primenljivost	Mehanizam	Prednosti	Nedostaci	Nivo praktične primenljivosti
<b>Površinsko zatvaranje</b>	Na licumesta, visoka kontaminacija	Fizičko zadržavanje	Jednostavno za instalaciju, niska cena, visoka sigurnost	Ograničeno na male površine i određene geografske lokacije, gubitak useva	Široko praktikovano
<b>Inkapsulacija</b>	Na licu mesta, visoka kontaminacija	Fizičko zadržavanje i izolacija	Visoka sigurnost, brzo se instalira	Ograničeno na mala, plitka područja kontaminacije, visoka cena, gubitak useva	Sanacija kontaminacije radionukleidima i mešovitim otpadom
<b>Elektrokinetika</b>	Na licu mesta, zemljište fine strukture,, umerena do visoka kontaminacija	Uklanjanje strujom	Uklanjanje zagađujuće materije, minimalno ometanje tla	Dugotrajno, niske efikasnosti, najbolje za tla sa finom teksturom sa niskom propustljivošću	U razvoju, sa pilot-demonstracijama

<b>Ispiranje tla</b>	Na licu mesta, grubo zemljište, umerena do velika kontaminacija	Uklanjanje kontaminacije raznim hemikalijama	Uklanjanje zagađujuće materije, minimalno ometanje tla, niska cena, jednostavna instalacija	Najbolje za zemljišta grube teksture sa visokom propusnošću i sa potencijalnim zagađenjem podzemnih voda	Ograničen broj aplikacija za sanaciju mešovitog otpada
<b>Imobilizacija / stabilizacija</b>	Na licu mesta, visoka kontaminacija	Uklanjanje kontaminacije hemikalijama	Pristupačan, lak za implementaciju, trenutni efekti	Specifičan za metal, privremena efikasnost, zagađujuće materije ostaju u zemljištu	Privremena sanacija, nije zvanično odobrena
<b>Fitoremedijacija</b>	Na licu mesta, mala do umerena kontaminacija	Uklanjanje i/ili stabilizacija od strane biljaka	Visoka javna prihvaćenost, niska cena, laka implementacija, pogodna za velike površine sa niskim stepenom kontaminacije	Ograničeno na plitku kontaminaciju, specifično za metal, dugotrajno, niske efikasnosti	U razvoju sa pilot demonstracijama
<b>Bioremedijacija</b>	Na licu mesta, mala do umerena kontaminacija	Transformacija izolacije pomoću mikroba	Niska cena, jednostavan alat, minimalno ometanje tla	Niska efikasnost, samo dopuna osnovnim tehnikama sanacije	Ne praktikuje se previše za sanaciju teških metala
<b>Vitrifikacija</b>	Na licu mesta i sa lica mesta, visoka kontaminacija	Deaktivacija izolacije pomoću termički ostakljene zemlje	Visoka efikasnost	Visoki troškovi, ograničeno na malu površinu/zapreminu zemljišta, tretirano zemljište i zemljište koje gubi ekološku funkciju	Redovno se praktikuje
<b>Stvrdnjavanje / očvršćavanje</b>	Na licu mesta i sa lica mesta, visoka kontaminacija	Deaktivacija zatvorenog prostora fizičkim očvršćavanjem tla	Brza implementacija, visoka efikasnost	Visoki troškovi, zemljište gubi ekološke funkcije	Redovno se praktikuje
<b>Deponija</b>	Na licu mesta i sa lica mesta, visoka kontaminacija	Fizičko zadržavanje i izolacija	Trenutno čišćenje, visoka sigurnost	Visoki troškovi, zahteva dodatno zemljište za skladištenje otpada	Široko praktikovano
<b>Pranje tla</b>	Sa lica mesta, umerena do visoka kontaminacija	Uklanjanje kontaminacije mehaničkim odvajanjem i hemijskom ekstrakcijom	Visoka efikasnost, brzi efekti	Ekstremni poremećaji tla	Redovno se praktikuje

Treba još istaći i da se fitoremedijacija, kao biološka metoda redovno posmatra i kao jedna vrsta bioremedijacije. Naime, prvobitno je bioremedijacija bila shvaćena kao metoda u kojoj se pre svega koriste zemljišni mikrobi, a onda je pojam proširen i na fitoremedijaciju gde se koriste i biljne vrste (Alagić i sar. 2015b). Saradnja biljaka i njenih pridruženih rizosfernih mikroba je takođe moguća i u stvari, to je jedna od najpoželjnijih, najefektivnijih i najprimenjenijih metoda u bioremedijaciji zemljišta od različitih zagađujućih materija (Guarino i sar. 2019).

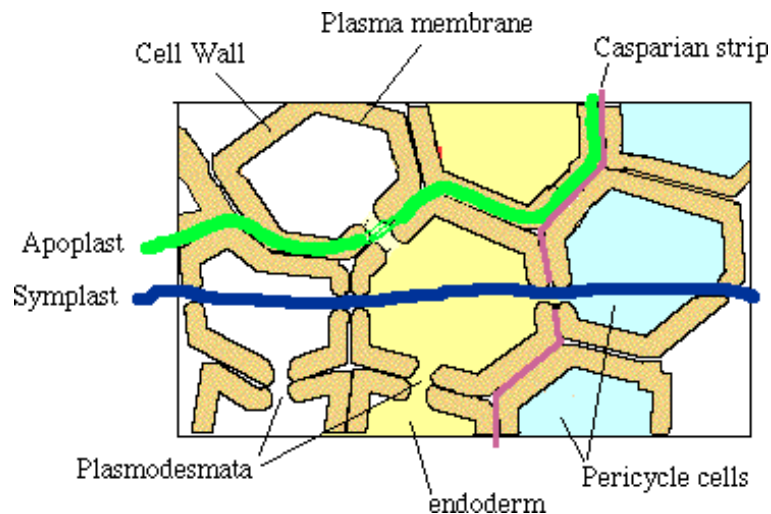
Istovremeno, kada je biomonitoring zemljišta u pitanju (baziran na praćenju sadržaja teških metala u biljnim delovima, pa i samom korenu), pokazalo se da on ne pruža potpuno egzaktnu sliku kontaminacije (Alagić i sar. 2015a, 2019; Mertens i sar. 2005). Međutim, praćenje atmosferskog zagađenja, na osnovu koncentracija ovih metala u nadzemnim biljnim delovima, obično daje sasvim zadovoljavajuće rezultate i pouzdano odražava stanje kvaliteta životne sredine u oblasti od interesa (Alagić i sar. 2015a, 2019; Hofman i sar. 2013; Mingorance i sar. 2007; Simon i sar. 2011, 2014; Tošić i sar. 2016; Weber i sar. 2014).

U svakom slučaju, kada su u pitanju potencijali biljaka za primenu u remedijaciji i monitoringu životne sredine, do danas je ispitan veliki broj biljnih vrsta, a takođe i način na koji one usvajaju i akumuliraju metale u svojim tkivima. Studije objavljene na ove teme u svetskoj literaturi

su brojne, dok je na srpskom jeziku publikovan tek manji broj radova i to pre svega autora Alagić (2014) i Alagić i sar. (2014). Ovi autori su u svojim istraživanjima preglednog tipa, preneli mnoštvo podataka objavljenih u stranoj literaturi i približili domaćoj stručnoj i naučnoj javnosti problematiku o sposobnosti biljaka u uspostavljanju različitih taktika u borbi protiv toksičnih koncentracija metala, koje igraju ključnu ulogu u prilagođavanju i opstanku u agresivnom okruženju. Ova doktorska disertacija se u svom teoretskom i literaturnom delu oslanja ne samo na pomenute domaće izvore, već i na vodeću svetsku literaturu publikovanu pre svega u najnovijem vremenskom periodu, ali isto tako i u periodima samih početaka istraživanja metoda fitoremedijacije i biomonitoringa, ali i hemometrije, koja se sve više pokazuje nezaobilaznom u ovim istraživanjima.

### 2.1.1. Biljna mobilizacija i usvajanje metala preko korena

Dobro je poznata činjenica da svaka pojedina biljna vrsta razvija odgovarajuće sposobnosti za efektivno usvajanje esencijalnih metala iz podloge na kojoj raste, tj. iz zemljišta. Prva živa struktura na putu asimilacije metala od strane biljaka je plazma membrana korena (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009), a najaktivniji deo ovog procesa dešava se na 20 do 40 mm iznad kape samog korena (Alagić i sar. 2015b). Sa ovog mesta, svaka apsorbirana supstanca, pa tako i metalni joni, mogu prelaziti u druge biljne delove i to kako kroz sva živa tkiva (simplast: tkivo floema, ali i citoplazma ćelije, tj. citosol), tako i kroz sva neživa tkiva (apoplast: tkivo ksilema, ali i ćelijski zidovi) (Slika 1.). Kretanje metala kroz simplast teče polako, kroz sam citosol u cm/h, gde se mogu naći blizu važnih konstitutivnih elemenata ćelije, kao što su to enzimi i druge endogene supstance, tj. supstance stvorene od strane same ćelije. Kretanje kroz apoplastični prostor je znatno brže (u m/h) i dešava se pod povećanom pritiskom i uslovima smera transpiracije ka stabljici i konačno - do listova (Alagić i sar. 2015b).



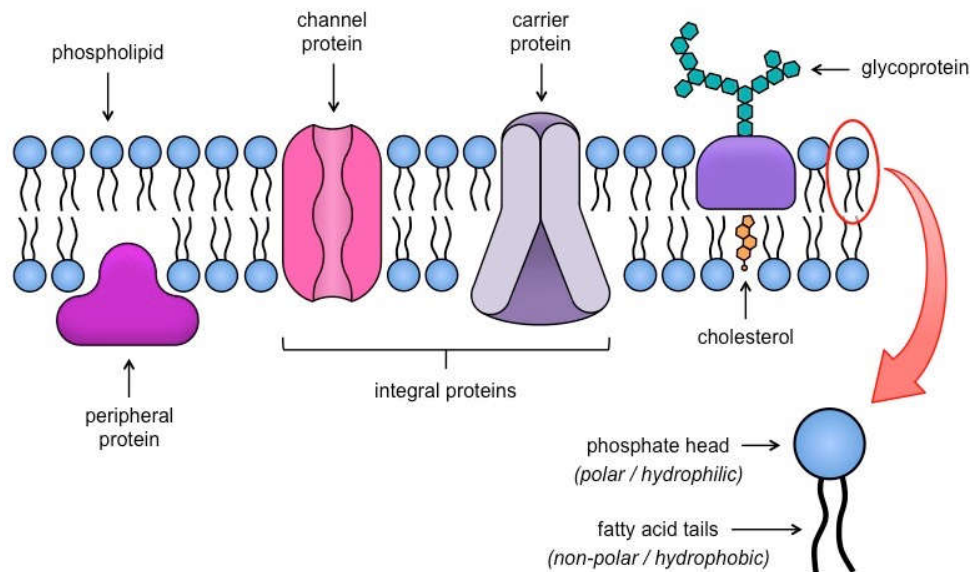
**Slika 1.** Simplast (eng. *Symplast*) i apoplast (eng. *Apoplast*) u biljnom tkivu, sa prikazanim ćelijskim zidom (eng. *Cell Wall*), plazma membranom (eng. *Plasma membrane*), Kasparijevim prostorom (eng. *Casparian strip*), plazmadezmatom (eng. *Plasmodesmata*), endodermisom (eng. *endoderm*) i ćelijama pericikla (eng.

*Pericycle cells*) ([https://lh5.ggpht.com/OtIYHxztZY0/UqbvOYyp5EI/AAAAAAAAAoU/UlunpgMwmqY/Sym\\_vs\\_Apo%25255B12%25255D.gif?imgmax=800](https://lh5.ggpht.com/OtIYHxztZY0/UqbvOYyp5EI/AAAAAAAAAoU/UlunpgMwmqY/Sym_vs_Apo%25255B12%25255D.gif?imgmax=800))

Istaraživanja su pokazala da metali mogu da pređu korensku membranu i uđu u unutrašnjost ćelija korena (Marques i sar. 2009, Peralta-Videa i sar. 2009):

- 1) pasivnim putem - ulaskom vode, apsorpcijom u tkivo simplasta korena, vođeni pre svega gradijentom elektrohemijskog potencijala same membrane i
- 2) aktivno – uz utrošak energije, preko proteina uronjenih u dvostruki lipidni sloj membrane, a koji obezbeđuju prelazak, tj. transport metala kroz samu membranu (takozvani transportni proteini, ili proteini-transporteri) (Slika 2.).

Suman i sar. (2018) navode da se danas, genetskom manipulacijom ovih proteina, mogu poboljšati i sposobnosti biljaka za usvajanje određenih metala.



**Slika 2.** Proteini uronjeni u dvostruki, fosfolipidni (eng. *phospholipid*) sloj membrane: periferni (eng. *peripheral*), glikoproteini (eng. *glycoprotein*) integralni (eng. *integral*) - kanalni i transportni (eng. *channel, and carrier*), sa prikazanom strukturom fosfolipida: polarna/hidrofilna glava (eng. *polar/hydrophilic head*) i nepolarni/hidrofobni rep masnih kiselina (eng. *non-polar/hydrophobic tail*)

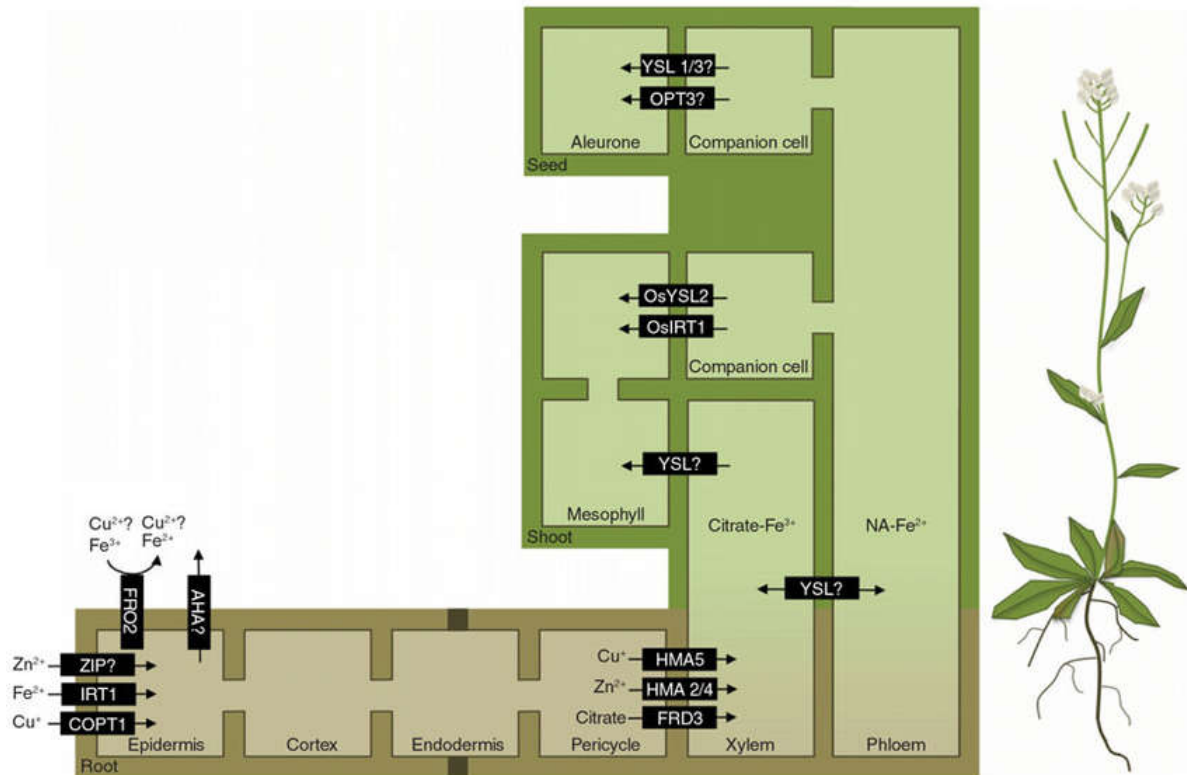
(<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/13-membrane-structure/fluid-mosaic-model.html>)

Praktično, iako joni metala mogu da difunduju u korenski apoplast (prostor između plazma membrane i zida ćelije), njihov dalji prenos je u stvari blokiran takozvanim Kasparijevim prostorom koji je nepropustan i smešten u endodermalnom delu tkiva korena (Slike 1. i 3.). Upravo ovde, metalni joni bivaju dalje prebačeni kroz plazma membranu u simplast na jedan poseban, aktivan način - i ovaj transfer u simplast epidermisa odvija se uz učešće transportnih proteina u membrani (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009).

U pomenutim radovima Alagić (2014) i Alagić i sar. (2014), mogu se naći podaci da su proteini-transporteri svrstani u brojne različite familije, jer su karakteristični po svojoj funkciji i uglavnom su specifični za neki određeni metal, mada ima i onih koji se odnose i na više različitih metala. Na primer, jon  $Fe^{2+}$  se pre svega usvaja visoko specifičnim transporterom IRT1 (eng. *Iron-regulated Transporter Proteins*) iz familije ZIP-proteina (eng. *Zinc-regulated Transporters*) koji služe za transport dvovalentnih jona i kod korena i kod nadzemnog dela, tj., biljnog izdanka. Nedvosmisleno je utvrđeno da je ekspresija (pojava) IRT1 dirigovana (uslovljena) nedostatkom Fe u podlozi, a posle sinteze IRT1, omogućeno je i usvajanje i dalja akumulacija Fe. Sve ovo nameće zaključak o stvaranju IRT1 koje je pod genetskom kontrolom; isti protein prenosi i neke druge dvovalentne metalne jone, ali ne i Zn (Palmer i Guerinot 2009, Verbruggen i sar. 2009). Još uvek nije potpuno jasno koji su to transporteri iz ZIP familije odgovorni za usvajanje Zn u koren, a pretpostavlja se da i Ni koristi isti put ulaska (Slika 3.) (Alagić 2014; Rascio i Navari-Izzo 2011).

ZIP-transporteri zaduženi su i za ulazak neesencijalnih jona  $Cd^{2+}$  u korenske ćelije (ovde postoji čak više ortologa). Dešava se da visoke količine Fe u zemljištu mogu da smanje unos Cd, što ukazuje na kompeticiju ova dva metala prilikom usvajanja (Alagić 2014; Gallego i sar. 2012; Peralta-Videa i sar. 2009). I neki drugi dvovalentni joni metala, poput Ca, Mg, Zn i Cu, takođe mogu da smanje unos Cd, gde Ca ima najizrazitiji uticaj. Pošto joni oba poslednja metala mogu prolaziti kroz ćelijsku membranu i preko katjonskih kanala, to je njihova kompeticija veoma uočljiva i nesumnjiva. U dodatnom, pošto i Zn i Cd mogu biti preneti u biljku istim ZNT1 transporterom (eng. *Zink Transporter*), to je međusobni odnos (Zn/Cd) ova dva metala, izuzetno

značajan za moguće naknadno ispoljavanje toksičnosti samog Cd (Alagić 2014; Gallego i sar. 2012).



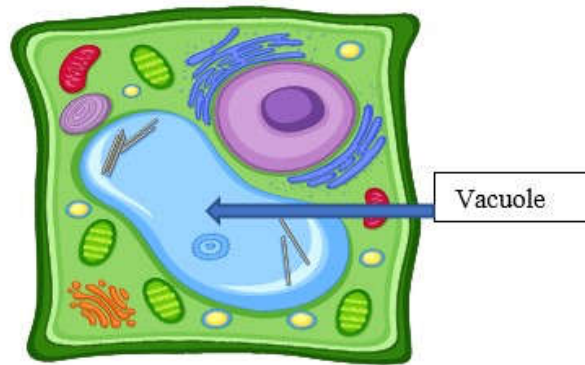
**Slika 3.** Usvajanje i međucelijski transport metala u dikotiledonim biljkama (Palmer i Guerinot 2009) Kvadrat tamno braon boje - Kasparijev prostor; NA – nikotian-amin; FRO2 i AHA – enzimi koji doprinose boljem usvajanju metala; ZIP, IRT1, COPT1, HMAs, FRD3, YSL – proteini transporteri

U odnosu na Fe, Zn i Cd, koji se usvajaju isključivo kao dvovalentni joni, Cu se obično usvaja kao jednovalentni jon,  $\text{Cu}^+$  i to preko proteina transportera, COPT1 (eng. *Copper Transporter*) (Slika 3.). Pošto se Cu u tlu nalazi većinom kao dvovalentni jon, to se on mora prvo izmeniti, tj. redukovati i to uz pomoć enzima FRO2 (feri-helat-reduktaza, koja inače vrši redukciju i  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ ). Ipak, moguće je da se ponekad, u slučajevima nedostatka Cu, ovaj metal usvaja i u formi  $\text{Cu}^{2+}$ , jer je tada primećena akumulacija familije ZIP-proteina (Alagić 2014, 2022; Palmer i Guerinot 2009).

Neesencijalni metaloid As (u petovalentnoj formi) se lako mobilize od strane biljaka i prenosi kroz transportne kanale za fosfate (Alagić i sar. 2013). Naime, zbog njihove velike sličnosti u hemijskom pogledu, As(V) se u procesu usvajanja nadmeće sa fosfatima i tako se i preklapa sa P u mnogim metaboličkim procesima (Peralta-Videa i sar. 2009).

Za Pb, kao još jedan toksičan element, biljke ne poseduju transportne korenske kanale i još uvek nije poznato na koji način ono tačno ulazi u biljku; jedino je poznato i dokazano da Pb može da ostane vezano na karboksilne grupe raznih uronskih kiselina koje se nalaze na korenskoj površini. Apsorbovana količina Pb uglavnom i ostaje na korenu, čineći ga tako prvom preprekom za dalji transport u osetljive nadzemne delove, gde bi njegova toksičnost mogla biti fatalna. Olovo se na ćelijski zid korena najvećim delom vezuje u vidu ekstraćelijskih precipitata karbonata, ili fosfata (Alagić 2014; Peralta-Videa i sar. 2009).

Može se reći da i mnoge druge metalne forme često formiraju sulfatne, karbonatne, fosfatne i druge precipitate. Oni se mogu imobilisati ne samo u apoplastu (kao što je ćelijski zid), već i u simplastu, unutar ćelije, u organelama kao što su to vakuole (Marques i sar. 2009). Vakuole su specifične ćelijske organele (Slika 4.), takozvani rezervoari u kojima se metali mogu neograničeno čuvati, ali se mogu i ponovo iz njih iskoristiti (u vremenima kada dođe do njihove deficijencije u zemljištu) (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009).



**Slika 4.** Lokacija vakuole u okviru ćelije (<https://k3h3a8r8.rocketcdn.me/wp-content/uploads/2023/02/Vacuole.jpg>)

Kako Papludis i sar. (2018) navode u svom preglednom radu, Millaleo i sar. (2010) ističu da se usvajanje Mn putem korena odvija kroz dvofazni proces: početna (I), brza faza je povratna i nemetabolička; u I fazi,  $Mn^{2+}$  se brzo adsorbuje u apoplastičnom prostoru, na negativno naelektrisanim delovima ćelijskog zida, a druga (II) faza odvija se sporo, jer se  $Mn^{2+}$  sporije i izmenjuje. U slučaju prebacivanja  $Mn^{2+}$  u simplast, uočeno je da ono uslovljeno metabolizmom biljke i još uvek nije do kraja osvetljeno, iako postoje indikacije da 4 vrste specifičnih transportnih proteina mogu biti uključene u usvajanje ovog metala. Zabeleženo je da se, u unutrašnjosti ćelije, za Mn, kao i za druge metale, može pokrenuti sistem koji ga sklanja iz citosola i akumulira u vakuolama (Dučić i Pole 2005; Millaleo i sar. 2010; Papludis i sar. 2018).

Iako su, najčešće, metali dovoljno prisutni u zemljištu za potrebe ishrane biljaka, nisu retki slučajevi njihove slabe dostupnosti ovim organizmima. Naime, metali tu postoje (dominantno) u nekim svojim formama koje su slabo rastvorne, ili čak nerastvorne. Tako na primer, Cu i Zn, obično su adsorbovani na česticama gline,  $CaCO_3$ , ili organske materije (OM) zemljišta, dok se Fe najčešće nalazi u obliku svojih hidroksidnih jedinjenja. Uočeno je da, u stvari, usvajanje metala biljkama, više zavisi od takozvanih biodostupnih frakcija metala, a mnogo manje od njihove ukupne količine u podlozi. Tako su Vamerali i sar. (2010) potvrdili da dostupnost metala nedvosmisleno zavisi od faktora kao što su: jačina adsorpcije metala na česticama zemljišta, sposobnost biljaka da desorbuju metale sa čestica i privuku ih do korena, kao i veoma važne interakcije sa mikrobima iz zemljišta. Brojne studije su još pokazale da visoke vrednosti zemljišnih parametara poput kapaciteta izmene katjona (eng. *Cation exange capacity*, CEC) i pH, uglavnom smanjuju dostupnost većine metalnih jona, a samim tim i njihovu mobilnost i izluženje (Alagić 2014, 2022; Alloway 2013; Kabata-Pendias i Pendias 2001; Kabata-Pendias 2011; Palmer i Guerinet 2009).

Da bi se izborile sa otežanom dostupnošću metala, tj. da bi ih učinile lakšim za usvajanje (biodostupnost), biljke su razvile različite taktike. Tako se na primer, monokotiledone biljke tj. biljke iz porodice/familije trava (*Poaceae*), koriste strategijom koja je bazirana na helatizaciji metala, dok se dikotiledone biljke služe strategijom koja menja oksidaciono stanje metala (tj., vrši se njihova redukcija). Konačno, biljke se sa ovom situacijom mogu izboriti i postupkom kao što je zakišeljavanje zemljišta (Alagić 2014; Palmer i Guerinet 2009).

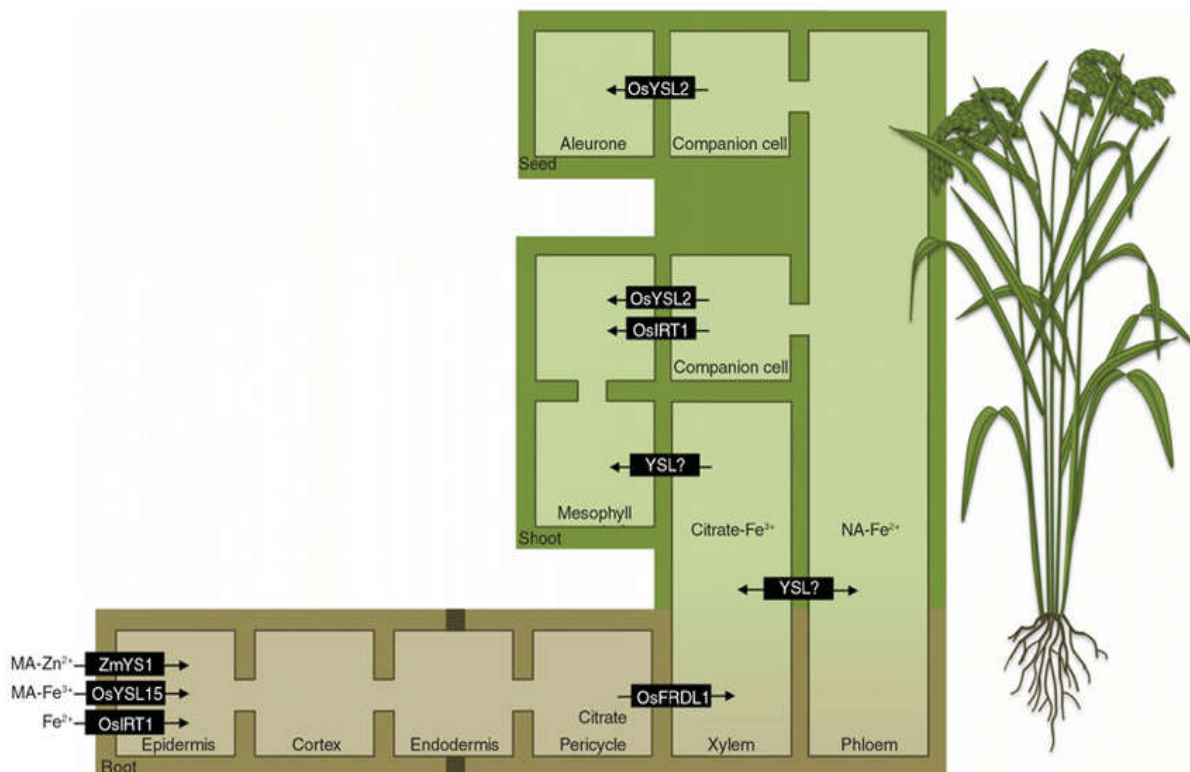
Naime, da bi prevazišle slabu rastvorljivost metala u baznom zemljištu, biljke mogu da iskoriste aktivnost svojih enzima, takozvanih ATP-aza (adenozin-trifosfataze) da isporuče  $H^+$  u neposredno rizosferno zemljišno okruženje i da na taj način snize pH. Kako se pH zemljišta smanjuje, tako povećanje koncentracija  $H^+$  olakšava oslobađanje i zamenu sa jonima metala na česticama zemljišta (Marques i sar. 2009). Primer koji navode Palmer i Guerinet (2009) odnosi se na  $Fe^{3+}$  koje se generiše iz svojih nerastvornih oblika uz izdvajanje molekula vode:



ATP-aze sa ulogom izlučivanja  $H^+$  još nisu tačno uočene, ali postoji pretpostavka da su ovi enzimi neki od brojnih članova AHA-familije (eng. *Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase*) (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009).

Kada je u pitanju strategija bazirana na promeni oksidacionog stanja metala, ona je već u dobrom delu prethodno opisana, tako da je očigledno da proteini transporteri imaju specifičnu sklonost prema određenom oksidacionom stanju svakog metala, a predominantno ih usvajaju u vidu dvovalentnih jona. I dok se Zn u tlu uvek nalazi u  $2+$  oksidacionom stanju, Cu i Fe su prisutni kao  $Cu^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ . Zato se oni prvo moraju redukovati od strane pomenutih odgovarajućih protein transportera COPT1 i IRT1, respektivno, kako bi tako, u redukovanom obliku konačno mogli da prođu u unutrašnjost ćelije korena (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009).

Suprotno strategiji kojom se menaju oksidaciona stanja metala, mnoge biljne vrste iz familije trava, odnosno, monokotiledone biljke, dominantno se služe taktikom helatizacije (Slika 5.). Ona se odnosi na ekskreciju, tj. izlučivanje specifičnih liganada-helatora od strane korena biljke u okolni prostor i pre svega se izlučuju u slučajevima nedostatka Fe. Agensi za helatizaciju, tj. vezivanje  $Fe^{3+}$ -jona radi transfera u koren, nazvani su fitosideroforima (eng. *Phytosiderofore, PS*). Fitosiderofore se u biljkama proizvode iz metionina, pa se klasifikuju kao jedinjenja iz porodice mugineinskih kiselina, MA (eng. *Mugineic Acids*) i postoje mnogi dokazi da je produkovanje gena uključenih u biositezu MA uslovljena nedostatkom Fe. Transfer nagrađenog helatnog kompleksa Fe i MA ( $Fe-MA$ ), obavlja se preko membranskog transportnog proteina YS1 (eng. *Yellow-stripe 1-like*) (Alagić 2014, 2022; Palmer i Guerinot 2009).

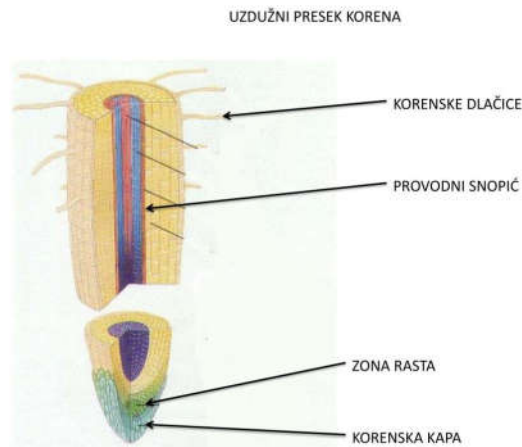


**Slika 5.** Usvajanje i međucelijski transport gvožđa i drugih metala u monokotiledonim biljkama (Palmer i Guerinot 2009)

Kvadrat, tamno braon boje - Kasparijev prostor; NA – nikotian-amin; MA - mugineinska kiselina;  $MA-Zn^{2+}$  i  $MA-Fe^{3+}$  - siderofore koje doprinose boljem usvajanju Fe, ali i drugih metala; IRT1, FRDL, YSL– proteini transporteri

Za kultivisane biljke iz familije trava, uključujući pšenicu, kukuruz i ovas, izlučivanje PS se odigrava u apikalnoj zoni korena (Slika 6.) i to nekoliko sati posle sumraka (obično traje 4–6 h) (Yoshida i sar. 2004). Kada su jednom izlučene, PS uzimaju učešće u geohemijskim procesima

tokom kojih se biljke mogu snabdeti gvoždem iz rizosfernog rastvora. Procesi koji imaju uticaja na usvajanje Fe su: količina izlučivanja PS (eng. *PS-exudation rate*), oslobađanje Fe iz zemljišta (eng. *Fe-release rate from the soil*), rastvorljivost različitih formi Fe u zemljištu, degradacija PS-liganda, kompetitivno kompleksiranje drugih metala (Zn, Cu, itd.), kao i adsorpcija PS-liganda i metal-PS kompleksa (Walter i sar. 2016).



Slika 6. Delovi korena sa apikalnom zonom (<https://image3.slideserve.com/5587483/slide6-1.jpg>)

Kod izvesnih vrsta duvana, jedinjenja iz porodice MA takođe igraju važnu ulogu i u mobilizaciji Zn (Palmer i Guerinot 2009), a kod drugih biljaka tu se uključuju i Cu, Ni, Co, Mn i Cd (Walter i sar. 2016). Walter i sar. (2016), smatraju da se, u zemljištu, ovi metali takmiče sa Fe u kompleksaciji sa PS ligandom, smanjujući tako mobilizaciju Fe (naročito Cu može smanjiti vreme usvajanja Fe, kao i količinu Fe). Međutim, sa druge strane, Palmer i Guerinot (2009) smatraju da kod usvajanja Cu, još uvek ne postoje pouzdani podaci da PS igraju bilo kakvu ulogu. Interesantno je da YS1 proteini transportuju i helate Cd kroz korensku membranu (Gallego i sar. 2012), a posebno je važno da su članovi ove familije uključeni u distribuciju metala i kasnije, kroz biljna tkiva (Verbruggen i sar. 2009).

### 2.1.1.1. Transport koren-nadzemna tkiva

Metali se moraju transportovati, tj. translocirati iz korena do nadzemnih tkiva i to onih u kojima su neophodni za normalno funkcionisanje biljke. Iz korenskih epidermalnih ćelija, joni metala se dalje kreću kroz prolaze simplastičnih tkiva do pericikla, kako bi posle toga bili ubačeni u ksilem (Slika 3.) (Alagić 2014; Verbruggen i sar. 2009). Ovo se ostvaruje jedino aktivnim transportom. Kroz ksilem, metali se dalje kreću transpiracionim tokom, do nadzemnih organa (Palmer i Guerinot 2009).

U slučaju Fe, još uvek nije poznat transporter koji ga prenosi u ksilem, ali je najverovatnije da se do drugih molekula ono prenosi u helatnom obliku. Kao mogući helatori, ističu se citrati i nikotian-amin, NA. Ovaj molekul nađen je u svim vaskularnim biljkama i igra ulogu prekursora u nastajanju PS kod *Poacea*. Ipak, pH ksilema više odgovara helatizaciji Fe sa citratima (kao  $\text{Fe}^{3+}$ -citrati), nego sa NA (Slike 3. i 5.). Protein koji isporučuje citrat u ksilem, feri-reduktaza, FRD3, smešten je na plazma-membrani pericikla korena i vaskularnog cilindra i poznat je uopšteno kao transporter citrata. Uočeno je da biljke kod kojih izostaju ovi proteini, akumulacija Fe obično se vrši u tkivu korena (Palmer i Guerinot 2009).

Cink se prenosi u ksilem na dugodometni transfer uz HMA2 transportere (eng. *Heavy Metal transporting ATP-ases*, HMAs), koji su smešteni na plazma membrani, između korena i nadzemne vaskulature (Slika 3.). Ovi proteini su podeljeni u dve grupe: proteini koji prenose monovalentne katjone (Cu/Ag klasa) i oni koji prenose divalentne katjone (Zn/Co/Cd/Pb klasa) (Gallego i sar. 2012). Pretpostavlja se da su ligandi koji bi mogli da transportuju Zn u nadzemne delove i neke organske kiseline i takođe NA (Palmer i Guerinot 2009).



Eksperimenti su pokazali da isporuka Cu u vaskulaturu postoji i kroz HMA porodicu proteina. Naime, kroz eksperimente se uočilo da se ekspresija HMA5 pojavljuje u korenu samo kada su prisutne previsoke koncentracije ovog metala u tom delu biljke i nagomilavanjem HMA5, biljka uspeva da ove velike količine prevede iz korena u nadzemne organe. Bakar se tada pre svega helatizuje sa NA (Palmer i Guerinot 2009).

Dalji prenos Mn iz korena pa naviše, slična je kao i kod ostalih dvovalentnih metala, tj. odvija se u ksilemu, transpiracionim tokom, dok je, međutim, prenošenje u floemu mnogo selektivnije (smerom od izvora do mesta deponovanja). Uočeno je i da se Mn slabo kreće u floemu, a da njegova redistribucija zavisi pre svega od vrste biljke, ali i od njene faze zrelosti (Dučić i Pole 2005; Millaleo i sar. 2010; Papludis i sar. 2018). U biljnim fluidima, posle usvajanja, Mn se nalazi i transportuje i kao slobodan dvovalentni katjon,  $Mn^{2+}$ . U ekskudatima floema, kompleksi Mn sa organskim ligandima, su nedvosmisleno detektovani (Dučić i Pole 2005; Papludis i sar. 2018).

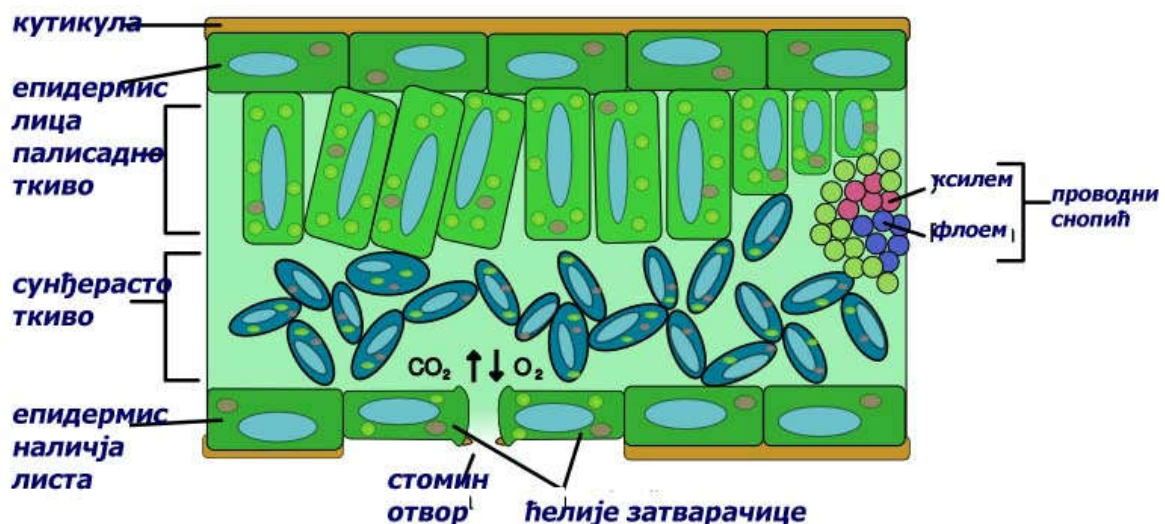
Čak i Pb se može translocirati u nadzemne delove, mada ga biljke uglavnom, kao ekstremno toksičan metal, pokušavaju da zadrže u korenu, gde će napraviti najmanju štetu. Neke biljke transportuju Pb do stabljika i listova u formama poput Pb-acetata, Pb-nitrata i Pb-sulfida (Peralta-Videa i sar. 2009).

### 2.1.1.2. Transport u okviru ćelije

Kako bi se osigurale neophodne količine metala u ćeliji, ili pak kako bi se bezbedno uklonili njihovi viškovi, metali se posle transportovanja u odgovarajuće biljno tkivo, moraju ispravno distribuirati i na nivou ćelije. Tako, Cu, Zn i Fe se, kroz citosol, mogu preneti do mitohondrija, hloroplasta, ali i vakuola (Slika 4.), što je sve takođe omogućeno pojavom odgovarajućih transportnih proteina (Alagić 2014; Palmer i Guerinot 2009).

### 2.1.2. Biljno usvajanje metala preko listova

Kao što je već naglašeno, osim preko korena, biljke mogu usvajati metale i preko listova (Slika 7.), pa se lišće (ali i neki drugi uglavnom, zeleni biljni delovi) viših biljaka mogu koristiti za uklanjanje metala iz atmosfere (Kirkham 2006).



Slika 7. Shema tkiva u listu sa prikazanim stominim otvorima

(<https://biologijass.wordpress.com/2012/11/11/%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE%D1%81%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%B5%D0%B7%D0%B0/>)

Međutim, nivo uklanjanja u ovom slučaju nije tako značajan, te se ova pojava više primenjuje u različitim procedurama biljnog-, ili fito-monitoringa, a sve češće i u svrhe postavljanja takozvanih

prirodnih barijera u urbano/industrijskim sredinama sa izrazito zagađenim vazduhom (Alagić i sar. 2013, 2015a, 2019; Alagić 2022; Dimitrijević i sar. 2016; Nujkić i sar. 2016; Tošić i sar. 2016; Weber i sar. 2014). Ovo je takođe važno imati u vidu i u poljoprivredi, prilikom primene folijarnih đubriva, a posebno za metale iz grupe potencijalno toksičnih, koji se preko lanaca, ili mreže lanaca ishrane mogu dalje akumulirati i u ljudskom organizmu gde mogu naneti veliku štetu po zdravlje (Ličina i sar. 2017; Rogan Šmuc i sar. 2012; Savic i sar. 2015).

Snabdevanje biljaka svim vrstama metala po pravilu ide sa donje, abaksijalne strane lista, na kojoj su smeštene takozvane ćelije otvaračice-zatvaračice, tj. stome, a koje prevashodno služe za transpiraciju gasova, CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> (Kvesitadze i sar. 2006) (Slika 7.).

Preko stomatarnog aparata, lišće može da usvaja metale relativno lako, kao i da ih dalje akumulira unutar lisnog tkiva (Oliva i Mingorance 2006; Simon i sar. 2014), tako da se može konstatovati da je sadržaj metala u lišću u stvari posledica dva izvora snabdevanja – vazduha, ali i podloge na kojoj biljka raste (Alagić i sar. 2015a; Alagić 2022). Usvajanje metala dirigovano je pre svega morfologijom površine lista, pa tako postoje biljke čiji su listovi izrazito prijemčivi ka apsorpciji metala iz vazduha i kao takve, one predstavljaju najbolji izbor za bioindikatore zagađenja ovom vrstom polutanata (Kabata-Pendias i Pendias 2001).

### **2.1.3. Različite uloge biljaka u procesima fitoremedijacije i biomonitoringa teških metala**

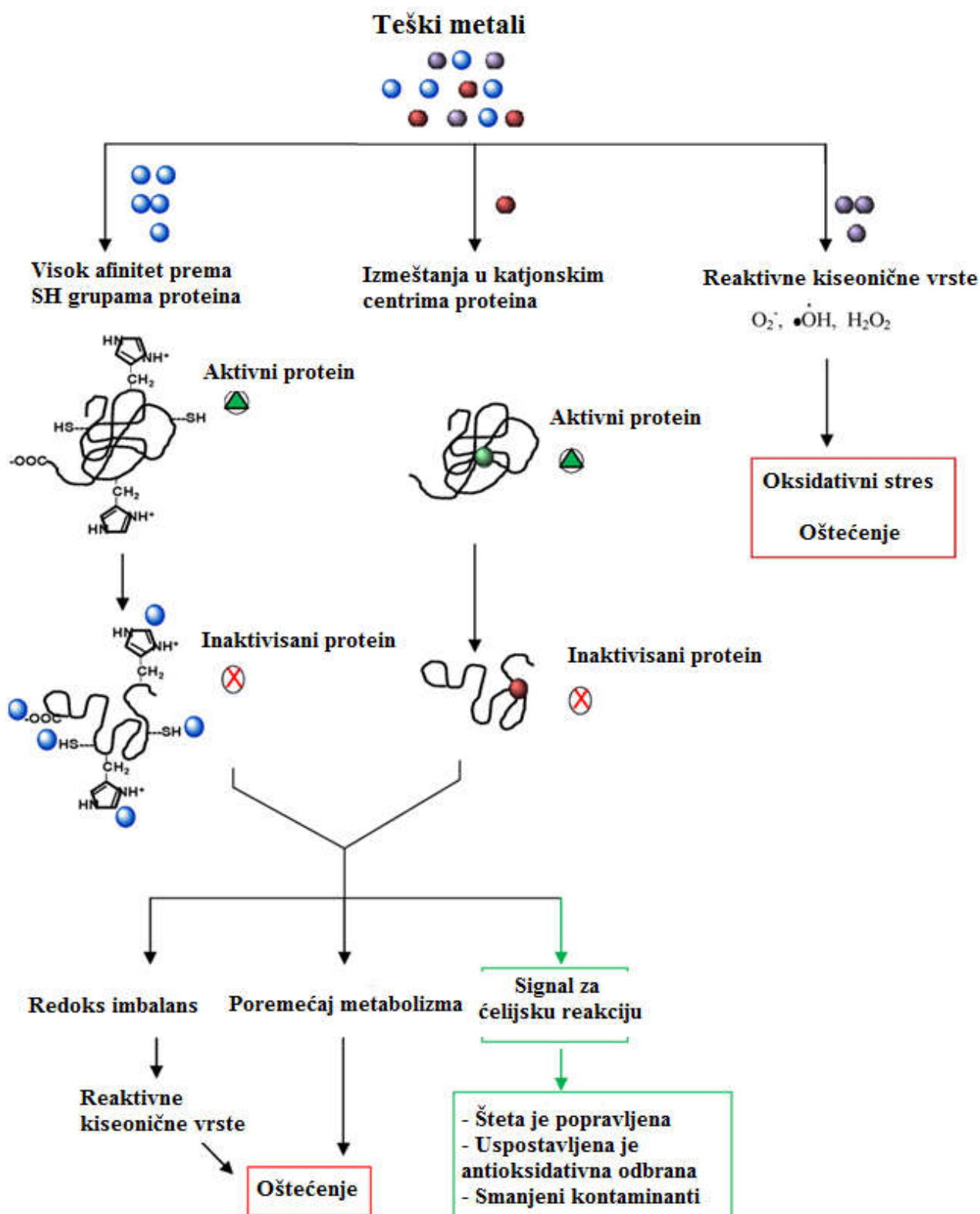
#### **2.1.3.1. Taktike biljaka u borbi protiv toksičnih efekata metala kao ključni činilac efikasnog fitoremedijacijskog procesa**

U biljkama koje su pod stresom izazvanim metalima/metaloidima, dešavaju se brojne biohemijske reakcije. Većina ovih reakcija je posledica izmene metala u katjonskim centrima proteina, zatim velike sklonosti za vezivanje na tiolne grupe molekula koji su važni u metabolizmu (obično se radi o blokadi funkcionalnih grupa enzima i proteina), ili pak povećanja proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS, koje su posebno opasne slobodno-radikalne forme) (Slika 8.) (Alagić 2014, 2022; Flora i sar. 2008; Peralta-Videa i sar. 2009; Rascio i Navari-Izzo 2011).

Stvaranje slobodno-radikalnih formi je efekat koji se javlja u svim situacijama stresa koji se mogu naći u biljnom okruženju kao što su: visoki salinitet zemljišta, temperature koje idu u ekstreme, suša, invazija različitih patogena, kao i previsoke koncentracije metala (Bhaduri i Fulekar 2012). Kao krajnji rezultat nastalog oksidativnog stresa, dolazi do akumulacije molekula ROS, koji dalje aktiviraju odbrambeni mehanizam u biljci; može se smatrati da ROS imaju dvojaku ulogu: oni deluju i kao molekuli koji izazivaju oksidaciju drugih važnih molekula i posebno agresivno reaguju sa makromolekulima u ćeliji, ali i kao signalni molekuli koji doprinose da biljka oseti prisustvo metala (Slika 8.). Praktično, biljci je neophodno da oseti te fine promene u metalnim koncentracijama u svojim tkivima, odnosno, promene koje se odigravaju, pre svega, već na nivou citosolnih koncentracija i koncentracija u organelama, a sve to zbog pripreme za detoksifikaciju. Biljka u ovim procesima može koristiti i enzimske (na primer superoksid-dismutaza, SOD, katalaza, idr. enzimi) i neenzimske molekule (askorbat i glutation, GSH) koji imaju sposobnost veoma efikasne detoksifikacije ROS (Alagić 2014; Bhaduri i Fulekar 2012; Lin i Aarts 2012; Rascio i Navari-Izzo 2011).

Međutim, često, kod enormnih izloženosti, ma koji od pomenutih poremećaja, može dovesti i do uginuća biljaka. I dok ljudi i životinje imaju sposobnost kretanja, pa mogu da izbegnu kontaminirane predele, sa biljkama kao stacionarnim organizmima to nije slučaj, tako da su one pribegle drugim vrstama strategija kako bi mogle da se izbore sa ovim problemom (Alagić i sar. 2018a, 2019; Lin i Aarts 2012; Bačeva i sar. 2014). Pojedine biljne vrste su u tome imale toliko uspeha, da su se razvile u takozvane tolerantne vrste, odnosno vrste koje mogu opstati i razvijati se i na teško zagađenim terenima (Alagić i sar. 2013; Antonijević i sar. 2012; Maric i sar. 2013). Mnoge studije pokazale su da te posebne biljne vrste ostvaruju ovo stanje prilagođavanjem svojih mehanizama koji su uključeni u homeostazu. Strategije usvojene od strane biljaka kao odgovor na

visoke koncentracije teških metala u okruženju, regulisana je na nivou molekula i ogledaju se u različitim mehanizmima koji pre svega kreću sa celularnog nivoa (Hall 2002).



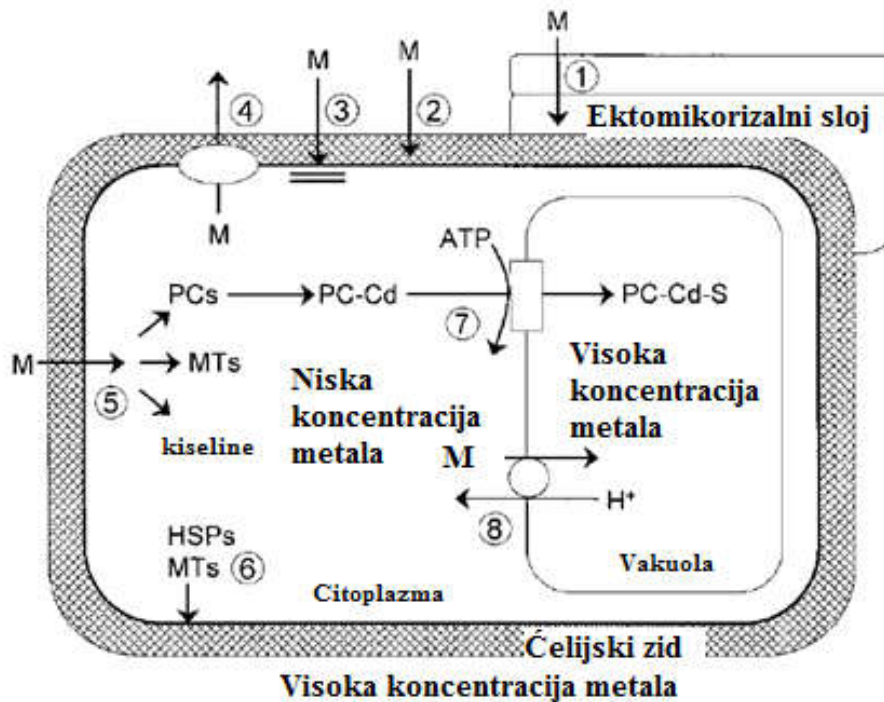
**Slika 8.** Toksični efekti teških metala u biljkama. Afinitet teškog metala za vezivanje na proteine promeniće njihovu aktivnost i prouzrokovati disbalans i prekide koji vode do makromolekularnih oštećenja. Međutim, ćelije se mogu "podesiti" prema toksičnim metalima i signalizirati određene reakcije kako bi prevenirale oštećenja (Alagić 2014, adaptirano iz Peralta-Videa i sar. 2009)

Ljubičaste sfere - metali koji imaju oksido-redukcione sposobnosti; crvene i plave sfere - metali koji ne poseduju ove sposobnosti; zelene sfere - metalni centri u proteinima napadnuti od strane teških metala

### 2.1.3.1.1. Strategije biljaka u borbi protiv toksičnosti metala na nivou ćelijskih mehanizama

Iste one osobine PTM koje ih čine toliko esencijalnim za rast i razvoj biljke, mogu ih učiniti i izuzetno toksičnim kada prođu u unutrašnjost ćelije, a što je još očiglednije na primerima tipičnih teških metala. Na sreću, kako je Hall (2002) izložio, biljke mogu izgraditi više ćelijskih mehanizama koji postaju deo procesa detoksifikacije i tolerancije prema stresu koji izazivaju toksične koncentracije metala (Slika 9.), kao na primer:

1. korišćenje gljiva mikoriza koje ograničavaju kretanje metala ka korenu,
2. povezivanje metala na zid ćelije i izlučivanje ekstracelularnih ekskudata korena,
3. ograničeno usvajanje, ili čak ispumpavanje eventualno usvojenih viškova metala na membrani korena,
4. helatizacija metala u citoplazmi različitim ligandima (obično peptidi koji sadrže cistein: fitohelatini, PC i metalotioneini, MT, kao i neke amino- i organske kiseline) zbog:
  - popravke stresom oštećenih proteina membrane (MT i proteini indukovani toplotnim šokom, HSP (eng. *Heat Shock Proteins*,)) i
  - smeštanje (takozvana kompartmentacija) metala u vakuole pomoću PC i to transporterima iz tonoplasta (na primer: izmenjivač  $H^+$  sa metalnim jonima, poznat kao antiporter,  $H^+$ /katjon metala; to je protein koji je sastavni deo membrane vakuole i obezbeđuje aktivni transport dva pomenuta jona u suprotnim smerovima, tj. omogućuje njihovu razmenu između ograničenog prostora vakuole i citoplazme).



**Slika 9.** Potencijalni biljni celularni mehanizmi detoksifikacije i tolerancije na metale (Alagić 2014, adaptirano iz Hall 2002)

M - metal; PCs – fitohelatini; MTs – metalotioneini; HSPs - proteini indukovani toplotnim šokom

### 2.1.3.1.2. Strategije biljaka u borbi protiv metalnog stresa vezano za mehanizme postizanja rezistentnosti/tolerantnosti prema istim

U preglednom radu Alagić i sar. (2014), izneta je činjenica da se po mnogim istraživačima, kao što su Peralta-Videa i sar. (2009), Bhargava i sar. (2012) itd., biljke koje se dobro adaptiraju i opstaju na podlozi zasićenju metalima, grupišu kao:

- 1) Ekskluderi - biljke koje ne dozvoljavaju unos fitotoksičnih metala unutar korenskih ćelija; u njima se koncentracije metala u nadzemnim organima održavaju ispod kritičnih vrednosti, tj., na

jednom veoma niskom nivou u odnosu na njihove koncentracije u zemljištu. Ovaj tip biljaka može biti upotrebljen za stabilizaciju zemljišta, kao i za sprečavanje daljeg širenja kontaminacije (što je obično povezano sa erozijom zemljišta).

2) Akumulatori - biljke u kojima se metali akumuliraju pre svega u nadzemnim delovima. Oni ne preveniraju ulazak metala u ćelije korena, tako da bioakumulacija visokih koncentracija metala u njihovim tkivima može biti na značajnom nivou.

3) Indikatori - biljke kod kojih unutrašnje koncentracije (u tkivima) proporcionalno reflektuju eksterne (spoljašnje) koncentracije, te se često mogu upotrebiti u raznim procesima biomonitoringa.

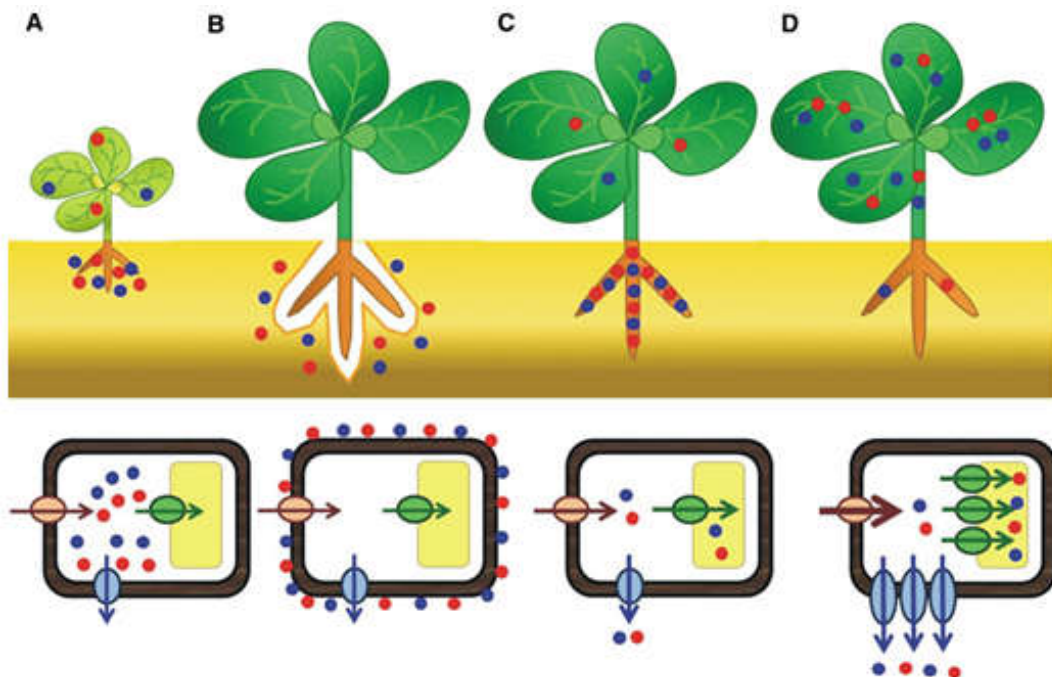
Iz istog preglednog rada (Alagić i sar. 2014), uočava se da, uzimajući u obzir mehanizme kojima se biljke mogu poslužiti u postizanju svoje rezistentnosti/tolerantnosti prema metalnom stresu, tj. u redukovanju negativnih efekata toksičnosti metala, autori Lin i Aarts (2012) objašnjavaju da se sve one u stvari klasifikuju u 4 grupe (Slika 10.):

1) biljke osetljive/senzitivne prema metalima (eng. *metal-sensitive species*),

2) biljke otporne/rezistentne prema metalima, nazvane ekskluderima (eng. *metal-resistant excluder species*),

3) nehiperakumulatori, biljke tolerantne prema metalima (eng. *metal-tolerant nonhyperaccumulator species*) i

4) hiperakumulatori, biljke hiper-tolerantne prema metalima (eng. *metal-hypertolerant hyperaccumulator species*).



**Slika 10.** A. Biljke osetljive na teške metale, koje ne mogu sprečiti njihov ulazak u koren, niti mogu sprečiti transport metala do izdanka. B. Metal-rezistentni ekskluderi, koji su sposobni da drže metale van domašaja korena, ili da obezbede brz efluks u slučaju ulaska prevelikih koncentracija u ćelije korena. C. Metal-tolerantne nehiperakumulatorske biljke, u kojima metali ulaze u ćelije korena, gde se predominantno vrši njihova sekvenciracija u vakuole, a čime se sprečava dalja translokacija kroz stablo. D. Metal-hipertolerantne hiperakumulatorske biljke, u kojima se metali aktivno usvajaju kroz koren i u velikim količinama ubacuju u ksilemu. U zelenim delovima izdanka, metali se bezbedno odlažu (sekvenciraju) u vakuolama (Alagić i sar. 2014, adaptirano iz Lin i Aarts 2012);

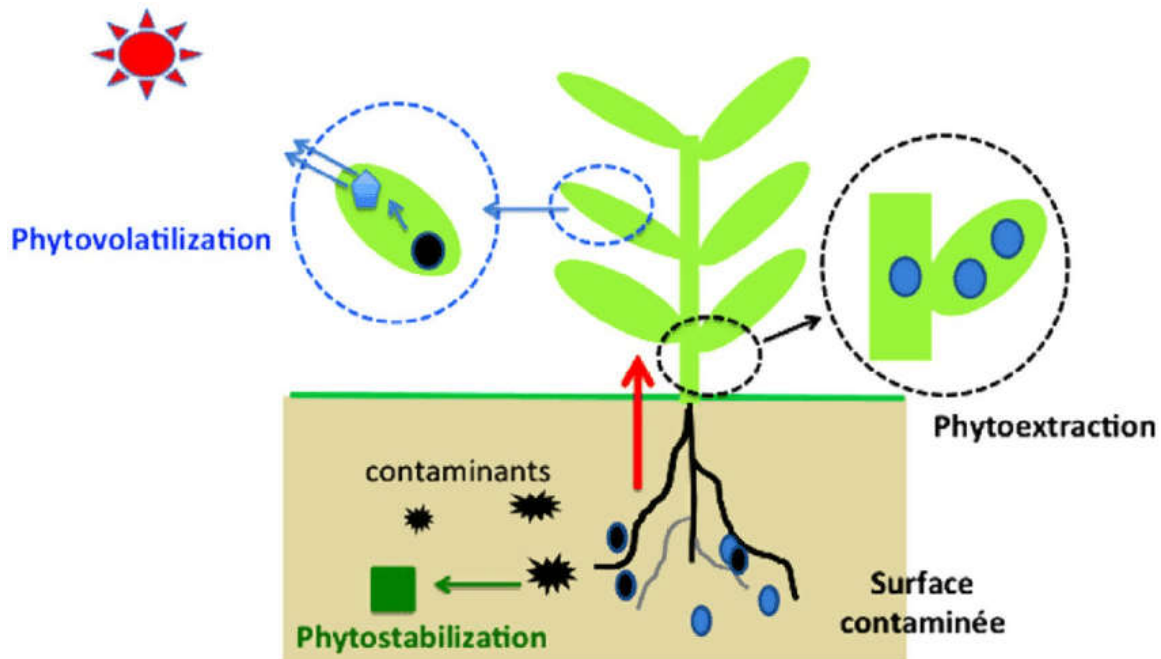
Zn - plave sfere; Cd - crvene sfere

Vrste koje koncentrišu metale u svojim nadzemnim tkivima, najkorisnije su za primenu u fitoremedijaciji i fitorudarenju (uzgajanje biljaka radi izlučivanja metala) (Alagić i sar. 2013, 2014, 2019; Antonijević i sar. 2012; Maric i sar. 2013). Međutim, pošto su brojni metali takođe i

esencijalne hranljive materije za biljke, onda se zaštita hrane i fitoremedijacija mogu posmatrati kao "dve različite strane jedne iste medalje" (Alagić i sar. 2014; Rascio i Navari-Izzo 2011).

#### 2.1.4. Metode fitoremedijacije

U osnovi, fitoremedijacija zemljišta je uglavnom proučavana kroz dve glavne tehnike: 1) fitoekstrakciju (apsorpcija metala do korena biljaka i dalje translokacije i akumulacije u izdancima, odnosno u nadzemnoj biomasi) i 2) fitostabilizaciju (bazirana na specifičnim sposobnostima korena biljaka da stabilizuju/imobilisu metale u zemljištu) (Guarino i sar. 2019; Petrović i sar. 2021). Mnogo ređe, kao metoda za uklanjanje metala iz zemljišta, koristi se i takozvana fitovolatilizacija (Marques i sar. 2009) (Slika 11.).



Slika 11. Glavne metode remedijacije teških metala: fitoekstrakcija (eng. *Phytoextraction*), fitostabilizacija (eng. *Phytostabilization*) i fitovolatilizacija (eng. *Phytovolatilization*)  
Zagađujuće materije (eng. *contaminants*); Zagađena površina (eng. *Surface contaminee*) (<https://cid-inc.com/blog/advances-in-phytoremediation/>)

##### 2.1.4.1. Fitostabilizacija

Fitostabilizacija je fitoremedijaciona metoda koja se primenjuje tamo gde fitoekstrakcija nije moguća, ili poželjna. Ona se odnosi na upotrebu biljaka u imobilizaciji teških metala u zemljištu, zatim u smanjenju pokretljivosti metala (i posledično – bioraspoloživosti), kao i u smanjenju mogućnosti ulaska metala u lanac ishrane (Guarino i sar. 2019; Marques i sar. 2009). Biljke obično postižu ove ciljeve izlučivanjem specifičnih organskih jedinjenja iz korena koja mogu da vežu metale u zemljištu, ili saradnjom sa mikrobima iz rizosfere (Lin i Aarts 2012). Može se reći da korenje biljaka igra esencijalnu ulogu u fitostabilizaciji jer gusti korenski sistemi i fizički stabilizuju zemljište (prevencija erozije), ali i smanjuju prodiranje vode kroz slojeve zemljišta, dodatno umanjujući ispiranje metala (Guarino i sar. 2019; Marques i sar. 2009). Ono što je najvažnije, korenje biljaka obezbeđuje površine za sorpciju, ili taloženje metala, što sve pomaže u sprečavanju širenja metalnog zagađenja, a naročito akumulacija u samom korenu (Alagić i sar. 2013; 2015a).

Prema Marques-u i sar. (2009), a i Guarino i sar. (2019), tokom procesa fitostabilizacije najvažniji su: sama biljka, njoj pridruženi mikroorganizmi, kao i takozvani "poboljšivači" koji se mogu dodati u sistem. Ovi autori su izvestili da izmene tla korišćenjem raznih hemikalija (dodataka,

tj. aditiva) mogu pomoći u inaktivaciji teških metala, sprečavanju njihove asimilacije od strane biljaka i opadanju biološke aktivnosti.

#### 2.1.4.2. Fitoekstrakcija do akumulacije i hiperakumulacije

Može se reći da su fitoekstrakcija i akumulacija do hiperakumulacije, zasnovane na sposobnosti biljaka da preuzimaju, translociraju i akumuliraju metale u nadzemnim delovima, koji se kasnije mogu sakupiti i odložiti, ili tretirati u smislu luženja metala različitim tehnološkim postupcima (Alagić i sar. 2013; Fernandez i sar. 2008; Kadukova i sar. 2008; Marić i sar. 2013). Uspeh fitoekstrakcije zavisi od sposobnosti biljke da apsorbuje i prenosi metale iz zemljišta u nadzemne delove, kao i od kapaciteta akumulacije izdanaka. Najbolji potencijali za akumulaciju metala u izdancima primećeni su u relativno malom broju biljaka, a one su poznate kao hiperakumulatori (Alagić i sar. 2014; Perlatti i sar. 2015; Rascio i Navari-Izzo 2011; da Silva i sar. 2017; Suman i sar. 2018; Vameralli i sar. 2010). Velika većina identifikovanih biljaka hiperakumulatora uglavnom potiču iz grupe zeljastih divljih vrsta, ograničenih na njihovim izvornim staništima, sa plitkim korenovim sistemom, sporom stopom rasta i niskim prinosom biomase (Rascio i Navari-Izzo 2011). Ove biljne vrste su obično sitniji korovi koji mogu da rastu u zemljištima bogatim metalima, bez razvijanja toksičnih simptoma (Alloway 2013; Petrović i sar. 2021).

Kako se navodi u radu (Alagić i sar. 2014), Marques i sar. (2009), su definisali da idealna biljka za fitoekstrakciju treba da: bude tolerantna na visoke nivoe metala, ima brzu stopu rasta, ima bogat korenski sistem, proizvodi visoku biomasu i akumulira visoke nivoe metala u delovima za berbu (obično - u nadzemnim delovima, iako se ponekad može ubirati i korenje nekih biljaka).

Hiperakumulatorske biljke imaju sposobnost da akumuliraju abnormalno visoke nivoe metala u svojim nadzemnim delovima, kako je već pomenuto - bez ispoljavanja simptoma toksičnosti (Alagić i sar. 2013; Peralta-Videa i sar. 2009, Suman i sar. 2018). Neke od prvih nađenih biljaka hiperakumulatora su one koje hiperakumuliraju Ni (Alagić i sar. 2014). Kako navode Marques i sar. (2009), prva precizna definicija hiperakumulacije Ni data je na sledeći način: „Hiperakumulator Ni je biljka u kojoj je zabeležena koncentracija Ni od najmanje 1000 mg/kg u suvoj materiji bilo kog nadzemnog tkiva u najmanje jednom primerku koji raste u svom prirodnom staništu”. Brojni autori (Liu i sar. 2018; Suman i sar. 2018), smatraju da bi ovu istu količinu trebalo da akumuliraju i hiperakumulatori Cu, Pb i As, dok akumulacija za Zn i Mn treba da bude veća od 10000 mg/kg; konačno, hiperakumulatori Cd moraju da usvoje više od 100 mg/kg suve materije, SM (eng. *Dry Weight, DW*) (Tabela 3.).

**Tabela 3.** Sadržaji metala u biljkama (mg/kg SM) definisani radi dodele statusa akumulatora, ili hiperakumulatora (Alagić i sar. 2014, Boyd 2007)

Element	Prag za akumulatore (mg/kg)	Prag za hiperakumulatore (mg/kg)	Broj hiperakumulatorskih vrsta
As	-	1000	Nije zabeležen
Cd	20	100	1
Co	20	100	28
Cr	50	100	Nepoznat
Cu	100	1000	37
Mn	2000	10000	9
Ni	100	1000	317
Pb	100	1000	14
Se	10	1000	20
Zn	2000	10000	11

Do sada je otkriveno oko 450 - 500 vrsta hiperakumulatora iz 101 familije biljnih vrsta, od kojih je 45 vrsta angiospermi; najviše su to članovi familija *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Flacourtiaceae*, *Cyperaceae*, *Cunouniaceae*, *Violaceae* i *Euphobiaceae*. Neke od najuspešnijih vrsta, nabrojane su u Tabeli 4. Posebno su interesantne vrste iz familije *Brassicaceae*, sa rodovima *Thlaspi* i *Alyssum*, kod kojih je uočena akumulacija čak

nekoliko vrsta metala (Alagić i sar. 2014; Sarma 2011; Vamerali i sar. 2010). Skoro 25% detektovanih vrsta hiperakumulatora su članovi porodice *Brassicaceae* (Rascio i Navari-Izzo 2011; Suman i sar. 2018).

Najpoznatija hiperakumulatorska biljka je *Noccea pennycress* (stari naziv: *Thlaspi caerulescens*), koja može da akumulira ogromne količine Cd (1800 mg/kg) i Zn (39 600 mg/kg), bez vidljivijih oštećenja (Bhargava i sar. 2012; Rascio i Navari-Izzo 2011). Ova sitna, diploidna biljka može uspešno da raste i u laboratorijskim, eksperimentalnim, uslovima, što je čini izvanrednim modelom za istraživanje mehanizama usvajanja/akumulacije/tolerancije metala koji su povezani sa fitoekstrakcijom. *Brassica juncea* je biljka koja je takođe često služila za ispitivanje fiziologije i biohemije biljaka prilikom akumulacije metala (Bhargava i sar. 2012).

Nikal može da se akumulira u preko 75% vrsta biljaka, dok je samo 5 njih pronađeno za Cd. Hiperakumulatori Zn su *Arabidopsis halleri* i različite *Thlaspi* vrste, kao i *Sedum alfredii*. Četiri vrste koje pored Zn, hiperakumuliraju i Cd su *A. halleri* i *S. alfredii*, kao i *T. caerulescens* i *T. praecox*. Odnedavno je i *Solanum nigrum* prepoznat kao peta vrsta koja hiperakumulira Cd. Neke angiosperme, kao što su *Hesperis persica* i *B. isatis cappadocica*, ali i neke vrste paprati iz roda *Pteris*, prepoznate su kao hiperakumulatori As (Alagić i sar. 2014; Rascio i Navari-Izzo 2011). "Environment Canada" objavila je bazu podataka pod nazivom "Fitoterm" koja čini listu od preko 750 kopnenih i vodenih biljaka sa odličnim potencijalom za fitoekstrakciju (Sarma 2011).

**Tabela 4.** Biljne vrste pogodne za remedijaciju teških metala (Alagić i sar. 2014, adaptirano iz Sarma 2011)

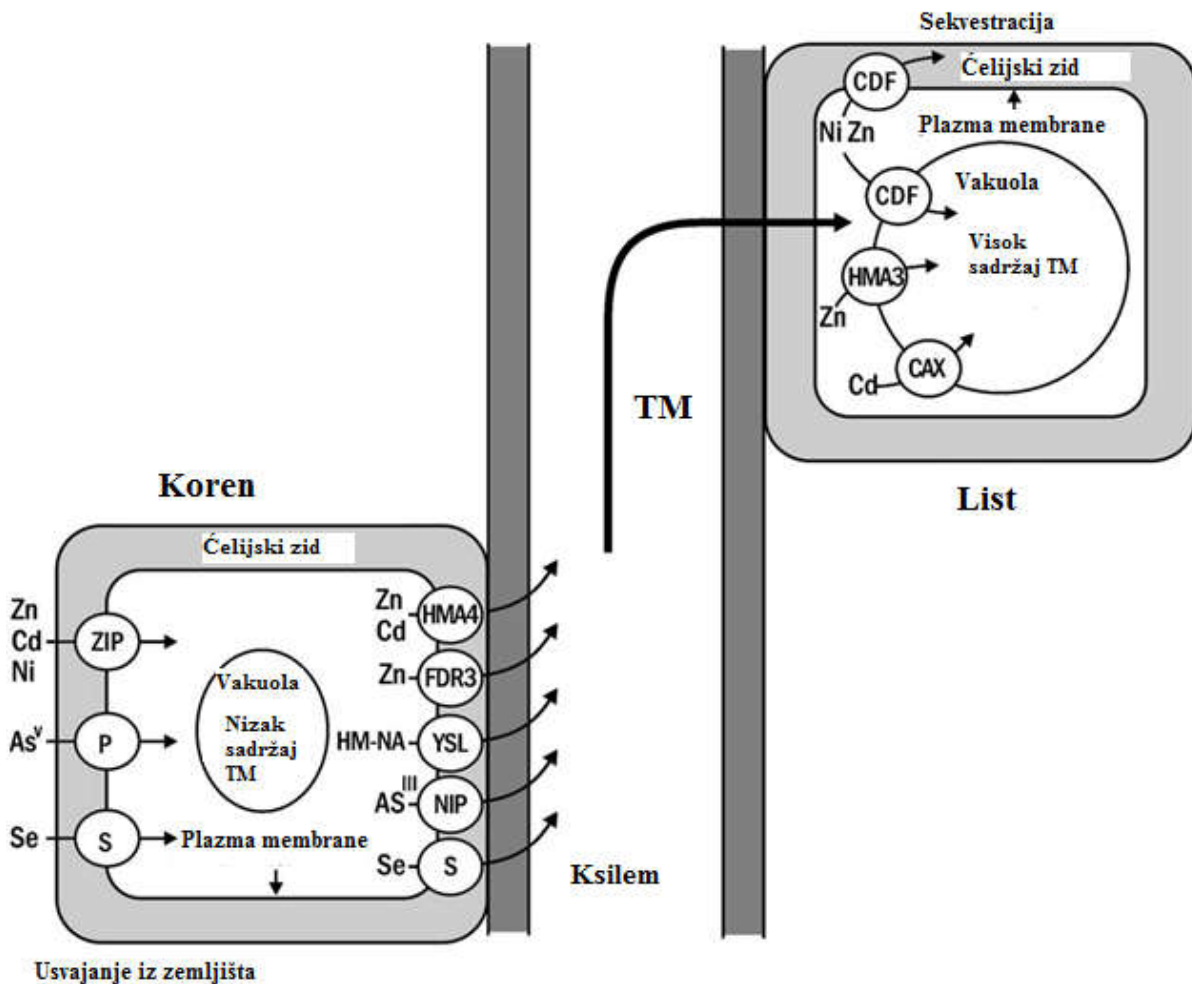
Biljna vrsta	Metal
<i>Alyssum wulfenianum</i>	Ni
<i>Azolla pinnata, lemna minor</i>	Cu,Cr
<i>Brassica Juncea</i>	Cu, Ni
<i>Arabidopsis halleri</i>	Cd
<i>Pteris vittata</i>	Cu, Ni, Zn
<i>Psychotria douarrei</i>	Ni
<i>Pelargonium sp.</i>	Cd
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn, Cd i Ni
<i>Amanita muscaria</i>	Hg
<i>Arabis gemmifera</i>	Cd i Zn
<i>Pistia stratiotes</i>	Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb i Zn
<i>Piptathertan miliacetall</i>	Pb
<i>Astragalus bisulcatus, Brassica Juncea</i>	Se
<i>Sedum alfredii</i>	Cd
<i>H. annuus</i>	Pb
<i>H. indicus</i>	Pb
<i>Sesbania drummondii</i>	Pb
<i>Lemna gibba</i>	As
<i>Pteris vittata</i>	As
<i>Sedum alfredii</i>	Pb/Zn
<i>Thlaspi caerulescens</i>	Zn, Pb, Zn i Cd
<i>Chengiopanax sciadophylloides</i>	Mn
<i>Tamarix smyrnensis</i>	Cd
<i>P. griffithii</i>	Cd/Zn
<i>Brassica napus</i>	Cd
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Zn i Cd
<i>Crotalaria juncea</i>	Ni i Cr
<i>C. dactylon</i>	Ni i Cr
<i>Rorippa globosa</i>	Cd

Rascio i Navari-Izzo (2011), kao i Suman i sar. (2018) su saglasni da hiperakumulatori mogu uspešnije da asimiluju metale od drugih biljaka i takođe se slažu da su ove biljke uspešnije u translokaciji metala iz korena u izdanak (Slika 12.). Međutim, ovi autori, kao i neki drugi, dodatno navode da je zapravo ključni faktor hiperakumulacije - metabolička tolerancija (hipertolerancija) na određene metal(oid)e. Kod hiperakumulatora se, kao način jačanja antioksidativnog sistema u samoj ćeliji, kao i borbe sa rizikom od pojave ROS (kao posledice metalnog stresa), javlja masovna,



takozvana, overekspresija gena koji su u vezi sa antioksidacijom, ali i uvećanje sinteze glutationa, GSH, kao ključnog antioksidativnog molekula u organizmu (Verbruggen i sar. 2009).

Što se tiče mehanizama akumulacije hiperakumulatora i nehiperakumulatora, poređenjem njihovih fizioloških i molekularnih procesa, došlo se do zaključka da brojni bitni koraci hiperakumulacije podrazumevaju različitu regulaciju i ekspresiju gena koji su inače uobičajeno zastupljeni kod obe vrste biljaka. Preciznije rečeno, glavna upravljačka uloga kod usvajanja velikih količina metala, daljeg izmeštanja u nadzemne organe, kao i kod sekvestracije u vakuole, ili ćelijske zidove hiperakumulatora, pripisuje se overekspresiji gena koji kodiraju sintezu transmembranskih proteina transportera, kao što su to familije: ZIP, HMA (eng. *Heavy Metal transporting ATP-ases*), YSL i MATE (eng. *Multidrug And Toxin Efflux*) (Slika 12.). MATE familija je posebna vrsta transportera koji deluju prilikom translokacije metala u hiperakumulatorskim biljkama (Slika 12.). Ekspresija gena jednog od članova ove familije, FRD3 proteina (feri-reduktaza), smeštenog na periciklu plazma membrane korena, obično saučestvuje u ubacivanju citrata u ksilem, koji je potreban kao ligand u transportu Fe, ali i Zn. Osim u formi citrata, metali se mogu pojaviti kao helatizovani i na druge organske kiseline i recimo u obliku malata, mogu se translocirati iz korena u nadzemni deo (Alagić i sar. 2014; Rascio i Navari-Izzo 2011).



**Slika 12.** Procesi koji su uključeni u usvajanje i translokaciju od korena do izdanka, kao i sekvestraciju metala kod biljaka hiperakumulatora (Alagić i sar. 2014, adaptirano iz Rascio i Navari-Izzo 2011)  
 CAX – eng. *Cation Exchangers*; CDF - eng. *Cation Diffusion Facilitators*; FDR3 - član MATE familije;  
 TM - teški metal; HMA - eng. *Heavy Metal transporting ATPases*; NA – Nikotian-amin; NIP - eng. *Nodulin 26-like Intrinsic Proteins*; P – transporteri fosfata; S – transporteri sulfata; YSL - eng. *Yellow Strip 1-Like Proteins*; ZIP - eng. *Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Proteins exchangers*

Treba naglasiti da je kod svih tolerantnih biljnih vrsta, čak i nehiperakumulatorskih, jedan od najvažnijih mehanizama – mogućnost sekvestracije (kompartimentalizacije) metalnih jona u vakuolama, ili ćelijskim zidovima, a što prevenira štetno delovanje metala na vitalnim mestima ćelije, čime se ostvaruje i efikasan zaštitni mehanizam (Rascio i Navari-Izzo 2011). Ovo je potvrđeno u nekoliko studija histohemijske lokalizacije metala kod *Silene vulgaris*, *S. nigrum*, *A. maritime ssp. halleri*, *Avicenia marina* i dr. (Marques i sar. 2009).

Za razliku od nehiperakumulatora, koji u korenskim ćelijama zadržavaju veći deo metala usvojenih iz podloge (i to putem skladištenja u vakuole tj. detoksifikacijom, ili pak helatizacijom u citosolu), hiperakumulatori ih brzo i efikasno transportuju u izdanak, putem ksilema (Slika 12.). Ovo zahteva dostupnost metala za prijem u tkivo ksilema, a koja, pretpostavlja se, proističe iz slabe sekvestracije unutar vakuola korena, kao i njihovog olakšanog efluksa, što je dalje uslovljeno nekim posebnim, specifičnim karakteristikama tonoplasta ćelija korena (Alagić i sar. 2014; Rascio i Navari-Izzo 2011).

Procena nivoa akumulacije metala u tkivima biljaka najčešće se izvodi na osnovu više bioakumulacionih faktora (BAF) kao što su: 1) za koren - biokoncentracioni faktor (eng. *Bio-concentration Factor*, *BCF*), 2) za nadzemne delove - biokoncentracioni faktori poznati kao odnosi mobilnosti (eng. *Mobility Ratios*, *MRs*) i 3) za translokaciju metala iz korenja u nadzemne delove - translokacioni faktori (eng. *Translocation Factors*, *TFs*); ovi faktori izračunavaju se prema jednačinama 2, 3 i 4 (Alagić i sar., 2013, 2015a, 2019):

$$BCF = C_{\text{koren}}/C_{\text{zemljište}} \dots\dots\dots (2)$$

$$MR = C_{\text{nadzemni deo biljke}}/C_{\text{zemljište}} \dots\dots\dots (3)$$

$$TF = C_{\text{nadzemni deo biljke}}/C_{\text{koren}} \dots\dots\dots (4)$$

Suštinski, biokoncentracioni faktori predstavljaju odnose između koncentracije nekog metala u određenom biljnom organu i koncentracije istog metala u zemljištu; karakteristika biljaka hiperakumulatora je da su vrednosti MR uvek veće od jedinice ( $MR > 1$ ), dok biljke koje zadržavaju usvojene toksične metale unutar tkiva korena, ili koje pokušavaju da, u nadzemnim delovima, održe koncentracije metala ispod kritične vrednosti (tj. na niskom nivou u odnosu na koncentracije u zemljištu), uvek imaju ove vrednosti manje od jedinice ( $MR < 1$ ); za ove biljke kaže se da su tolerantne, nehiperakumulatorske vrste; ipak, ukoliko one mogu da izdvoje značajne količine metala u svom podzemnom organu, one se mogu koristiti za stabilizaciju zemljišta i sprečavanje daljeg širenja zagađenja u njemu. Translokacioni faktor je praktično odnos između koncentracije metala u nekom nadzemnom delu i koncentracije u korenu; vrednost  $TF > 1$ , ima značenje da biljka ima dobru translokacionu sposobnost metalnih jona od korena do nadzemnih organa (Alagić i sar., 2013, 2015a, 2019).

### 2.1.4.3. Fitovolatilizacija

Fitovolatilizacija je metoda za uklanjanje metala iz zemljišta, putem njihovog prevođenja u isparljive forme i kao takva, retko se primenjuje u slučajevima remedijacije ove vrste zagađujućih materija. Jedino u slučajevima kada se radi o Hg i Se, koji se mogu pojaviti u svojim isparljivim oblicima, mehanizam fito-isparljivosti može imati značajne efekte u pogledu njihovog uklanjanja iz zagađenog zemljišta. Na primer, fitoisparavanje Se odnosi se na apsorpciju neorganskih oblika Se i inkorporaciju u organska jedinjenja kao što su aminokiseline (selenometionin i selenocistein). Selenometionin može biti dalje metilovan i formirati dimetilselenid, isparljivo, jedinjenje koje se konačno može osloboditi u atmosferu, preko listova biljaka. Biljne vrste koje su identifikovane kao veoma korisne u isparavanju Se, pripadaju porodici *Brassicaceae* a najpoznatija je indijska slačica (*Brassica juncea*). Kada je u pitanju Hg, dobro je poznato da na sobnoj temperaturi ovaj metal ima tečnu konzistenciju. Međutim, pošto ima i visoku reaktivnost, Hg u okolini opstaje prvenstveno kao dvovalentni katjon ( $Hg^{2+}$ ). Mnoge studije su pokazale da bakterije iz rizosfere, koje su često u sinergiji sa biljkama, mogu katalizovati redukciju ovog jona do elementarne Hg i takođe mogu

poboljšati sposobnost isparenja preko biljke. Međutim, za razliku od Se, čini se da ovaj mehanizam nije značajan proces u biljkama. Nešto slično se može zaključiti i u slučaju metaloida As (isparljivost As je verifikovana za mikroorganizme) (Marques i sar. 2009).

Hemijska konverzija toksičnih metala u isparljiva jedinjenja sa manjom toksičnošću koje biljke mogu da otpuste u atmosferu kroz stomate lista jeste moguća strategija za detoksikaciju pomenutih metala, ali treba imati na umu da ova transformacija može rezultovati novim specifičnim isparljivim oblicima metala koji i dalje može izazvati štetne efekte u okolini. Međutim, bilo je nekoliko studija za Se i Hg, koje su izvestile da su zagađivači raspršeni i razblaženi na tako nizak nivo da isparljivost nije stvorila opasnost u istraživanom području (Marques i sar. 2009).

### 2.1.5. Značaj biljnog usvajanja metala za biomonitoring

Biomonitoring, kao metoda praćenja stanja i kontrole kvaliteta životne sredine, odnosi se na upotrebu živih organizama za dobijanje kvantitativnih podataka o promenama koje nastaju u neposrednom okruženju, nastalih pre svega usled antropogenih aktivnosti. Mnogi autori smatraju da se biološki i fiziološki odgovori živih organizama mogu smatrati tačnijim i reprezentativnijim od informacija dobijenih klasičnim hemijskim, ili fizičkim mernim instrumentima, kao i da se i niže i više biljke mogu primeniti u svojstvu bioindikatora, biomonitora, ili bioakumulatora (Calzoni i sar. 2007).

Pod bioindikatorom se podrazumeva živi organizam (ili njegov deo) koji pruža podatke o kvalitetu životne sredine, dok je biomonitor organizam (ili deo organizma) koji obezbeđuje kvantitativne podatke o kvalitetu sredine. Biomonitor može poslužiti i kao bioindikator, dok bioindikator ne ispunjava uvek karakteristike biomonitora. U svakom slučaju, obe vrste organizama reaguju na promene u okruženju, prouzrokovane zagađujućim materijama, koje su pre svega lako uočljive, a onda i merljive (Markert i sar. 1999; Lodenius 2013). Konačno, opšte je prihvaćeno da se biljke najčešće koriste kao pasivni bioindikator (zbog svoje stacioniranosti u ispitivanim oblastima), dok se kao aktivni bioindikator koriste organizmi koji se unose u oblast od interesa, ili se, pak, u laboratorijskim uslovima izlažu polutantima tokom određenog vremenskog perioda (Markert i sar. 1999).

Postoje brojni primeri različitih drvenastih, žbunastih i zeljastih biljaka, posebno iz teško zagađenih rudarsko/metalurških i urbano/industrijskih sredina koje su bile iskorišćene za monitoring prisutnog nivoa kontaminacije (Alagić i sar. 2019; Alagić 2022; Oliva i Mingorance 2006; Reimann i sar. 2001; Rucandio i sar. 2011; Unterbrunner i sar. 2007). Najčešće sakupljani biljni delovi bili su nadzemni organi, tj., pre svega listovi, a zatim i grančice i kora drveta, zbog toga što mnogi od njih imaju izvanrednu sposobnost zadržavanja i akumulacije metala ne samo iz zagađene atmosfere već i iz zemljišta (Alagić i sar. 2013, 2015a, 2019; Alagić 2022; Khanoranga 2019; Perlatti i sar. 2015; Schreck i sar. 2020; Shutcha i sar. 2015; Tošić i sar. 2016; Weber i sar. 2014). Sa druge strane međutim, mnogo puta je bilo primećeno da nadzemni organi ne mogu baš tačno da reflektuju nivo kontaminacije zemljišta, što ih ne čini najadekvatnijim alatom za biomonitoring zemljišta, pa čak ni korenje ne može da ilustruje autentičnu situaciju u zemljištu (Alagić i sar. 2015a, 2019; Alagić 2022; Mertens i sar. 2005).

Kontaminacija teškim metalima poreklom iz atmosfere poslednjih decenija je često bila potvrđena na osnovu njihove detekcije u navedenim nadzemnim delovima (neopranim, ili opranim). Tako na primer, ispitano je više oblasti širom sveta: oblast severne Evrope - Monchegorsk na poluostrvu Kola, u Rusiji, sa Cu-Ni-topionikom kao glavnim tačkastim emiterom ovih metala, korišćenjem lišća borovnice, breze, bora, žalosne vrbe, jagode, i omorike (Reimann i sar. 2001); oblasti u Španiji – grančice, lišće, kora i drvenasti deo bora i olijandera u Huelvi (Mingorance i sar. 2007; Oliva i Mingorance 2006), kao i lišće *Cupressus sempervirens*, *Cedrus deodara*, *Nerium oleander*, *Pinus pinea*, *Pittosporum tobira* i *Ligustrum ovalifolium* u Madridu (Rucandio i sar. 2011); oblasti u Poljskoj: Warshawa – lišće lipe (Dmuchowski i Bytnerowicz 2009) i Wałbrzych i Wrocław – lišće žalosne vrbe, lipe, breze i jabuke (Piczak i sar. 2003); više zagađenih delova u Debrecen-u, u Mađarskoj – prašina deponovana na listovima *Acer negundo*, *Padus serotina*,

*Quercus robur*, *Acer campestre* i *Celtis occidentalis* (Simon i sar. 2014) i Beču, u Austriji – lišće, ali i lisna prašina sa *Acer pseudoplatanus* (Simon i sar. 2011); izrazito zagađeni region Qujiang, Kina, sa Pb-Zn topionicom kao osnovnim izvorom kontaminacije – spoljašnja i unutrašnja kora Masson-bora (Kuang i sar. 2007); okolina Siene, Italija – hrastovo lišće (Fantozzi i sar. 2013) itd. Ovakva selekcija biljnih delova bila je zasnovana na njihovoj pristupačnosti za uzorkovanje, relativno jednostavnom pripremanju za dalje hemijske analize i konačno, na njihovoj ekonomskoj prednosti kao potpuno besplatnih alata monitoringa. Biljne vrste birane su na bazi prisustva karakteristične, lokalne vegetacije (najčešće različite samonikle biljke, ili planski sađene biljke na ulicama, parkovima, ili drugim javnim mestima u oblastima od interesa urbano/industrijskog tipa). U nekim biomonitoring studijama korišćene su takođe i jestive biljke, kao što su vinova loza varijetet Tamjanika (Alagić i sar. 2015a, 2018b), vinogradarska breskva (Dimitrijević i sar. 2016), divlja kupina (Nujkić i sar. 2016) i jabuka (Tošić i sar. 2016) i to sve u teško zagađenom regionu Bora u istočnoj Srbiji; u ovim slučajevima, biomonitoring je obuhvatio skoro sve biljne organe – koren, stabljiku/grančicu, lišće, pa čak i plodove. U istom regionu Bora ispitane su i druge biljne vrste (uključujući manji broj organa), kao što su: lipa, zova i bor (Kalinović i sar. 2016), šipurak, glog i trnjina (Kalinović i sar. 2019), hrast, smreka i leska (Radojevic i sar. 2017), itd. i sve su pokazale da su u različitoj meri upotrebljive u svrhe biomonitoringa. U tom smislu, ogromna većina urađenih studija ukazala je da su najupotrebljiviji organi u biomonitoringu - listovi (Alagić i sar. 2019; Alagić 2022).

U svakom slučaju, radi procene stepena antropogenog uticaja na prisutno zagađenje, u biomonitoringu se najčešće koriste takozvani biološki faktori poput faktora obogaćenja (eng. *Enrichment Factors*, *EFs*). EF se izračunava po obrascu (5):

$$EF = C_{\text{zagađeno}}/C_{\text{kontrolno}} \dots \dots \dots (5)$$

gde  $C_{\text{zagađeno}}$  i  $C_{\text{kontrolno}}$  označavaju koncentracije metala u biljnim delovima, ili zemljištu na kontaminiranoj i kontrolnoj lokaciji, respektivno (Alagić i sar. 2013, 2015a, 2019; Alagić 2022; Mingorance i sar. 2007).

Definisano je pet kategorija zagađenja u odnosu na vrednost EF (Alagić 2022; Sutherland 2000; Dimitrijević i sar. 2016):

- 1)  $EF < 2$  - beznačajno obogaćenje, sa konkretnim značenjem – zagađenje na zanemarljivo niskom nivou,
- 2)  $EF = 2 - 5$  - umereno obogaćenje (umerena kontaminacija),
- 3)  $EF = 5 - 20$  - znatno obogaćenje (znatna kontaminacija),
- 4)  $EF = 20 - 40$  - vrlo visoko obogaćenje (visoka kontaminacija) i
- 5)  $EF > 40$  - ekstremno visoko obogaćenje (ekstremno visoka kontaminacija)

Suštinski, može se reći da se sa povećanjem vrednosti EF, povećava i doprinos zagađenja antropogenog porekla.

## 2.2. Hemometrija u analizi metala iz zemljišnih i biljnih uzoraka sa akcentom na značaj za fitoremedijaciju i biomonitoring

Da bi se fitoremedijacione i biomonitoring procedure ispravno i tačno planirale, a pre svega da bi se ispitali biljni potencijali u odnosu na obe pomenue metode, neophodno je imati kvalitetne i precizne instrumente kojima će se koncentracije metala u biljnom, ili zemljišnom materijalu što tačnije odrediti, a zatim i obraditi odgovarajućim statističkim metodama. U ove svrhe, najčešće se koristi takozvani hemometrijski pristup koji predstavlja primenu matematike i statistike na polje hemije (“Chemometrics.” Merriam-Webster.com Dictionary; Miller i Miller 2005), ali i biohemije, biologije, nutricionistike, medicine, geologije itd.; iz ovih razloga, hemometrija se može ubrojati i u nauke interdisciplinarne prirode (Pripp 2013). Kramer je još 1998. godine primetio da hemometrija, u najopštijem smislu, predstavlja umeće u procesuiranju podataka pomoću različitih numeričkih tehnika, a u cilju ekstrahovanja korisnih informacija; ovo je u konačnom omogućeno pre svega, neslućenom brzinom razvoja moćnih kompjuterskih programa koji mogu primiti i obraditi ogroman broj podataka.

### 2.2.1. Metode hemijske detekcije i karakterizacije metala kao deo hemometrijskog pristupa u analizi zemljišnih i biljnih uzoraka

Detekcija, odnosno kvalitativna i kvantitativna analiza metala prisutnih u zemljišnim i biljnim uzorcima iz životne sredine podrazumeva primenu brojnih, ali prigodnih, tj. adekvatnih hemijskih metoda. Sakupljeni uzorci mogu se analizirati kako u svom čvrstom stanju, tako i kao prevedeni u tečno stanje, što se smatra mnogo preciznijom i pouzdanijom metodom. Direktna analiza čvrstih matrica može da uključi brojne rentgenske tehnike, ali i moćnu instrumentalnu neutron-aktivacionu analizu, zatim lasersku ablacionu induktivno kuplovanu plazma masenu spektrometriju, itd. Uzorci koji se pak prevedu u tečno stanje, uobičajeno se analiziraju metodama atomske spektrometrije, u odgovarajućim spektralnim aparatima (Alloway 2013).

Načini rastvaranja čvrstih uzoraka zavise od prirode samog matriksa. U slučaju zemljišta, rastvaranje se odvija na prilično komplikovan način. Ovde je od presudnog značaja priroda reagenasa koji se koriste za samu ekstrakciju metala, jer različiti rastvarači oslobađaju ove elemente iz različitih zemljišnih faza, pa tako pružaju i različite korisne informacije. U strogo geološkim istraživanjima npr, potrebno je izvršiti totalno rastvaranje po zemljišnim fazama, tj. totalnu mineralizaciju uzorka, kako bi se iz prisutnih metalnih jedinjenja, odnosno formi, oslobodili, a zatim i detektovali svi prisutni metali. Ovo se pre svega postiže pomoću jakih mineralnih kiselina, kao što je npr fluorovodonična kiselina, dok za potrebe klasičnih ekoloških istraživanja (kada je pre svega potrebno sagledati moguću biodostupnost metala), primena azotne kiseline u kombinaciji sa vodonik-peroksidom predstavlja sasvim korektan izbor. Kombinacija poslednjih reagenasa takođe se preporučuje i za rastvaranje biljnih uzoraka (Alloway 2013).

Prethodno, pre ekstrakcije metala iz biljnog, ili zemljišnog materijala, potrebno je osušiti uzorke, jer se rezultati hemijskih analiza obično izražavaju preko suve materije, SM. Rastvaranje osušenih uzoraka se danas najčešće izvodi na povećanoj temperaturi, u mikrotalasnim pećnicama (eng. *micro-wave ovens*) opremljenim sudovima od različitih otpornih materijala i to koristeći kombinacije različitih mineralnih kiselina. Ove pećnice mogu da zagreju sadržaje u svojim zatvorenim sudovima veoma brzo, prevenirajući tako neželjene gubitke elemenata i to mnogo uspešnije od bilo koje druge tradicionalne metode (ploče za zagrevanje, peščana kupatila, aluminijumska kupatila, itd.) (Alagić i sar. 2017; Alagić i sar. 2018a; Esen i Balci 2008). U literaturi je bilo pokazano da mikrotalasna digestija obezbeđuje kontrolisanije i reproduktivnije rezultate od nabrojanih konvencionalnih metoda, kao i značajnu redukciju u ukupnom vremenu trajanja analize, ali i riziku od spoljašnje kontaminacije uzoraka (Barbosa i sar. 2015). Pri tome, već prvi istraživači u ovoj oblasti (Araujo i sar. 2002), ukazali su da je potrebno voditi računa o mnogim parametrima koji mogu uticati na ispravnost eksperimentalnog rada, kao što su to: masa uzorka,

vrsta upotrebjene kiseline/a, zapremina reagenasa, koncentracija oksidansa u mešavini, temperatura, pritisak i konačno - vreme trajanja zagrevanja.

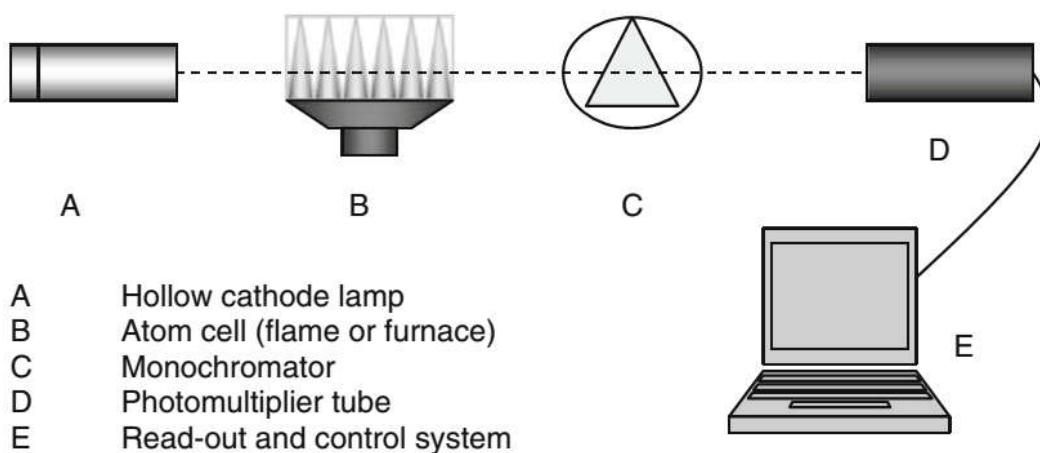
### 2.2.1.1. Atomska spektrometrija

Metodom pomenute atomske spektrometrije meri se ono elektromagnetsko zračenje koje emituju, ili absorbuju slobodni atomi u momentima kada njihovi valentni elektroni prelaze između atomskih energetske nivoa. Tokom atomske apsorpcije, energija se prenosi sa fotona na atom i na taj način prouzrokuje se posebno pobuđeno, takozvano, ekscitovano stanje. Kod atomske emisije, elektroni koji se nalaze u pobuđenom stanju praktično de-ekscituju, pa višak energije emituju kao foton. Kako različiti atomi imaju različite konfiguracije elektrona, to svaki metal može da absorbuje, ili emituje svetlost tačno određene talasne dužine, pa tako i količina absorbovane, ili emitovane svetlosti mora uvek da bude proporcionalna koncentraciji prisutnog metala. Kada je temperatura u porastu, raste i broj atoma sa elektronima na višim energetske nivoima, pa se zbog toga, spektroskopske tehnike atomske apsorpcije izvode na relativno nižim temperaturama (najčešće u običnom, gorućem plamenu); međutim, za emisione tehnike, potrebne su više temperature, poput onih koje se dostižu u uslovima stanja plazme (Alloway 2013).

Spektroskopske metode koje se primenjuju za analizu tečnih uzoraka:

- atomska apsorpciona spektroskopija (eng. *Atomic Absorption Spectroscopy, AAS*) i
- atomska emisiona spektroskopija (eng. *Atomic Emission Spectroscopy, AES*),

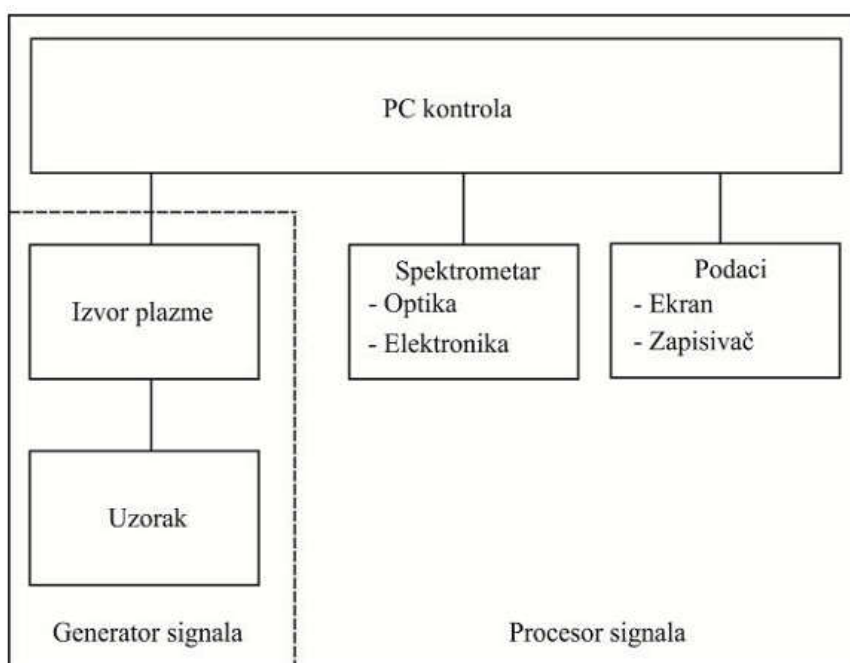
predstavljaju optičke spektrometrijske tehnike koje su tokom poslednjih godina doživele ogroman napredak i usavršavanje. Kod ovih metoda, tečni uzorak se uvodi u odgovarajući pobuđivač, gde dolazi do isparavanja i formiranja slobodnih atoma i jona. Osnova na kojoj su bazirane obe spektralne metode je merenje apsorpcije, ili pak emisije zračenja poreklom od nastalih slobodnih, nejonizovanih atoma, ili atomskih jona iz gasne faze. Zbog toga su brojne komponente instrumenata ovih tehnika vrlo slične konstrukcije i sastava, što najviše zavisi od talasne dužine spektralne oblasti u kojoj nalaze primenu, pa se može konstatovati da se AAS i AES mogu stalno i idealno dopunjavati. Tako na primer, ispitivani tečni uzorci, unose se u aparate sistemima za raspršivanje rastvora, a zatim analiziraju u za to odgovarajućim delovima (Velimirović 2013). Recimo, tipičan atomski apsorpcioni spektrometar koji sada već predstavlja jednu zastarelu tehniku i dalje se dosta koristi za određivanje mnogih teških metala u zemljištu, a sastoji se od izvora svetlosti koji obezbeđuje izvor fotona, zatim od ćelije za atomizaciju, tj. produkciju slobodnih atoma analita (običan plamenik), od monohromatora za odabir talasne dužine od interesa i konačno od detektora (fotomultiplikatora) (Slika 13.) (Alloway 2013).



**Slika 13.** Shema atomskog apsorpcionog spektrometra: A – katodna lampa, B – ćelija za atomizaciju (plamen, ili peć), C – monohromator, D – fotomultiplikatorska cev i E – čitač i kontrolni sistem (Alloway 2013)

Kod tehnika atomske emisijske spektrometrije, pobuđivač mora biti visoko efikasan; u suprotnom, samo metali koji imaju male energije pobuđivanja mogu biti detektovani sa dovoljnom osetljivošću. Ove zahteve, kao što je već pomenuto, ispunjavaju pre svega brojni različiti izvori plazme, a naročito induktivno kuplovana plazma (eng. *Inductively Coupled Plasma, ICP*). U ovom slučaju, uzorak se izlaže temperaturi plazme od 6000 - 10000 K. Osim ove, atomski emisijski spektrometri sa induktivno kuplovanom plazmom ICP-AES (eng. *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*), ili ICP-OES (eng. *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*) poseduju i druge prednosti: veoma jednostavan sistem za ubrizgavanje tečnih uzoraka, vreme boravka produkata razgradnje uzoraka iznosi svega 2 ms, visoka osetljivost, mogućnost kvalitativne i multielementne analize, nizak limit detekcije, merenja koja su izvodljiva i u vakuumskoj UV oblasti, kao i minorne hemijske interferencije; zbog toga je ova metoda našla ogromnu primenu za određivanja elemenata u tragovima i to za najrazličitije tipove uzoraka (Velimirović 2013).

Danas se kod ICP-OES instrumenata, kao procesor signala koristi optički elektronski sistem, kao i jedinica za prikaz podataka, a kontrola funkcija i rad instrumenta obezbeđuju se putem računara sa odgovarajućim softverom (Slika 14.) (Velimirović 2013).

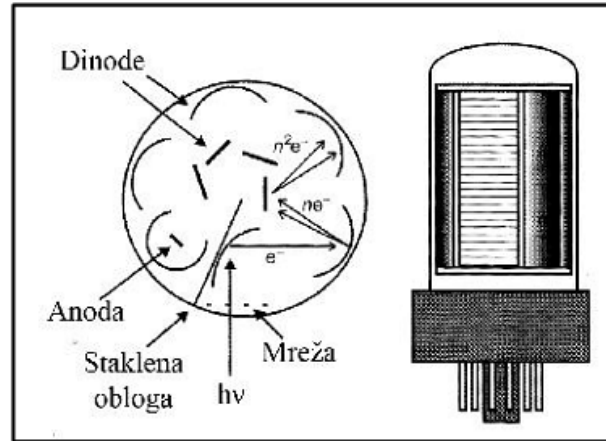


Slika 14. Osnovni elementi ICP-OES (Velimirović 2013)

Kod ICP-OES, uzorak se dovodi u izvor plazme, pri čemu dolazi do njegovog isparavanja i razgradnje na slobodne atome i jone, gde se sada mora utrošiti dodatna energija kako bi se slobodni atomi i joni pobudili u viša energetska stanja. Pošto su pobuđena stanja atoma veoma nestabilna, oni gube energiju ne samo preko sudara sa drugim česticama u sistemu, već i putem energetskih prelaza na niže energetske nivoe. Tako nastaje spontana emisija zračenja. Dobijeni emisijski spektar sadrži puno linija koje se formiraju od velikog broja različitih atoma i jona iz uzorka, ali i od izvora plazme. Za analizu dobijenih spektralnih linija neophodno je da sistem za razlaganje sadrži spektrometar sa velikom moći rezolucije, kao i sposobnost korekcije pozadine. Pri tome, svaki od elemenata prisutnih u plazmi ima svoju karakterističnu emisijsku liniju, odnosno talasnu dužinu,  $\lambda$ . Detekcija zračenja određene talasne dužine koristi se u kvalitativnoj analizi za identifikaciju elementa, a izmereni intenzitet se koristi za kvantitativnu analizu (Slika 14.) (Velimirović 2013).

Posle odvajanja talasnih dužina uz pomoć odgovarajućih spektrometara, za "očitanje" dobijenih informacija koriste se detektori, takozvani fotomultiplikatori (radi se o vakuumskim

fotocelijama sa unutrašnjim pojačanjem anodne struje za  $10^6 - 10^8$  puta). Kao i fotočelije, fotomultiplikatori se izrađuju od evakuisanog balona sa kolektorskom anodom i fotoosetljivom katodom, između kojih je smešteno 5-10 elektroda, takozvanih dinoda (prave se na bazi  $\text{Ca}$  materijala MgO, GaP, itd., Slika 15.). Svaka dinoda je nalazi se na naponu pozitivnijem za  $\sim 100$  V u odnosu na prethodnu, omogućavajući tako emisiju sekundarnih elektrona kojima se postiže pojačanje (Velimirović 2013).



**Slika 15.** Standardni fotomultiplikator kod ICP-OES instrumenata (Velimirović 2013)

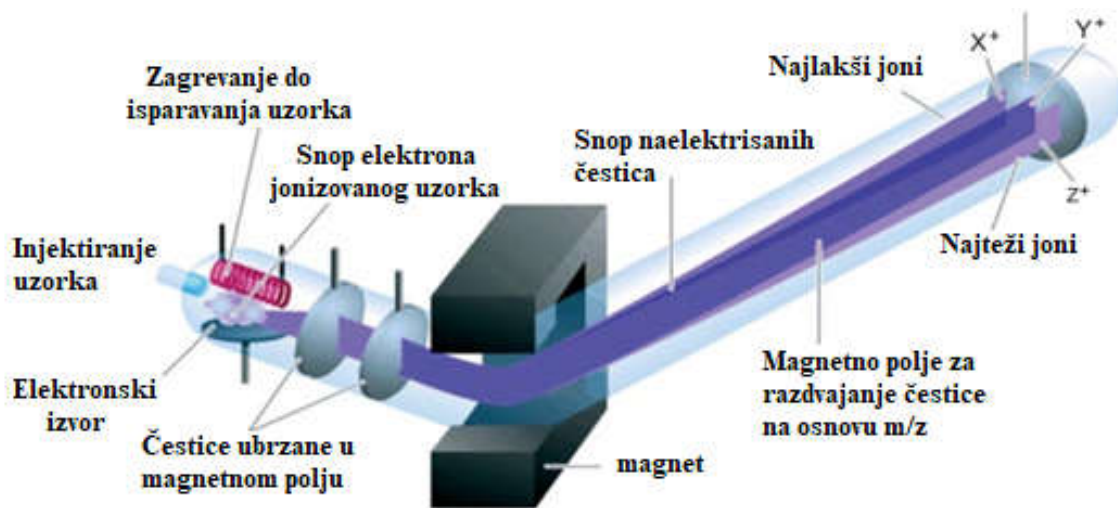
U novije vreme, fotomultiplikatori se zamenjuju više-kanalnim detektorima koji se zasnivaju na uređajima za prenos naelektrisanja (eng. *Charge-transfer device, CTD*). Kod AES, za višekanalnu detekciju, koristi se uređaj sa kuplovanim naelektrisanjem (eng. *Charge-coupled device, CCD*) i uređaj sa ubrizgavanjem naelektrisanja (eng. *Charge-injection device, CID*) (Velimirović 2013).

### 2.2.1.1.1. Masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom

Međutim, danas se sve više, kao detektor kod ICP-metode koristi maseni spektrometar, MS, aparat koji se praktično postavlja na izlazu iz ICP-dela instrumenta. Na ovaj način, dobija se kombinovani uređaj sa izuzetnim mogućnostima, koji je nezamenljiv u detekciji i analizi polutanata koji zagađuju životnu sredinu (praktično, svih makro, mikro i elemenata u tragovima). Maseni spektrometar kao detektor, danas je zauzeo vodeće mesto zbog svoje osetljivosti, brzine i granice detekcije. To je analitički instrument koji pretvara ispitivani uzorak u jonski snop i razdvaja taj snop u sastavne komponente na bazi odnosa njihovih veličina: masa - naelektrisanje ( $m/z$ ); praktično, on razdvaja naelektrisane čestice u magnetnom polju, prema  $m/z$  odnosima (Hussain i Maqbool 2014; Ristić 2019).

MS je bazirana na tome da se analizirani uzorak (element, neorgansko, ili organsko jedinjenje) prevede u stanje jonizovanog gasa (primenom električnog polja, termalnom metodom, ili bombardovanjem ubrzanim  $e^-$ , jonima, ili fotonima pri čemu nastaje snop jednakih energija, sa različitim odnosima masa i naelektrisanja). Kretanjem naelektrisanih čestica tj. jona u električnom, ili magnetnom polju, polazni snop jona se razlaže na osnovu razlike u odnosu  $m/z$  jona (Slika 16.). Nastali joni mogu biti jednostruko jonizovani atomi, molekuli, klasteri, ili njihovi fragmenti. Oni se provode kroz deo koji se naziva maseni analizator, a koji razdvaja jone u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, joni idu do odgovarajućeg, pravog detektora gde daju električni signal koji se beleži na računaru; ovi električni signali se dalje detektuju kao takozvani maseni spektri. Kvalitativna i kvantitativna analiza vrše se na osnovu vrednosti  $m/z$  i relativne zastupljenosti vrsta (Cvijović 2013).

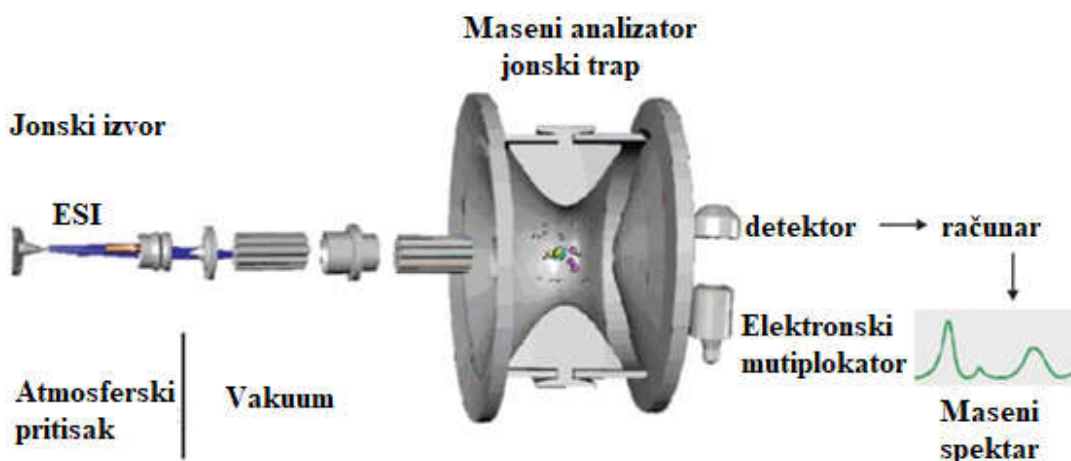




Slika 16. Kretanje jona u masenom spektrometru (Cvijović 2013)

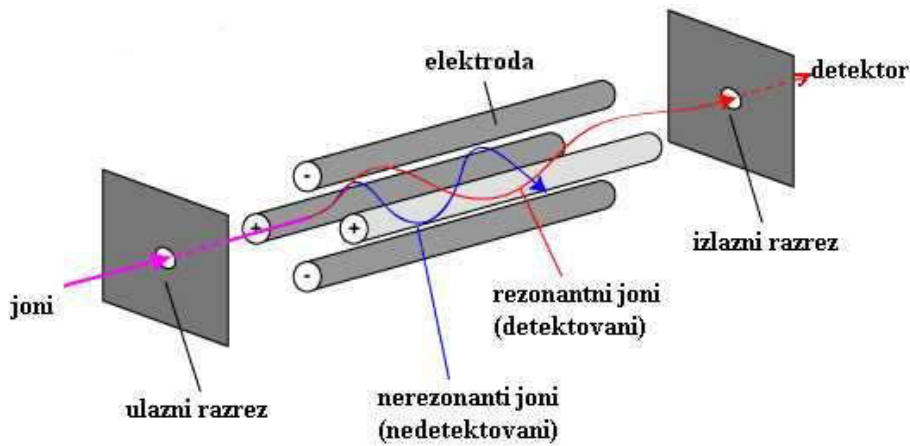
Osnovni elementi svakog masenog spektrometra, prikazani su na Slici 17. i to su (Cvijović 2013; Nikolić 2018):

- deo za unos uzorka (eng. *inlet*);
- izvor jona koji iz ispitivanog uzorka produkuje jonski snop;
- jonska optika koja sprovodi jone do masenog analizatora;
- analizator masa koji razdvaja jone prema njihovom odnosu  $m/z$ ;
- vakuum-deo koji proizvodi visoki vakuum;
- deo koji detektuje razložene jone i meri njihov intenzitet i
- računar koji obrađuje podatke.



Slika 17. Osnovni delovi jednog masenog spektrometra (Cvijović 2013)

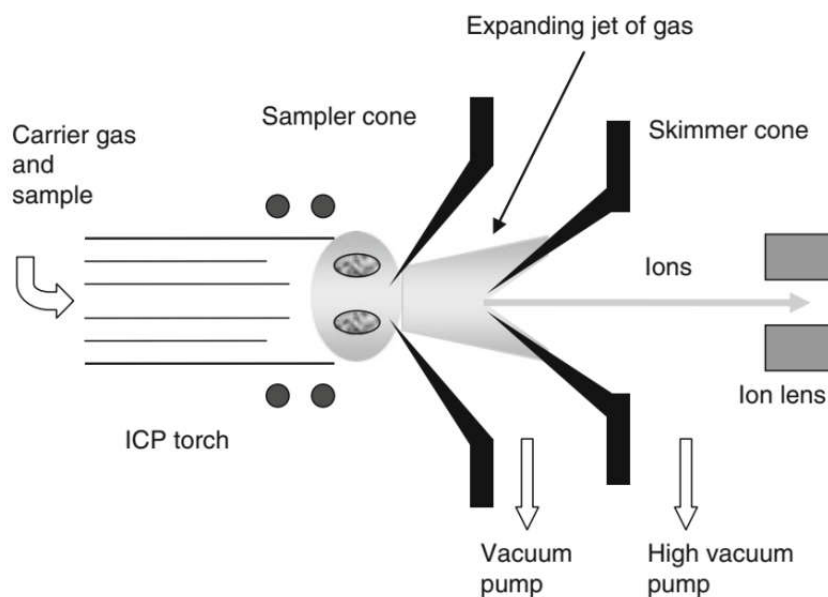
Najvažniji deo MS-a je maseni analizator koji razdvaja jone na bazi odnosa  $m$  i  $z$  ( $m/z$ ). U suštini, on ne samo da razdvaja pojedine mase iz jonizovanog uzorka, već i obezbeđuje merenje njihovih količina (prvo razdvaja jone bliskih masa, a zatim i fokusira izdvojeni snop jona). U zavisnosti od toga da li koriste statičko, ili dinamičko, električno, ili magnetno polje, ili pak njihovu kombinaciju, postoji nekoliko vrsta analizatora masa; oni se mogu podeliti na: kontinualne, kvadrupolne, pulsne, magnetne, jon-trap analizatore (jonska zamka), analizatore na bazi vremena preleta i analizatore sa jednostrukim, ali i dvostrukim fokusiranjem. Danas, je najčešće korišćeni analizator onaj koji se izrađuje na bazi kvadrupola (Slika 18.) (Nikolić 2018).



Slika 18. Shema analizatora masa tipa kvadrupola (Nikolić 2018)

U ovom slučaju, nakon ubrizgavanja, joni različitih masa smeštaju se između 4 elektrode, koje su priključene na izvor naizmenične struje; ovde, prilikom promene napona, dolazi do odvajanja jona na osnovu njihovih masa. Posle razdvajanja, joni konačno bivaju usmereni u onaj uređaj - detektor koji ih konvertuje u električni signal, a koji se dalje beleži na pisaču, računaru, ili nekom drugom uređaju (Nikolić 2018).

Jasno je da je kod ICP-MS metode, ICP-deo isti kao kod AES, ali se ovde, umesto merenja emitovane svetlosti, joni generisani u plazmi upućuju u analizator, danas najčešće u maseni kvadrupol koji razdvaja jone po masi,  $m$ . Jedan od glavnih izazova u razvoju ICP-MS, bio je ekstrakcija jona iz vrele, guste plazme u visoko-vakuumsku sredinu masenog analizatora. Moderni instrumenti koriste dva konusna razreza (eng. *cone*) od nikla, ili platine, koji se stalno hlade vodom (Slika 19.). Prvi razrez (eng. *sampler cone*), pozicioniran je na repu plazme i omogućava širećem mlazu materijala da prođe kroz njegov uzani otvor ( $\sim 1.0$  mm), u intermedijarnu vakuumsku oblast. Drugi razrez, takozvani 'skimmer' (skidač), deli pomenuti mlaz u sub-uzorke, omogućavajući formiranje manjih porcija jona koji dalje ulaze u visoko-vakuumsku oblast, gde se oni dalje ubrzavaju i šalju u unutrašnjost kvadrupola (Alloway 2013).



Slika 19. Shematski prikaz jednog ICP-MS interfejsa: noseći gas i uzorak (eng. *Carrier gas and sample*), ICP-baklja (eng. *ICP-torch*), prvi razrez (eng. *sampler cone*), drugi razrez, skidač (eng. *Skimmer cone*), mlaz gasa koji se širi (eng. *Expanding jet of gas*), joni (eng. *Ions*), jonska sočiva (eng. *Ion lens*), vakuumska pumpa (eng. *Vacuum pump*) i pumpa visokog vakuuma (eng. *High vacuum pump*) (Alloway 2013)

Alloway (2013) navodi da najnovije generacije komercijalnih ICP-MS instrumenata čak uključuju i uređaje za prevazilaženje poliatomske jonske interferencije. Različiti proizvođači imaju različita rešenja prilaska ovom problemu, ali svi oni nastoje da nađu način da oslobode jon analita radi dalje detekcije. Jedan alternativni pristup jeste zamena kvadrupola masenog analizatora jednim magnetskim sektorom. Sektor polje-ICP-MS pruža mnoge analitičke prednosti, uključujući odličnu rezoluciju, tj., razdvajanje masa, pa je tehnika poznata kao visoko razdvajajuća ICP-MS (eng. *High resolution-ICP-MS*).

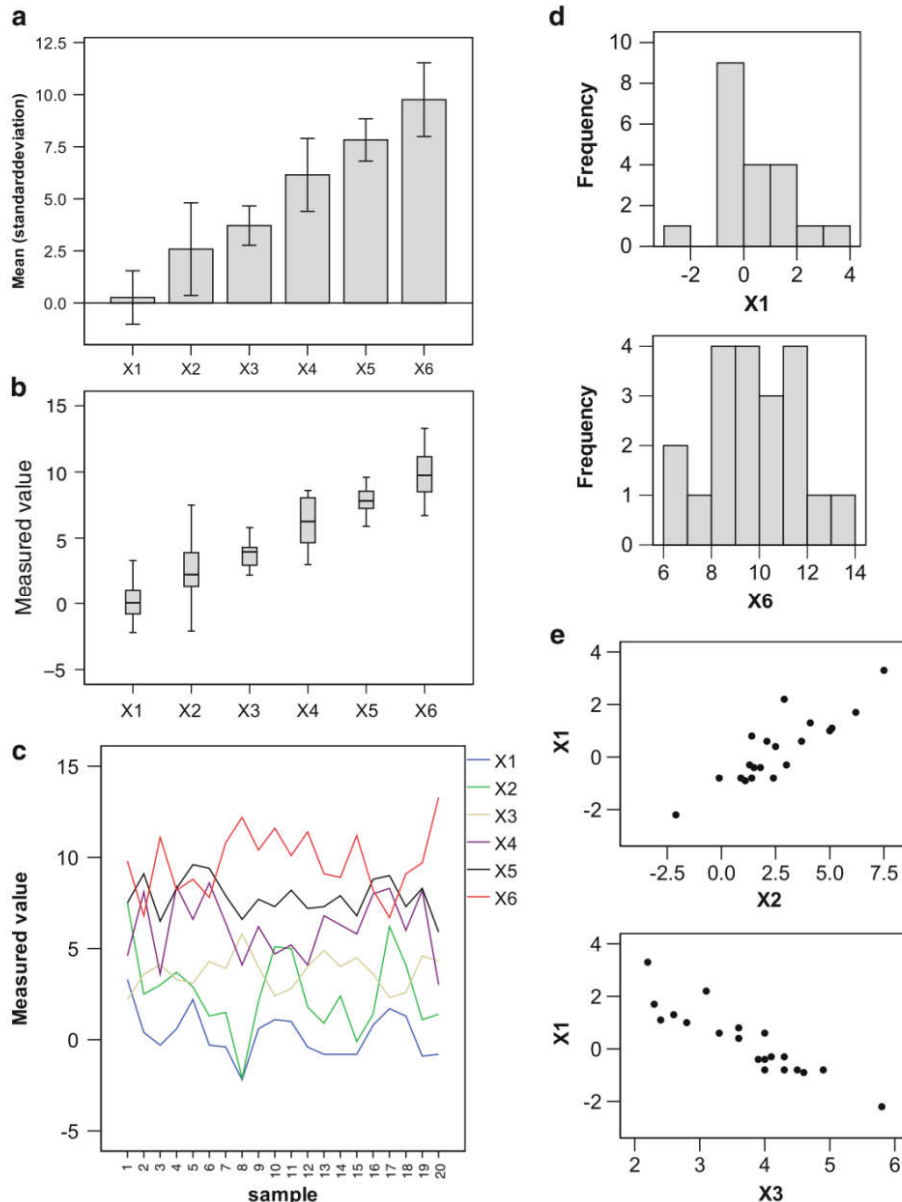
Za razliku od ICP-AES, kod ICP-MS efekti matriksa su mnogo ozbiljniji. Masson i sar. (2010) su kompenzovali ove efekte verifikacijom analize elemenata u takozvanim sertifikovanim referentnim materijalima, SRM. Generalno, SRM nalaze primenu u kalibraciji instrumenata i u osiguranju trajnog integriteta osiguranja kvaliteta merenja. Oni su takođe ključni za verifikaciju važnih rezultata merenja, kao i u razvoju novih metoda merenja. Za različite matrikse, koriste se i različiti SRM materijali, pa tako i američki Nacionalni Institut za Standarde i Tehnologiju (eng. *National Institute of Standards and Technology, NIST*), preporučuje najpodesnije SRM za zemljišta, biljke i druge biološke materijale, staklo i keramiku, itd., što se detaljno može naći u njihovom tehničkom katalogu - NIST Standard Reference Materials® (Montgomery i Benkstein 2014).

Masson i sar. (2010) bili su među prvim istraživačima koji su zaključili da se upotrebom SRM, dobijaju zadovoljavajuće korekcije analitičkih signala kod biljnih uzoraka. Izmerene koncentracije sa digestovanim SRM-rastvorima bile su u saglasnosti sa referentnim vrednostima u intervalu od 95% pouzdanosti. Dobro poklapanje između sertifikovanih i izmerenih vrednosti dokazalo je primenjivost ICP-MS za rutinsku determinaciju osnovnih elemenata, kao i elemenata u tragovima u biljnim i zemljišnim uzorcima (praktično, interference matriksa bile su dobro kompenzovane). Ipak, dodatno je bilo utvrđeno da efekat matriksa koji proističe iz manjeg broja (0.2–2%) čvrstih komponenata smese, značajno menja signale analita, pa se tačnost merenja narušava. Ovo je značilo da smetnje od matriksa potiču u stvari od smetnji između standarda i nepoznatih rastvora što dalje vodi do neophodne upotrebe kalibracionih grafova. Praktično, tačnost se mora povratiti upotrebom internih standarda, koji koriguju gubitak transfera energije između plazme i uzorka. Masson i sar. (2010) su zaključili da je izbor unutrašnjeg standarda od krucijalnog uticaja na tačnost analize, pa ovom izboru treba posvetiti posebnu pažnju.

### **2.2.2. Statističke metode kao deo hemometrijskog pristupa u analizi metala zemljišnih i biljnih uzoraka**

Prvi korak pri izboru adekvatne statističke metode je prepoznavanje tipova podataka (Miller i Miller 2005). Sa osnovne tačke statističkog gledanja na problem koji treba rešiti, postoje 2 osnovna tipa podataka: kategorijski i numerički. Kategorijski podaci predstavljaju zapažanja koja se mogu grupisati u određene kategorije, a ova vrsta podataka se dalje može podeliti u 3 grupe – nominalu, binarnu i ordinalnu. Zapažanja koja se mogu meriti na određenoj skali su numerički podaci. Prepoznavanje tipa podataka diktira dalje odgovarajući tip statističke analize i testova koje treba primeniti.

Za opisivanje osobina ulaznih podataka svakog metoda statističke analize, koristi se takozvana deskriptivna analiza u kojoj se mogu upotrebiti i razne vrste deskriptivnih plotova (Slika 20.). Rezultujuće varijable od interesa (eng. *Outcome*) se često nazivaju zavisne varijable, dok se opisne, objašnjavajuće varijable, koje mogu predvideti rezultat, nazivaju nezavisnim varijablama (Pripp 2013).



Slika 20. Najčešće korišćeni deskriptivni plotovi: (a) bar čart, (b) boks plot, (c) linijski plot, (d) histogram (e) skaterplot (Pripp 2013)

### 2.2.2.1. Kratki pregled najčešće korišćenih statističkih metoda

Po Ho (2006), klasične statističke metode, trebalo bi podeliti na dva glavne grupe – prva sagledava tehnike koje se koriste u istraživanjima odnosa uticaja između ispitivanih varijabli, a druga sagledava tehnike koje se koriste prilikom utvrđivanja statistički značajnih razlika između grupa:

1) Istraživanja odnosa uticaja između ispitivanih varijabli

Ove analize izvode se na odnosima među kontinualnim varijablama.

- Korelacije: postoje dve vrste korelacija koje se uobičajeno koriste kada treba istražiti jačinu međuodnosa između dve kontinualne varijable – Pearson-ova, ili Spearman-ova. One pružaju indicaciju o oba pravca odnosa (pozitivnog, ili negativnog), kao i o jačini međuodnosa. Pozitivna korelacija indicira da ukoliko jedna varijabla raste, raste i druga, dok negativna korelacija indicira da kako jedna varijabla raste, tako druga opada. Vrednost koeficijenta koji se dobija pri ovim analizama ( $r$ ), tj. jačina korelacione veze može biti niska, odnosno slaba,  $r = 0,10 - 0,29$ , srednja,  $r = 0,30 - 0,49$  i snažna, tj. visoka,  $r = 0,50 - 1,0$ . Ipak, odlučujući faktor pri razmatranju izračunatih korelacija je nivo njihove statističke značajnosti (dvostrano, tj. dvosmerno provereno, *eng.*, Sig. 2

tailed:  $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ); ove vrednosti ne ukazuju na jačinu veze, već na njihovu pouzdanost sa statističke tačke gledišta (praktično, sa koliko poverenja treba prihvatiti izračunate vrednosti koeficijenta) (Palant 2001).

- Parcijalna korelacija predstavlja ekstenziju Pearson-ove korelacije koja omogućava kontrolu mogućeg uticaja druge sumnjive varijable. Ona uklanja efekat sumnjive varijable i omogućava tačniju analizu.

- Multipla regresija je sofisticiranija ekstenzija korelacione analize i koristi se kada se želi istraživanje prediktivne sposobnosti seta nezavisnih varijabli na jedno kontinualno zavisno merenje.

- Faktorijalna analiza dozvoljava kondenzaciju širokog seta varijabli u jedan manji, sa manje operativnih brojeva dimenzija, ili faktora.

## 2) Istraživanja razlika između grupa

Ova vrsta statistike koristi se kada je potrebno utvrditi statistički značajne razlike između jednog određenog broja grupa. Ovde su uključene i parametarske verzije ovih testova, koji su podesni kada se radi o merljivim podacima sa normalnom distribucijom rezutata, ali i neke neparametarske alternative.

- T-testovi se koriste kada postoje 2 grupe, ili 2 seta podataka i kada se želi uporediti srednja vrednost rezultata na nekoj kontinualnoj varijabli. Postoji dve vrste t-testova: 1) t-test uparenog uzorka se koristi kada postoji interes za ispitivanje promena rezultata za participante testirane u Vreme 1 i kasnije, u Vreme 2 i 2) t-test nezavisnog uzorka se koristi kada se posmatraju 2 različite (nezavisne) grupe participanata, kao i kada je potrebno upoređivanje njihovih rezultata.

- Jednosmerna analiza varijanse (eng. *One-way analysis of variance, One-way ANOVA*) slična je t-testu, ali se koristi kada postoje 2, ili više grupa i kada se želi komparacija njihovih srednjih rezultata na kontinualnoj varijabli. Nazvana je jednosmernom jer se posmatra uticaj samo jedne nezavisne varijable na posmatranu zavisnu varijablu. Ovde se može izvesti takozvani post-hoc-test, odnosno poređenja u cilju nalaženja grupa koje se značajno razlikuju između sebe.

- Dvosmerna analiza varijanse (eng. *Two-way analysis of variance, Two-way ANOVA*) omogućava testiranje uticaja 2 nezavisne varijable na jednu zavisnu varijablu, tj. kada je efekat jedne nezavisne varijable pod uticajem druge.

Prupp (2013) opisuje podelu statističkih metoda na multivarijantne i univarijantne. Multivarijantne statističke metode uključuju simultanu analizu više od jedne zavisne (outcome) varijable. Ona obično uključuje metode kao što su analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis, PCA*), faktorijalna analiza, FA, klaster analiza (eng. *Cluster analysis, CA*), i dr. Multivarijantna statistika, po striktno statističkoj terminologiji, razlikuje se od univarijantnih metoda po tome što uključuje simultanu analizu više od jedne zavisne (outcome) varijable. Klasifikacija, klasterisanje i prepoznavanje obrazaca (modela) su različiti, ali su bliski termini koji se odnose na statističke procese. Koriste se radi specifikacije uzoraka u jedan set kategorija.

Gad i sar. (2013) ovo definišu još jednostavnije – kao povezivanje objekata po datom kriterijumu. Najčešće upotrebljavana tehnika u ovom smislu je takozvana hijerarhijska klaster analiza, HCA. Tehnike hijerarhijskog klasterisanja su bazirane na kreiranju razgranatih struktura (takozvanih dendrograma), koje su kvalitativne prirode i omogućavaju vizualizaciju klastera (grupa) i korelacija među ispitivanim uzorcima. HCA može da koristi dve glavne tehnike za komparaciju uzoraka: 1) kod aglomeracione tehnike, svako posmatranje počinje u njegovom sopstvenom individualnom klasteru i spaja se sa drugim klasterima pomerajući se naviše (u smislu – po rastućoj hijerarhiji); 2) razdvajajuća tehnika međutim, počinje sa svim uzorcima u jednom klasteru, koji se dalje razdvaja po opadajućoj hijerarhiji. Odluka o tome kada bi se trebala primeniti tehnika spajanja, a kada razdvajanja klastera, mora biti zasnovana na ispravno odabranoj metodi merenja razlika/sličnosti između uzoraka, kao i na osnovu kriterijuma povezivanja koji specifikuje (karakterise) razlike/sličnosti između klastera. Gad i sar. (2013) zaključuju da, praktično, HCA prikazuje podatke kao kvalitativne klastere u vidu obrazaca, odnosno matrica u jednom dvodimenzionalnom prostoru. Generalno, jednostavna forma multivarijantnih podataka je pravougaona tabela (matrica) koja se sastoji od  $n$  redova,  $m$  kolona, a svaka ćelija sadrži numeričku

vrednost. Svaki red odgovara nekom objektu, na primer uzorku; svaka kolona odgovara određenoj osobini objekta. Podaci se prikazuju kao promenljive (multivarijantni podaci) ucrtane u istom broju dimenzija koliko i ima promenljivih.

### 2.3. Primeri hemometrijskog pristupa u analizi metala zemljišnih i biljnih uzoraka sa posebnim akcentom na fitoremedijaciju i biomonitoring

Brojni su primeri primene hemometrije u radovima koji obrađuju problematiku fitoremedijacije i biomonitoringa, zatim nutritivnih i medicinskih vrednosti pojedinih jestivih biljaka, ili pak njihove toksičnosti, kao i različitih ekoloških rizika, itd., gde je potreba za analizama zemljišnih i biljnih uzoraka izuzetno velika, praktično neophodna.

Tako na primer, u jednom od novijih radova na temu fitoremedijacije, Elshamy i sar. (2019) su uz pomoć hemometrijskog pristupa, utvrdili da biljka *Portulaca oleracea* iz Dakahlia districta u Egiptu, ima sposobnost hiperakumulacije ispitivanih metala: Mn(II), Cu(II), Zn(II), Fe(III) i Pb(II), kao i da se može primeniti u fitoekstrakcionoj metodi. Ona je takođe bila upoređena i sa nekim drugim akumulatorskim biljkama iz istog regiona (*Amaranthus viridus*, *Malva parviflora*, *Chenopodium murale* i *Echinochloa colonum*). Primenjene hemijske metode bile su: digestija korena i izdanaka, zatim merenje koncentracija ispitivanih metala pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra (VARIAN, AA240FS) i konačno, primenjene statističke metode bile su: One-way ANOVA koristeći Tukey HSD test sa  $P < 0.05$  (SPSS version 20, 2011, IBM Corp., Armonk, NY, USA), radi utvrđivanja statistički značajnih razlika među *P. oleracea* sa 9 studiranih mesta, dok je klaster analiza (uz upotrebu dendrograma) bila primenjena na sve sakupljene biljke (SYSTAT version 7.0 program); jednostavna linijska korelacija bila je korišćena za utvrđivanje odnosa između koncentracija metala u zemljištu i biljnim delovima *P. oleracea* (Origin version 8.1, 200 Origin Lab, Northampton).

U cilju praćenja izvora zagađenja, Schreck i sar. (2020) ispitivali su epifitne biljke *Tillandsia usneoides* kao biomonitore sadržaja elemenata u tragovima u atmosferi rudarskog okruga Kartahena-La Union (Španija); praktično, proučavana je relevantnost *Tillandsia usneoides* da bi se procenio prenos metala (loida) iz bivše zone rudarstva Zn i Pb na jugoistoku Španije (Cartagena-La Union) u lokalnu atmosferu. Biomonitoring je izvršen postavljanjem odgovarajućih postrojenja na 5 lokacija duž pravca od glavnog rudarskog područja do urbane i priobalne zone. Određena količina biljaka sakupljana je na svakom mestu svaka 2 meseca tokom 1 godine. Uzorci *Tillandsia usneoides* posmatrani su pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa sa energetski disperzivnim detektorom, SEM-EDKS i analizirani ICP-MS metodom da bi se odredile koncentracije elemenata u tragovima, ali i signali magnetne osetljivosti i odnosi izotopa Zn i Pb. Rezultati su pokazali da su atmosferske čestice homogeno raspoređene na površini biomase biljke. Upoređivanjem elementarnih sadržaja u *Tillandsia usneoides* u odnosu na vrednosti pozadinskih geohemijskih koncentracija u regionu Mursije, uočeno je značajno obogaćivanje epifitnih biljaka u slučajevima Sb, As, Cd, Zn i Pb. Statističke analize: nekonvencionalna PCA i PLS (eng. *Partial Least Square*,) takođe su sugerisale da je kinetika taloženja prašine sporija za urbana i priobalna mesta u poređenju sa lokacijama rudarenja i naglasile uticaj poljoprivrednih aktivnosti na taloženje Cu. Sličnost izotopskog sastava (Zn i Pb) između *Tillandsia usneoides*, zemljišta i atmosferskih čestica takođe je pokazalo da bi ove biljke mogle biti moćno sredstvo za praćenje izvora zagađujuće materije u atmosferi. Konačno, ovaj eksperiment pružio je i novi uvid za bolje razumevanje mehanizama folijarne apsorpcije. Procedura ispiranja je takođe primenjena za nekoliko biljaka da bi se odredili efekti procesa pranja i uklonile potencijalne adhezivne čestice prisutne na površinama biljaka. Posle toga, svaka biljka bila je stavljena u ultra čistu vodu, sonifikovana 3 min i ponovo isprana. Biljke su zatim sušene na 40°C tokom 48 h i usitnjene u ahatnom avanu u tečnom azotu. Uzorci sprasanih biljaka su zatim ponovo sušeni 48 h i čuvani u polietilenskim bočicama. Postupak pranja je omogućio skidanje oko 20% deponovanih čestica. Paralelno sa radom na *T. usneoides*, uzorci zemljišta su prikupljeni u neposrednoj blizini bioindikatora. Kompozitni uzorak gornjeg sloja zemlje je obrazovan, osušen na vazduhu, prosejan na 2 mm i samleven na prstenu od ahata. Osušeni uzorci (0,1 g zemlje, odnosno biljke) rastvarani su korišćenjem mešavine bidestilovanih i ekstra čistih, kvalitetnih reagenasa. Pripremljen je rastvor od 5 mL bi-destilovane HNO<sub>3</sub>, 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 200 mL HF i dodat je svakom uzorku, a zatim ostavljen preko noći. Nakon dodavanja 5 mL bidestilovane HNO<sub>3</sub>, kisela mineralizacija sprovedena je na "Discover" CEM<sup>®</sup> mikrotalasnom

aparatu pod pritiskom, koristeći bočice od 35 mL u kvarcnim cevima i prilagođene teflonske PFA obloge i poklopce (u toku 10 minuta, 3 ciklusa do 180°C). Nakon toga, rastvori su potpuno upareni na 60°C na rešou i suvi ostatak je resuspendovan dodavanjem 0,5 mL HNO<sub>3</sub>. Nakon mineralizacije, uzorci su razblaženi bidestilovanom vodom i filtrirani kroz membranski celulozno-acetatni filter od 0,22 mm. Filterske membrane su proverene da nemaju uticaja na sadržaj metala u uzorcima. Sprovedene su dve vrste statističkih analiza. Prva se sastojala od proučavanja evolucije koncentracije hemijskih elemenata od referentne tačke koju čini mesec maj 2017. godine, datum kada su merna postrojenja postavljena. Ovoj vrsti podataka prilagođena je nekonvencionalna analiza glavnih komponenti. Centriranje nije obavljeno kao u konvencionalnoj PCA u odnosu na prosek, već u odnosu na referencu zajedničku za sve uzorke, koja u ovom eksperimentu odgovara prvom datumu. Podaci koji nedostaju za magnetnu susceptibilnost nisu upotpunjeni srednjom vrednošću varijabli već njenom referentnom vrednošću, odnosno njenom vrednošću uzetom na početku eksperimenta. Druga analiza je uporedila koncentracije hemijskih elemenata u biljkama u aprilu 2018. godine sa koncentracijama elemenata uskladištenih u zemljištu i akumuliranih u vazduhu tokom eksperimenta. PLS2 korišćena je za objašnjenje odnosa koncentracija biljnih hemijskih elemenata iz koncentracija u zemljištu, ili onih akumuliranih u vazduhu. Podaci koji nedostaju (stanica Santa Antonieta u januaru 2018. i magnetna osetljivost u La Union u septembru 2017. i januaru 2018.) zamenjeni su prosekom odgovarajućih varijabli. Glavni rezultati istakli su uticaj lokalnih i abiotičkih faktora (sadržaj TE i hemijski oblici u odnosu na geohemijsku pozadinu regiona Mursije, smer vetra, antropogene aktivnosti u okolini) na kinetiku atmosferskog taloženja na površini lista. Čini se da hemijski oblik TE u atmosferi u velikoj meri utiče na njegovo usvajanje i bioakumulaciju u biljnim tkivima, svakako u zavisnosti od svojstva biodostupnosti. Tada to može izazvati ozbiljne posledice na kontaminaciju životne sredine, ali i rizike po ljudsko zdravlje. Dalje studije o TE specijaciji i sastavu izotopa u različitim delovima životne sredine su u toku kako bi se bolje razumele biogeohemijske transformacije i mehanizmi koji se javljaju u rudarskim sredinama, a posebno u biljkama epifita.

U hemometrijskoj studiji podataka analize tla, Spanos i sar. (2004), bavili su se interpretacijom podataka analiziranog zemljišta prikupljenog sa 31 mesta uzorkovanja u regionu Kavale i Drame, severna Grčka. Određivano je 16 različitih hemijskih i fizičko-hemijskih karakteristika radi prognoze tretmana zemljišta, pre svega đubrenja. Sprovedena studija ukazala je da je primena multivarijantnih statističkih pristupa (CA i PCA) mogla otkriti nove i specifične informacije o mestima uzorkovanja. Procedura raspodele ukazala je na izvorne doprinose merenih parametara, a multivarijantna statistička analiza podataka iz monitoringa zemljišta dokazala je da se i neke dodatne informacije mogu dobiti i koristiti u raznim procedurama za tretman zemljišta i poljoprivredi. Spanos i sar. (2004) su zaključili da, koristeći hemometriju, onaj koji se bavi problemima u poljoprivredi određenog regiona, mogao bi povećati nivo informacija o zemljištu, rastu biljaka, povećanju plodnosti zemljišta i očuvanju ekološke ravnoteže u jednom održivom režimu.

Potencijal sanacije zagađenih terena sukcesijskim pionirskim vrstama: *Chenopodium album* i *Tripleurospermum inodorum*, ispitivan je u radu Tózsér i sar. (2019). Cilj ovog istraživanja bio je da se analizira potencijal akumulacije i translokacije metala dva uobičajena, rano sukcesijska pionirska korova, *Chenopodium album* i *Tripleurospermum inodorum*, koji su uzgajani na zemljištu sa umerenom kontaminacijom metala. Istraživane su razlike među vrstama u pogledu njihove koncentracije metala, ali i među različito kontaminiranim delovima proučavanog područja. Štaviše, faktori akumulacije i translokacije su korišćeni da bi se procenilo da li su vrsta, ili bilo koji od njihovih biljnih organa: koren, stabljika, izdanak (= stabljika + list) i list, sposobni da akumuliraju metale u visokim koncentracijama. Područje istraživanja bilo je u predgrađu Debrecina, u Mađarskoj. Uzorci zemljišta su sakupljeni svrdlom za zemlju od 50 mm iz tri različita kontaminirana dela područja istraživanja. Za elementalnu analizu zemljište je sušeno na vazduhu, homogenizovano u ahatnom avanu (0,2 g sa tačnošću od 0,005 g), a zatim preneto u staklene čaše od 100 ml i dosušeno na 105°C preko noći. Uzorci su rastvarani u 4 ml 65% (m/m) HNO<sub>3</sub> i 0,5 ml 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na rešou do potpunog isparavanja hemikalija. Zatim je u osušene uzorke dodato 5



ml 3×-dejonizovane vode. Pre nego što su rastvori prenešeni u plastične epruvete, staklene čaše su prenete u ultrazvučno vodeno kupatilo da bi se ostaci uzorka koji su se zalepili za zidove čaše, odlepili. Zatim su uzorci razblaženi do 10 ml upotrebom 1% (m/m) HNO<sub>3</sub>. Elementi koji su bili analizirani tehnikom MP-AES (eng. *Microvave Plasma-Atomic Emission Spectrometry*) su: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn. Biljne jedinke su sakupljene iz različito kontaminiranih delova istraživanog područja početkom septembra 2015. Datumi uzorkovanja biljaka odabrani su tako da se procene potencijali i vrste akumulacije metala do kraja vegetacionog perioda. Pet jedinki *C. album* i *T. inodorum* je sakupljeno iz radijusa od 10 metara oko svakog jezgra tla. Svi uzorci su stavljeni u plastične pakete i čuvani na +4°C do laboratorijskog procesa. U laboratoriji su jedinke oprane, ali po odvojenim biljnim delovima kao što su korenje, stabljika i listovi. Svaki biljni deo je osušen na vazduhu u papirnoj vrećici 24 sata. Nakon toga, biljni delovi su sušeni na 60°C tokom 48 sati. Pre elementalne analize, 0,2g biljnih uzoraka (sa tačnošću od 0,005 g) homogenizovano je u ahatnom avanu. Zatim su biljni uzorci rastvarani u 4 ml 65% (m/m) HNO<sub>3</sub> i 0,5 ml 30% (m/m) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rastvori su preneti u staklene čaše i dopunjeni 3×-dejonizovanom vodom do količine od 25 ml. Nakon toga, rastvori su stavljeni u plastične epruvete za centrifugiranje. Sa MP-AES-om analizirani su sledeći metali: Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn. Statističke analize koje su bile korišćene su: prirodni logaritmi (ln) vrednosti koncentracija, Levenov test (za analizu homogenosti varijansi), generalizovani linearni model, GLM (za ispitivanje značajnih razlika,  $p < 0,05$  između koncentracija metala (I) biljaka, (II) biljnih organa i (III) delova područja istraživanja sa različitim nivoima kontaminacije); za proučavanje razlika u koncentraciji metala između biljnih organa, korišćena je PCA; za analizu korelacije u koncentracijama metala između uzoraka zemljišta i biljnih organa, izračunat je Pearson-ov koeficijent korelacije ( $r$ ) i procenjena je značajnost na nivou od 0,05. Rezultati ove studije su pokazali da su i *Chenopodium album* i *Tripleurospermum inodorum* pokazali nizak potencijal akumulacije metala u području istraživanja. Upoređujući ove dve vrste, pokazalo se da je *T. inodorum* bolji akumulator Al, Fe, Mn, Na, Ba, Cr i Ni, dok je *C. album* bio bolji akumulator K, Mg i Sr. Koncentracije metala u dve vrste uglavnom su bile niske. Sumirajući, *C. album* i *T. inodorum* su sposobne da indikuju i akumuliraju nekoliko metala u zemljištu i stoga imaju dobar potencijal u ranim fazama fitoremedijacije, pomažući dalju remedijaciju koju karakterišu drvenaste vrste.

Hemometrijska studija, ali ujedno i studija životne sredine Jabłońska-Czapla i sar. (2020), bavila se uticajem zagađene vode i sedimenta reka regiona iz Gornje Silesie (takozvani Bytomka River-basen u Poljskoj) na akumulaciju brojnih metal(oid)a (Mg, Cu, Rh, Cd, In, Ba, Ce, Pb, U, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, Te, Sb, Ba, Tl i Pb) u tri biljne vrste koje rastu na njihovim obalama: *Stuckenia pectinata* L., *Urtica dioica* L. i *Galium aparine* L., a onda su bili izračunati i različiti indeksi zagađenja, kao što su: geo-akumulacioni indeks,  $I_{geo}$  i indeks unosa zagađenja (eng. *pollution load index, PLI*). Biljke su nađene na 5 lokacija reke Bytomka i koncentracije metal(oid)a u njima, kao i u odgovarajućim uzorcima voda i sedimenata (sa dna reke) bile su detektovane na HPLC-ICP-MS aparatu; one su se kretale kao što je dato u Tabelama 5., 6., 7., 8. i 9., respektivno:

**Tabela 5.** Koncentracije metal(oid)a u *Stuckenia pectinata* L. sa obala reke Bytomka (Jabłońska-Czapla i sar. 2020)

Element (mg/kg)	LOD	U%	B1	B2	B3	B4	B5
V	0,09	10	N/A	N/A	5,55 ± 0,61	0,45 ± 0,05	1,48 ± 0,16
Mn	0,03	10	N/A	N/A	1719 ± 172	3,15 ± 0,32	43,9 ± 4,39
Co	0,07	10	N/A	N/A	6,71 ± 0,67	0,21 ± 0,02	0,31 ± 0,03
Ni	0,11	21	N/A	N/A	20,9 ± 4,39	2,63 ± 0,02	3,17 ± 0,67
Cu	0,11	10	N/A	N/A	11,0 ± 1,1	6,03 ± 0,60	9,21 ± 0,92
Zn	0,18	31	N/A	N/A	438 ± 136	73 ± 22	80 ± 25
As	0,09	29	N/A	N/A	65,4 ± 19	3,85 ± 1,12	10,6 ± 3,07
Rb	0,003	14	N/A	N/A	20,7 ± 2,9	9,70 ± 1,36	12,8 ± 1,79
Sr	0,01	11	N/A	N/A	165 ± 18,1	0,24 ± 0,03	101 ± 11

<b>Ag</b>	0,002	10	N/A	N/A	0,19 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,17 ± 0,02
<b>Cd</b>	0,01	10	N/A	N/A	1,01 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,40 ± 0,04
<b>Ba</b>	0,1	15	N/A	N/A	62,4 ± 9,4	0,77 ± 0,12	19,6 ± 2,94
<b>Tl</b>	0,004	28	N/A	N/A	0,26 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,30 ± 0,08
<b>Pb</b>	0,09	12	N/A	N/A	73,2 ± 8,8	3,11 ± 0,37	7,64 ± 0,92
<b>Cr</b>	0,11	23	N/A	N/A	62,2 ± 14,3	7,84 ± 1,8	15,5 ± 3,6
<b>Sb</b>	0,01	28	N/A	N/A	0,71 ± 0,19	0,10 ± 0,03	0,15 ± 0,04

B1-B5 – mesta uzorkovanja (juli 2014.), N/A – biljna vrsta nije bila prisutna na mestu uzorkovanja,

LOD – limit detekcije,

U – merna nesigurnost

**Tabela 6.** Koncentracije metal(oid)a u *Urtica dioica L.* sa obala reke Bytomka (Jabłońska-Czapla i sar. 2020)

Element (mg/kg)	LOD	U%	B1	B2	B3	B4	B5
<b>V</b>	0,09	10	0,79 ± 0,09	2,8 ± 0,31	0,36 ± 0,04	1,61 ± 0,18	0,62 ± 0,07
<b>Mn</b>	0,03	10	39,5 ± 3,9	283 ± 28	39,1 ± 3,9	572 ± 57	34,9 ± 3,49
<b>Co</b>	0,07	10	0,33 ± 0,03	1,44 ± 0,14	0,15 ± 0,02	2,75 ± 0,28	0,24 ± 0,02
<b>Ni</b>	0,11	21	2,23 ± 0,47	17,3 ± 3,6	1,23 ± 0,26	7,78 ± 1,63	2,42 ± 0,51
<b>Cu</b>	0,11	10	9,51 ± 0,95	11,5 ± 1,2	9,53 ± 0,95	7,97 ± 0,80	6,12 ± 0,61
<b>Zn</b>	0,18	31	49,6 ± 15,4	193 ± 60	228 ± 70	399 ± 124	101 ± 31,3
<b>As</b>	0,09	29	3,48 ± 1,01	16,8 ± 4,9	6,54 ± 1,90	29,9 ± 8,67	4,09 ± 1,19
<b>Rb</b>	0,003	14	15,0 ± 2,1	19,3 ± 2,7	17,3 ± 2,4	23,5 ± 3,29	24,4 ± 3,42
<b>Sr</b>	0,01	11	102 ± 11	103 ± 11	121 ± 13	111 ± 12,2	79,3 ± 8,7
<b>Ag</b>	0,002	10	0,12 ± 0,01	0,39 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01
<b>Cd</b>	0,01	10	0,24 ± 0,02	1,93 ± 0,19	1,88 ± 0,19	0,24 ± 0,02	0,53 ± 0,05
<b>Ba</b>	0,1	15	27,6 ± 4,1	29,5 ± 4,4	80,4 ± 12,1	29,4 ± 4,4	79,2 ± 11,9
<b>Tl</b>	0,004	28	0,39 ± 0,11	0,44 ± 0,12	0,92 ± 0,26	0,21 ± 0,06	0,50 ± 0,14
<b>Pb</b>	0,09	12	8,40 ± 1,01	56,7 ± 6,8	4,44 ± 0,53	34,4 ± 4,13	4,59 ± 0,55
<b>Cr</b>	0,11	23	10,2 ± 2,35	76,7 ± 17,6	4,50 ± 1,03	8,47 ± 1,95	9,09 ± 2,09
<b>Sb</b>	0,01	28	0,24 ± 0,07	0,45 ± 0,13	0,03 ± 0,01	0,42 ± 0,12	0,04 ± 0,01

B1-B5 – mesta uzorkovanja (juli 2014.), N/A – biljna vrsta nije bila prisutna na mestu uzorkovanja,

LOD – limit detekcije,

U – merna nesigurnost

**Tabela 7.** Koncentracije metal(oid)a u *Galium aparine L.* sa obala reke Bytomka (Jabłońska-Czapla i sar. 2020)

Element (mg/kg)	LOD	U%	B1	B2	B3	B4	B5
<b>V</b>	0,09	10	0,30 ± 0,03	N/A	0,69 ± 0,08	0,44 ± 0,05	2,05 ± 0,23
<b>Mn</b>	0,03	10	15,9 ± 1,6	N/A	24,9 ± 2,5	38,8 ± 3,9	2,67 ± 0,27
<b>Co</b>	0,07	10	0,15 ± 0,02	N/A	0,24 ± 0,02	0,16 ± 0,02	4,54 ± 0,45
<b>Ni</b>	0,11	21	1,70 ± 0,36	N/A	3,71 ± 0,78	0,64 ± 0,13	10,1 ± 2,1
<b>Cu</b>	0,11	10	8,61 ± 0,92	N/A	9,07 ± 0,91	3,86 ± 0,39	8,18 ± 0,82
<b>Zn</b>	0,18	31	88,3 ± 27,4	N/A	158 ± 49	26,1 ± 8,1	255 ± 79
<b>As</b>	0,09	29	2,23 ± 0,65	N/A	10,5 ± 3,0	4,25 ± 1,23	1,73 ± 0,50
<b>Rb</b>	0,003	14	15,5 ± 2,2	N/A	16,7 ± 2,3	11,4 ± 1,6	16,4 ± 2,3
<b>Sr</b>	0,01	11	93,1 ± 10,2	N/A	190 ± 21	146 ± 16	0,20 ± 0,02
<b>Ag</b>	0,002	10	0,08 ± 0,01	N/A	0,50 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,02 ± 0,002
<b>Cd</b>	0,01	10	0,54 ± 0,05	N/A	0,28 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,2 ± 0,02
<b>Ba</b>	0,1	15	223 ± 33	N/A	32,3 ± 4,8	28,2 ± 4,2	22,3 ± 3,34
<b>Tl</b>	0,004	28	0,32 ± 0,09	N/A	0,78 ± 0,22	0,13 ± 0,04	0,04 ± 0,01
<b>Pb</b>	0,09	12	7,51 ± 0,90	N/A	6,57 ± 0,79	2,48 ± 0,30	35,1 ± 4,2
<b>Cr</b>	0,11	23	4,51 ± 1,03	N/A	12,5 ± 2,9	5,85 ± 1,34	21,8 ± 0,5
<b>Sb</b>	0,01	28	0,13 ± 0,04	N/A	0,10 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,50 ± 0,14

B1-B5 – mesta uzorkovanja (juli 2014.), N/A – biljna vrsta nije bila prisutna na mestu uzorkovanja,

LOD – limit detekcije,

U – merna nesigurnost

**Tabela 8.** Koncentracije metal(oid)a u uzorcima voda reke Bytomka (Jabłońska-Czapla i sar. 2020)

Element (µg/L)	LOD	U%	B1	B2	B3	B4	B5
<b>V</b>	0,09	10	8,44 ± 0,93	7,64 ± 0,84	7,29 ± 0,81	6,51 ± 0,72	5,65 ± 0,62
<b>Mn</b>	0,03	10	346 ± 35	326 ± 32	352 ± 35	324 ± 32	250 ± 25
<b>Co</b>	0,07	10	1,82 ± 0,18	1,23 ± 0,12	1,15 ± 0,12	1,12 ± 0,11	0,98 ± 0,10

Ni	0,11	21	7,53 ± 1,58	8,94 ± 1,88	10,3 ± 2,2	9,96 ± 2,09	8,24 ± 1,73
Cu	0,11	10	3,26 ± 0,33	3,67 ± 0,37	2,83 ± 0,28	2,54 ± 0,53	3,59 ± 0,75
Zn	0,18	31	36,0 ± 11,2	57,2 ± 17,7	67,1 ± 20,8	63,4 ± 19,6	65,4 ± 20,3
As	0,09	29	7,64 ± 2,22	10,2 ± 3,0	10,0 ± 2,9	9,23 ± 2,68	6,67 ± 1,93
Rb	0,003	14	39,8 ± 5,6	44,8 ± 6,3	40,62 ± 5,69	36,4 ± 5,1	30,0 ± 4,2
Sr	0,01	11	1989 ± 219	2850 ± 313	2369 ± 261	2056 ± 226	1464 ± 161
Ag	0,002	10	0,22 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,001	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Cd	0,01	10	0,29 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,35 ± 0,04	0,12 ± 0,01	0,34 ± 0,03
Ba	0,1	15	80,9 ± 12,1	50,4 ± 7,6	53,9 ± 8,1	50,4 ± 7,6	49,4 ± 7,4
Tl	0,004	28	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Pb	0,09	12	5,30 ± 0,64	1,27 ± 0,15	7,54 ± 0,91	1,22 ± 0,15	8,01 ± 0,96
Cr	0,11	23	25,2 ± 5,8	23,6 ± 5,43	21,6 ± 5,0	18,6 ± 4,3	14,0 ± 3,2
Sb	0,01	28	1,77 ± 0,50	1,38 ± 0,39	1,56 ± 0,44	1,55 ± 0,43	1,40 ± 0,39

B1-B5 – mesta uzorkovanja (juli 2014.),

LOD – limit detekcije,

U – mera nesigurnost

**Tabela 9.** Koncentracije metal(oid)a u uzorcima sedimenata sa dna reke Bytomka (Jabłońska-Czapla i sar. 2020)

Element (mg/kg)	LOD	U%	B1	B2	B3	B4	B5
V	0,09	10	74,1 ± 8,2	26,2 ± 2,9	131 ± 14	46,5 ± 5,1	24,8 ± 2,7
Mn	0,03	10	1721 ± 172	1256 ± 126	1644 ± 164	610 ± 61	658 ± 66
Co	0,07	10	28,9 ± 2,9	7,65 ± 0,77	22,9 ± 2,3	9,73 ± 0,97	3,35 ± 0,34
Ni	0,11	21	71,4 ± 15,0	57,4 ± 12,0	69,4 ± 14,6	26,4 ± 5,5	9,37 ± 1,97
Cu	0,11	10	172 ± 17,2	39,1 ± 3,9	172 ± 17	69,9 ± 14,7	27,1 ± 5,7
Zn	0,18	31	2519 ± 781	5333 ± 1653	10101 ± 3131	1274 ± 395	551 ± 171
As	0,09	29	54,7 ± 15,9	12,6 ± 3,6	67,4 ± 19,5	16,2 ± 4,7	5,08 ± 1,47
Rb	0,003	14	65,2 ± 9,1	52,3 ± 7,3	55,9 ± 7,83	98,9 ± 13,9	33,9 ± 4,8
Sr	0,01	11	355 ± 39	179 ± 20	306 ± 34	159 ± 18	78,7 ± 8,7
Ag	0,002	10	4,08 ± 0,41	4,08 ± 0,41	9,97 ± 1,00	2,89 ± 0,29	0,62 ± 0,06
Cd	0,01	10	11,4 ± 1,1	4,18 ± 0,42	40,2 ± 4,0	4,57 ± 0,46	3,08 ± 0,31
Ba	0,1	15	412 ± 62	484 ± 73	1478 ± 222	631 ± 95	789 ± 118
Tl	0,004	28	1,60 ± 0,45	1,33 ± 0,37	6,36 ± 1,78	1,29 ± 0,36	0,86 ± 0,24
Pb	0,09	12	1541 ± 185	346 ± 42	2395 ± 287	477 ± 57	62,2 ± 7,5
Cr	0,11	23	99,7 ± 22,9	32,7 ± 7,5	185 ± 43	76,2 ± 17,5	51,9 ± 11,9
Sb	0,01	28	4,49 ± 1,26	1,61 ± 0,45	8,39 ± 2,35	2,13 ± 0,60	0,79 ± 0,22

B1-B5 – mesta uzorkovanja (juli 2014.),

LOD – limit detekcije,

U – mera nesigurnost

Koncept hemometrijske analize bio je osmišljen kao primena sledećih statističkih metoda: analiza razlike (eng. *Dis-similarity Analysis*), CA i PCA. One su pomogle u vizualizaciji varijabilnosti formi As, koncentracija uopšte, kao i u analizi korelacija između lokacija i sadržaja analita, što je dalje pomoglo u određivanju dinamike širenja ispitivanih polutanata duž celog rečnog toka.  $I_{geo}$  i PLI ukazali su na teško zagađenje samih ispitivanih lokacija. Autori su takođe zaključili da su *Stuckenia pectinata L.* i *Urtica dioica L.* sadržale značajne količine teških metala (pri čemu se *Stuckenia pectinata L.* više isticala) i da su obe pogodne za obnovu zagađenih terena.

Viktorova i sar. (2016) su u svojoj studiji potvrdili da iako *Urtica dioica L.* ima dobre potencijale za remedijaciju teških metala iz zagađenih zemljišta, ipak njena šira primena nije pokazala neke izuzetne fitoremedijacione rezultate. Zato su ovi autori ispitali uticaj nekih bakterija koje su bile izolovane iz biljnog tkiva na povećano usvajanje metala (Zn, Pb i Cd), ali i polihlorovanih bifenila, a onda su pokazali da i izvesne genetske manipulacije (takozvana tranziciona ekspresija) sa *Urtica dioica L.*, mogu dati još efektivnije rezultate i da tako, ova biljka može biti još korisnija u remedijaciji teških metala, kao i polihlorovanih bifenila. Da bi dokazali ove činjenice, Viktorova i sar. (2016) su koristili, pre svega, izračunavanje određenih bioakumulacionih faktora, dok statističke metode nisu bile primenjivane. Detekcija metala bila je izvedena na FAAS aparatu Spectr AA880, Varian, uz prethodno urađenu suhu digestiju.

Pavoni i sar. (2017) ispitivali su bioakumulaciju talijuma i drugih teških metala u *Biscutella laevigata* u blizini napuštenog rudnika Zn i Pb u Italijanskim Alpima. Korišćene metode bile su:

rastvaranje različitim kiselinama za različite matrikse (zemljište i biljni delovi) u sistemu otvorenih sudova, određivanje koncentracija metala pomoću ICP-OES i Elektro Termalnu Atomska Apsorpcionu Spektrometriju (ETAAS) za Tl, dok statističke analize nisu bile primenjene. Akumulacione sposobnosti ispitivane biljke bile su određivane samo na osnovu akumulacionih faktora i zaključeno je da se ova biljka može uspešno primeniti u revegetaciji oštećene oblasti.

Istraživanje sadržaja bakra u zemljištu vinograda, grožđu (*Vitis vinifera L.*), širi i vinu, u najvažnijim vinogradima Rumunije (Dealu Bujorului, Murfatlar, Tarnave, Jasi i Stefanesti), u preliminarnoj studiji, Donici i sar. (2019), pokazalo je da je dugotrajna upotreba sredstava na bazi bakra u vinogradarstvu izazvala njegovu veliku akumulaciju u zemljištu samih vinograda, a što je dalje rezultiralo u negativnim uticajima na životnu sredinu (kroz toksičnost za vodene i organizme u zemljištu). Za određivanje bakra u zemljištu vinograda, grožđu, širi i vinu, korišćena je ICP-MS metoda. Utvrđeno je da je koncentracija bakra u uzorcima crnog vina bila značajno veća nego u uzorcima belog vina, a na koncentraciju bakra u grožđu, širi i vinu, uticala je koncentracija bakra u zemljištu (praktično, fungicid bakra koji se koristi u zaštiti). Za sva proučavana područja, vrednosti zagađenja bakrom u zemljištu bile su iznad maksimalno dozvoljenih granica (20 mg/kg (eng. *maximally allowed limits, MAL*)). U svim uzorcima šire i vina dobijene vrednosti sadržaja bakra bile su ispod maksimalno dozvoljenih granica (1 mg/kg). Vrednosti translokacionog faktora (TF) i odnosa pokretljivosti (MR) ukazali su na to da *Vitis vinifera L.* ne dozvoljava akumulaciju bakra iz vinogradskog zemljišta u širi i vinu. Takođe je bilo očigledno da su geografski položaj i sorta imali značajan uticaj na sadržaj bakra u zemljištu, grožđu i vinu. Pored toga, između nivoa bakra u zemljištu, širi i vinima bile su prisutne određene značajne korelacije. Pokazano je i da je u procesu proizvodnje vina bitno više faktora kao što su: koncentracija bakra u zemljištu, biološka specifičnost sorti tokom rasta, ukupna količina primenjenog bakarnog fungicida u periodu proizvodnje, broj dana između poslednje primene i berbe, kao i sorte karakteristike. Koncentracija elemenata je procenjena statističkim metodama korišćenjem Duncan testa, SPSS verzija 24 (SPSS Inc., Čikago, IL, SAD). Statistička obrada rezultata je prvenstveno vršena u cilju izračunavanja prosečne i standardne devijacije. Ovi podaci su interpretirani analizom varijanse (ANOVA), a prosečno razdvajanje je izvršeno pomenutim Duncan testom na  $p = 0,005$ . Toplotna mapa, faktor translokacije i odnos mobilnosti izvedeni su korišćenjem Microsoft Excel (2016) i KSLSTAT Addinsoft verzije 15.5.03.370.

U radu Du i sar. (2015) ispitivani su potencijalni izvori i ekološki rizici od teških metala u poljoprivrednim zemljištima, Daie Citi, Kina. Merene su koncentracije osam teških metala: As, Cd, hroma (Cr), Cu, Hg, Ni, Pb i Zn i to u 92 uzorka gornjeg sloja tla prikupljena sa poljoprivrednih površina da bi se procenila distribucija ovih teških metala, razlučili prirodni i antropogeni doprinosi i identifikovali mogući izvori zagađenja. Srednje koncentracije As, Cd, Cu, i Zn u ispitivanim zemljištima iznosile su 23,8, 1,41, 105 i 159 mg/kg, respektivno. Ove vrednosti bile su veće, a u nekim slučajevima i za nekoliko redova veličine veće, od odgovarajućih pozadinskih, tj. prirodnih vrednosti. Procenjeni ekološki rizici, zasnovani na faktorima kontaminacije i potencijalnim indeksima ekološkog rizika, bili su uglavnom niski, ali su bili značajni za As i Cd. Niz osnovnih i multivarijantnih statističkih analiza (Pearson-ova korelaciona analiza, hijerarhijska klaster analiza i analiza glavnih komponenti) jasno je otkrio dve različite grupe metala sa približnim koncentracijama: As/Cd/Cu/Zn i Cr/Ni/Hg/Pb, a koje su bile povezane sa distribucijom i karakteristikama zagađenja industrija u gradu i okolini. Rezultati su pokazali da su As/Cd/Cu/Zn indikatori antropogenog zagađenja, dok grupa elementa: Cr/Hg/Ni/Pb potiče iz matičnih materijala.

Dermience i sar. (2014) ispitivali su minerale i elemente u tragovima u tradicionalnoj hrani ruralnih područja prefektore Lasa (Tibetanski autonomni region, Kina). Ova studija imala je za cilj da pruži relevantne podatke o mineralnom sastavu glavne tibetanske hrane. Uzorkovano je 16 različitih namirnica, uključujući vodu, koncentrovani kuvani crni čaj, pšenično brašno, sušeni sir, sušeno meso jaka, suvu ovčetinu, krvavicu, sušene divlje breskve, suvu kinesku rotkvicu, sušenu koprivu i još par specifičnih biljaka tog regiona. Analizirani su masenom spektrometrijom sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-MS) na 19 minerala: Na, K, P, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Se, Mo, Al, As, Cr, Co, Cd, Pb i V. Validnost rezultata je obezbeđena upotrebom standardnih

referentnih materijala. Izvršeno je statističko poređenje srednjeg sadržaja minerala u analiziranoj hrani sa podacima o sastavu hrane, tj. namirnica iz tabele CFC (sastav kineskih namirnica, Nacionalni institut za ishranu, 2009). Otkrivena su značajna odstupanja, naglašavajući važnost ovakve analize hrane za procenu kvaliteta ishrane u autonomnom regionu Tibeta. Potreba za podacima o sastavu hrane je utoliko važnija jer populacije koje žive u udaljenim oblastima često pate od raznih nedostataka u ishrani. Štaviše, podaci će nesumnjivo postati u potpunosti značajni u kontekstu istraživanja hipoteze o nedostatku minerala kao mogućeg faktora etiologije Kashin-Beck-ove bolesti, koju je potrebno dalje proučavati. Sva statistika je urađena korišćenjem R-sofvera (v. 2.2.1) za Windows. Shapiro-Wilck-ov test je primenjen da bi se otkrila moguća nenormalna distribucija varijabli. Kako raspodela nije bila na normalnom nivou, izvršena je logaritamska transformacija varijabli. Leven-ov test je primenjen da bi se otkrila moguća nehomogenost varijansi. Srednje vrednosti dobijene za analizirane minerale u različitim produktima upoređene su analizom varijanse (ANOVA) sa dva fiksna faktora. U slučaju statističke značajnosti, primenjena su višestruka poređenja sa Tukey-testom. Primenjeni su i t-testovi jednog uzorka da bi se uporedio srednji sadržaj minerala u analiziranoj hrani sa podacima o sastavu hrane iz Kineske tabele CFC (Nacionalni institut za ishranu, 2009), koja je najrelevantnija za procenu ishrane u Kini. Kada je nedostajao podatak za namirnicu, pokušano je poređenje sa najslučnijom hranom iz baze podataka o nutrijentima USDA za standardne reference (NDSR, V1.0, SR23) (Ministarstvo poljoprivrede SAD, 2010). P-vrednost niža od 0,05 razmatrana je za procenu značajnih statističkih efekata.

Gad i sar. (2013) su u svom preglednom radu opisali brojne radove primene hemometrije u autentifikaciji biljnih lekova i to na osnovu njihovih specifičnih svojstava utvrđenih različitim hemijskim metodama merenja, pa između ostalog i merenjem sadržaja brojnih minerala. Prikazan je i opšti pregled različitih metoda statističke analize, kao i koraci uključeni u njenoj primeni, a zatim i primenjene metode hemijske analize kao što su nuklearna magnetna rezonanca, NMR, hromatografske-, spektroskopske- (infracrvena-, IR i ultraljubičasta-, UV-spektroskopija, ICP-MS, ICP-OES, ICP-AES) i genetske analize. Tako na primer, u jednom od prezentovanih radova, koncentracije 15 elemenata u grupi ajurvedskih lekova koji sadrže visoke koncentracije Hg (nakon mineralizacije uzorka), određeni su pomoću ICP-OES i GFAAS (atomski apsorpcioni spektrometar sa grafitnom kivetom) (za Pb i Cd). Rezultati su bili podvrgnuti PCA i HCA, koje su pokazale razlike u sastavu proizvoda iste namene, ali koje proizvode različite kompanije i jake korelacije između grupa ispitivanih varijabli. U drugom prezentovanom radu, pedeset vrsta kineskog bilja, koje se obično koristi u formulama za regulaciju, ili poboljšanje funkcije bubrega, analizirano je na kalcijum, Ca, Fe, Mn, Mg, kalijum, K, natrijum, Na i Zn i to atomskom apsorpcionom spektroskopijom. Analiza podataka izvršena je putem PCA i HCA. PCA i HCA primenjene su za karakterizaciju uzoraka i u radu gde je sadržaj metala (Zn, P, Mn, Fe, Mg, Ca, Na, K, Cu, Sr i Ba) analiziran u zelenoj kafi (vrste *Coffea arabica* i *Coffea canephora* var. *Robusta*) i to pomoću ICP-AES. U narednoj studiji, autori su prijavili ICP-AES diferencijaciju zelenog, crnog i "oolong" čaja u kombinaciji sa PCA, HCA, LDA (linearna diskriminantna analiza) i BP-ANN (veštačka neuronska mreža sa propagacijom unazad). PCA, HCA i LDA su primenjene i za klasifikaciju *Ahiroklina satureiodes* i *Achirocline venosa* u kombinaciji sa ICP-OES. Kako navode Gad i sar. (2013), autori koji su ispitivali začinsko bilje (nana, timijan i ruzmarin) i klasične začine (crni biber, čili paprika, cimet, kim, slatka crvena paprika i kurkuma) analizirali su uzorke pomoću atomske spektrometrije; PCA i HCA klasifikovali su uzorke u pet grupa, a LDA je korišćena da pokaže kako su članovi grupa bili pravilno klasifikovani. PCA, LDA i CA primenjene su i za klasifikaciju različitih biljnih čajeva (poreklom od 18 biljaka) gde je analizirano 16 metala u tragovima, uz korišćenje ICP-AES i ICP-MS tehnika; PCA i CA su ih klasifikovali u pet grupa, a LDA je pokazala da je ovo grupisanje bilo 100% ispravno.

U preglednom radu Reinholds-a i sar. (2015), prikazane su različite analitičke tehnike u kombinaciji sa statistikom radi autentifikacije i određivanje kontaminanata u začинима (praktično, aditivima i začinskom bilju), a zbog njihovog diskriminisanja po geografskom, ili biološkom poreklu. Pregled obuhvata više od šezdeset studija koje se odnose na poslednju deceniju i koje opisuju prednosti različitih analitičkih metoda, uključujući višedimenzionalne (neciljane i ciljane)

pristupe sa multivarijantnim statističkim tehnikama za procenu kontaminanata u začinima i bilju (a u vezi sa istraživanjem njihove bezbednosti i pitanja kvaliteta). Hemometrijski pristup bio je baziran na primeni matematičkih, statističkih i drugih metoda, u cilju dobijanja objektivne ocene rezultata, odnosno smislenih informacija iz rezultata povezanih i nepovezanih skupova hemijskih podataka. Reinholds-a i sar. (2015) smatraju da zasnovano na multivarijantnoj analizi, u osnovi se pravi razlika između nenadgledanog i nadgledanog pristupa. Metode bez nadzora (nenadgledane), imaju za cilj da identifikuju klasterne, ili trendove među uzorcima, bez proriteta poznavanja klase, ili grupe. Nasuprot tome, nadgledane metode se prvenstveno zasnivaju na dodeljivanju objekata članovima klase za kreiranje odgovarajućeg matematičkog modela; nakon toga, nepoznati objekti (testni skup) mogu se predvideti. Ovi autori su došli do zaključka da se, u oblasti analize hrane, obično koriste nenadgledane metode - HCA i PCA. Popularne nadgledane metode: su LDA i delimična regresija najmanjih kvadrata, PLS. Multivarijantne metode, koje se najčešće koriste u preglednoj literaturi za opisivanje stečenog skupa analitičkih podataka, su PCA, HCA i paralelna faktorska analiza, PARAFAC. Primenjujući nenadgledane tehnike, moguće je dobiti pregled sadašnjeg skupa podataka, njegove varijanse, mogućih odstupanja, ili uticajne varijable. PCA se obično koristi za pojednostavljenje struktura i prikaza širokog spektra-skupa podataka, računajući manji broj moguće značajne linearne kombinacije (analiza glavnih komponenti) od velikog broja dostupnih varijabli. Centralna ideja o PCA u neciljanim studijama je smanjenje dimenzionalnosti od postojećeg seta podataka, koji se sastoji od velikog broja međusobno povezanih varijabli, zadržavajući onoliko varijacija koje su prisutne u skupu podataka kao moguće. Metoda razlaganja razvijena za višesmerne podatke (nizovi višeg reda), a u analogiji sa PCA, je PARAFAC. Za razliku od PCA, HCA se obično primenjuje za utvrđivanje sličnosti unutar nekoliko grupa. Postoje različite mogućnosti za izračunavanje ovih sličnosti, korišćenjem odgovarajućeg korelacionog koeficijenta, praktično, Euclidean-rastojanje. Glavna poređenja odnosa istraživanih hemijskih elemenata, data su u Tabeli 10..

**Tabela 10.** Primena analitičkih i statističkih metoda za analizu teških metala u začinskom i drugom bilju (Reinholds i sar. 2015)

Začini/začinsko bilje	Detektovani elementi	Metode hemijske analize	Metode statističke analize	Svrha	Literatura
Koriander, kumin, anis, mustard, crni biber	Fe, Mn, Zn, Co, Ni, Mo, Pb, Cr, Ca, Mg, Al, Si, P	ICP-OES	z-Test	C, O	Gupta i sar. (2003)
Ruzmarin, bosiljak, origano	Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg, Al, Ba, B	ICP-AES, FAAS, FAES	PCA	C, O	Razic i sar. (2005)
Gorki komorač, bosiljak	Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, Zn	ICP-AES	ANOVA	C	O'zcan i Akbulut (2008)
Paprika	As, Pb	HG-AFS, NIR, DRIFTS	PLS	C	Moros i sar. (2008)
Đumbir, cimet, timijan	Ba, Ca, Ce, Co, Cr, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Ni, P, Sr, Zn,	ICP-MS, ICP-OES	CA, LDA, PCA	C, O	Kara (2009)
Komorač, oregano	Fe, Cu, and Zn	AAS	DA	O	Tsogas i sar. (2010)
Paprika	Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Cd, Ba, Pb, Th, U, Mg, Ca, Sc, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As	HR-ICP-SFMS	AICM, PCA	C	Brunner i sar. (2010)
Šafran	Ca, Fe, Mg, P, Sr, Al, Mn, Zn, V, Cr, Se, Co, Ni, Mo, As, Cu, Cd, Hg, Pb	ICP-MS, ICP-AES	LRA	C	Jia i sar. (2011)
Kari, coriander	Na, Fe, Mg, Mn, Pb, Zn, Cd, Cu	AAS	ANOVA	C	Subramanian i sar. (2012)
Timijan, ruzmarin, crni biber, čili, cimet, kumin, crvena paprika i kurkuma	As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr, Zn	ICP-MS, ICP-AES	CA, LDA, PCA	C	Karadas i Kara (2012)
Bosiljak, cimet, bosiljak, đumbir, ruzmarin, kopar	Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Pb	ICP-MS	CA, PCA	C	Tokahog'lu (2012)
Biljni lekovi	K, Na, Cu, Mg, Fe, Al, Co, Zn, Ni, Mn, Pb, Cr, Cd	ICP-OES	HCA, PCA	C	Arumugam i sar. (2012)

Kumin	Ca, Mg, K, P, S, Al, Ba, Br, Cl, Fe, Na, Mn, Rb, Sr, Cu, Zn	ICP-AES	ANOVA, DA	C, O	Hondrogiannis i sar. (2012)
Šafran	Mg, Na, Ca, K, Mn, Zn, Cu, Pb, Hg, Ni, Fe, Co, Cd, Sr, Rb, Sc, Br	NAA, ICP-OES, AAS	ANOVA	C	Esmacili i sar. (2013)
Majčina dušica	Cr, Co, Ni, Mo, Cu, Zn, Mn, Fe, Mg, Ca, K, Na	FAAS, GFAAS, ICP-OES	CA, PCA, VOCs	C	Arsenijević i sar. (2013)
Kurkuma, kari, čili, đumbir	As, Cd, Pb, Hg	ICP-MS	ANOVA, HSD	C	Nordin i Selamat (2013)
Komorač, crni biber, majoran, paprika, cimet, bosiljak, origano	Cu, Ni, Fe, Zn, Mn	AAS	CA	C	Bielicka-Gieldon and Rylko (2013)
Vanilija	Mg, P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Ba	LA-ICP-TOF-MS	ANOVA, DFA	O, C	Hondrogiannis i sar. (2013)
Nana, ruzmarin, majčina dušica, bosiljak, cimet, crni biber, beli biber, paprika, origano	P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb	XRF	LDA	C	De La Calle i sar. (2013)
Kurkuma	C, Na, K, Fe, Pb, Cr	LIBS	PCA	C	Tiwari i sar. (2013)
Ruzmarin, žalfija, lovor, origano	Hg, Cd, Pb	AAS	PCA	C	Storelli (2014)
Ruzmarin, anis, beli luk, muškadni oraščić, Senegal biber, Ashanti biber, đumbir, crvena paprika, zelena paprika	Fe, Zn, Cu, Cd, Pb, Hg	AAS	ANOVA	C	Darko i sar. (2014)
Đumbir	As, Cd, Pb, Zn, Fe, Co, Cr, Ca, Mg, Be, Na, K, Mn, Ni, Cu, Se, Ba, Hg	ICP-MS	CA, PCA	C	Pandotra i sar. (2015)
Cimet, zeleni kardamon, kurkuma, korijander, kumin	Na, K, Ca, P, Mg	ICP-OES	ANOVA, HSD	O	Khan i sar. (2014a)
Paprika	Al, B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP-AES	ANNs, LDA	O	Palacios-Morillo i sar. (2014)
Cimet, zeleni kardamon, kurkuma, korijander, kumin	23 elementa u tragovima	ICP-MS	ANOVA, HSD	O, C	Khan i sar. (2014b)
Šafran	Li, B, Na, Ga, Rb, Sr, Zr, Nb, Cs, Ba, Sm	ICP-MS	LDA	O, C	D'Archivio i sar. (2014)
Čili paprika	Pb, Cd, Hg, As, Cu, Zn, Cr	ICP-MS	PCA	C	D'Archivio i sar. (2014)

C – analiza kontaminanata, O – autentifikacija

Ovde se može konstatovati da su tehnike ICP-MS, ICP-OES i ICP AES, glavne analitičke tehnike koje su se koristile u elementnim analizama (Tabela 10.). Kao što su autori Reinholds i sar. (2015) naglasili, svaki začini ima svoj sopstveni elementarni "otisak prsta", u zavisnosti od određenog geografskog područja, industrijskog procesa i klimatskih uslova na lokaciji na kojoj je uzgajan, a kao što se takođe vidi iz Tabele 10., mnogi istraživači koristili su različite hemometrijske alate za analizu sadržaja hemijskih elemenata, a posebno teških metala. Neki od autora primenili su statistiku z-skora, na dobijene ICP-OES podatke; digestija je ovde rađena mešavinom tri kiseline (HCl–HNO<sub>3</sub>–HClO<sub>4</sub>). Mogućnosti ICP-OES tehnike za određivanje elementalnog sadržaja u kombinaciji sa PCA, LDA i CA korišćena je i u drugim radovima. Treba napomenuti da je tokom poslednjih godina, jedan od istraživača, za pripremu uzorka u procesu digestije, koristio rastvarače koji sadrže hlor, ali se oni danas sve više zamenjuju nekim drugim, efikasnijim i manje opasnim, kao što je azotna kiselina, sumporna kiselina sa vodonik peroksidom, a odnedavno i mikrotalasna digestija dodavanjem azotne kiseline i vodonik peroksida. Kako navode Reinholds i sar. (2015), pojedini istraživači su koristili ICP-OES i dve vrste atomske apsorpcione spektrometrije (plamena atomska apsorpciona spektrometrija, FAAS i grafitna atomska apsorpciona spektrometrija – GAAS), a u cilju procene biološke uloge metalnih elemenata u biosintezi isparljivih organskih jedinjenja u mađarskom timijanu. Podaci dobijeni hemijskom analizom, podvrgnuti su Pearson-ovoj

korelacionoj analizi, FA, PCA i CA. Ovi istraživači dopunili su neka prethodna istraživanja, koja su koristila atomsku plamenu apsorpciju, FAAS i emisionu spektrometriju, FAES, kao i ICP-AES u kombinaciji sa PCA, kako bi se istakao odnos između elemenata u različitim biljkama (na primer ruzmarin, bosiljak, origano); ovo je dalje ukazivalo na visoku pokretljivost elemenata zbog potencijalne antropogene kontaminacije. Po Reinholds i sar. (2015), jedan autorski tim iz Italije koristio je analizu korelacije da napravi korelacionu matricu, nakon čega je sledio pokušaj klasifikacije začina, biljaka i uzoraka biljnih čajeva (u zavisnosti od njihovog elementalnog sastava). Sa druge strane, da bi se utvrdilo geografsko poreklo paprika, jedan drugi autor je sa svojim timom, za analizu geografskog "otiska prsta", koristio odnos izotopa stroncijuma i to merenjem sa induktivno spregnutom plazmom visoke rezolucije, sektor masena spektrometrija polja, HR-ICP-SFMS u kombinaciji sa PCA. Unakrsna validacija grupisanih slučajeva je tačno klasifikovana do iznosa od 74,5%. Kako dalje opisuju Reinholds i sar. (2015), poseban tim autora, koristio je PCA, LDA i CA za klasifikaciju različitih začina i bilja u zavisnosti od "otisaka prstiju" njihovih elemenata u tragovima; oni su određivani digestijom kiselinama, pomoću ICP-MS i ICP-AES; korelaciona matrica je napravljena procenom linearnih odnosa između ukupnog sadržaja elemenata u začinima; PCA i CA su primenjene kao opisne tehnike kako bi se objasnila varijansa međukorelacionih promenljivih, da proceni sličnost između grupisanih objekata u PCs, ili klasterima u smislu njihove sličnosti, tj. bliskosti; kao i obično LDA je iskorišćena da pokaže ispravnu klasifikaciju grupisanih objekata. U jednom od prezentovanih radova, ispitivan je i mineraloški sastav i geografsko poreklo italijanskog šafrana; izvršena je analiza pomoću ICP-MS i LDA, kako bi se različite vrste šafrana ispravno klasifikovale. Vrste slatke i ljute/slatke paprike diferencirane su u jednom drugom radu, pomoću linearnih modela, a ljuta paprika je diferencirana sa efikasnoću klasifikacije od 99,2%. AAS je korišćena u istraživanju mikroelemenata i kontaminacije teškim metalima u kariju i korijanderu od strane jedne druge grupe autora, a statistička značajnost analizirana je pomoću ANOVA-metode. Sličan pristup izveden je i u radu sa nekoliko začina i lekovitog bilja, gde je korelaciona matrica ukupnog sadržaja elemenata pokazala prilično nisku korelaciju između analiziranih mikronutrijenata (Cu, Ni, Fe, Zn, Mn), osim bakra i gvožđa, za koje je indikovana pozitivna korelacija (0,75); analiza CA je ukazala na zavisnost sadržaja mikronutrijenata od geografskog regiona i proizvođača za nekoliko vrsta začina i bilja. Ovde se mora naglasiti da su začini i bilje koji se koriste u farmaciji opasni ako se kontaminiraju teškim metalima. U kontekstu procene bezbednosti, dva autora su koristila ICP-AES i ANOVA analize kako bi odredili sporedne i glavne prikupljene mineralne komponente u 31 vrsti lekovitih i aromatičnih biljaka iz južnog regiona Turske; ovde su istraživanja pokazala sadržaj teških metala ispod nivoa detekcije. Reinholds i sar. (2015) takođe navode da je šafran sa Tibeta analiziran pomoću ICP-AES i utvrđen je sadržaja metala u visokim koncentracijama, dok je ICP-MS pokazala niske nivoe kontaminacije teškim metalima u Henan-u; za sve elemente, korelativni koeficijenti kalibracione krive nisu bile manje od 0,9938, kako je izračunato po regresionoj analizi. ICP-MS je takođe korišćena u jednom drugom radu, u kombinaciji sa korelacionom analizom, a zatim i PCA i CA (kako bi se procenili analitički rezultati sadržaja teških metala Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, i Pb) u lekovitom bilju i začinima (na primer bosiljak, ruzmarin, kopar, cimet i đumbir) u Turskoj. Za sadržaj teških metala u lekovitom bilju korišćena je i kombinacija ICP-OES i PCA, kao i HCA; HCA je primenjena sa Ward-ovom metodom i Euclidean-udaljenošću za izračunavanje međutačkaste udaljenosti uzoraka koje su pokazale da su uzorci odvojeni u dve grupe: prva grupa je bila formirana od elemenata u tragovima, a druga – od hranljivih minerala Al i Fe; analiza je pokazala da je toksični element Cd bio ispod limita detekcije u svim uzorcima, dok su Cr, Pb i Ni bili ispod maksimalno dozvoljene granice definisane od strane Svetske zdravstvene organizacije, SZO. Po Reinholds-u i sar. (2015), istraživanje mešanih i nepomešanih začina (od nekoliko začina/trava) dobijenih sa tržišta Gane, pokazalo je prilično visoku kontaminaciju metalima - Pb i Cd i to iznad dozvoljenih nivoa; za određivanje makro nutrijenata u začinima, korišćene su i ICP-OES i ICP-MS (uz mikrotalasnu digestiju), praćenim HSD analizom i Duncan-ovim testovima U kasnijem, obimnijem radu istih autora, ICP-MS zajedno sa ANOVA i HSD multivarijantnom analizom korišćeni su za određivanje 23 mikroelemenata i teških metala u više začina. Primenu ICP-



MS u kombinaciji sa PCA opisali su i drugi autori za analizu nutritivnog kvaliteta i toksičnost 46 uzoraka prikupljenih iz Indije; ni u jednom ispitivanom uzorku nije otkrivena Hg, dok su svi analizirani elementi u ispitivanim uzorcima, bili ispod dozvoljenih granica koje je propisala SZO.

Da Silva i sar. (2017) određivali su zdravstvene rizike po ljude, kao i strategije za fitoremedijaciju u zemljištima kontaminiranim As, Cd, Pb i Zn usled odlaganja šljake. Urađena je sekvencijalna ekstrakcija iz 5,00 g zemlje:

1. Promenljiva frakcija (20 ml od 1 mol/L  $Mg(NO_3)_2$ ), koja je mešana 2h.
2. Frakcija organske materije (10 ml 5-6 dag/L NaClO, pH=8.5), zagrejana na 100°C, a onda u vodenom kupatilu na temperaturi od 30°C, uz povremeno mešanje. Postupak je ponovljen tri puta uz mešanje ekstrakta.
3. Frakcija amorfnog gvožđe-oksida (30 ml iz rastvora 0,25 mol/L  $NH_2OH \cdot HCl$  + 0,25 mol/L HCl na pH=3,0) mešana je 30 min.
4. Frakcija kristalnog gvožđe-oksida (30 ml iz rastvora 0,2 mol/L  $(NH_4)_2C_2O_4$  + 0,2 mol/L  $H_2C_2O_4$  + 0,01 mol/L askorbinske kiseline zagrejane na 100°C, a onda u vodenom kupatilu na temperaturi od 30°C, uz povremeno mešanje).
5. Preostala frakcija je određivana razlikom između sadržaja ekološki dostupnih metala u uzorku, od sume prethodnih frakcija.

Praktično, ciljevi ovog rada bili su:

1. Utvrđivanje ekoloških (bio)dostupnih metala (metaloida) u koncentracijama i njihova distribucija u frakcijama zemlje, prisutni u visokim koncentracijama u odloženoj šljaci u Santa Amaro (As, Cd, Pb i Zn).
2. Procena rizika nekancerogenih (Pb i Zn) i kancerogenih (Cd i As), za decu koja ponekad progutaju grumen zemljišta, koje je glavni put izloženosti metalima (metaloidima).
3. Procena mogućnosti korišćenja biljaka koje su adaptirane na lokalne uslove sa visokom proizvodnjom biomase (kukuruz i ricinus) za fitoekstrakciju izazvanu helatnim agensima, ili fitostabilizaciju terena.

Eksperiment fitoremedijacije je sproveden u stakleniku, u saksijama koje su punjene sa 6 kg zemlje i đubrene sa (mg/kg): 250 N, 240 P, 150 K, 160 S, 2 Fe, 4 Mn, 1 B i 0,2 Mo gde su zasađeni kukuruz (*Zea Mays*) i ricinus (*Ricinus communis*). Biljke su podeljene na izdanke i korenje, oprane vodom sa česme i destilovanom vodom, zatim osušene na 70°C i mlevene u mlinu sa noževima. Uzorci zemljišta su osušeni u pećnici na 105°C i prosejane kroz sito otvora 0,15 mm. Uzorci biljaka (izdanci i korenje) i zemljišta (0,500 g), rastvoreni su smesom  $HNO_3 + HCl$  u mikrotalasnoj pećnici (Mars Xpress) 4 min 30 s na 175°C. Koncentracije Pb, Cd i Zn određivane su (ICP-OES / Optima 7000 Perkin Elmer), dok su koncentracije As dobijene atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom stvaranjem hidrata (AAS/FIAS–MHS, Perkin Elmer). Dalje procedure bile su: rekaliبرacija krive, analiza blankova i upotreba SRM 2710 (za zemljište) i SRM 1570a (listovi spanaća za biljke) (tehnologija NIST). Merna sigurnost za As, Cd, Pb i Zn kretala se u opsegu od 90% do 100% za uzorak SRM 1570a i od 80% do 96% za uzorak SRM 2710. Sve analize su rađene u triplikatu. Urađena je ANOVA analiza ( $p < 0,05$ ) i poređenje srednjih vrednosti korišćenjem Tukiey-testa ( $p < 0,05$ ). Svi statistički obračuni su urađeni korišćenjem softvera Statistica (verzija 10.0). Procenjeno prosečno vreme za fitoremedijaciju područja, primenom fitoekstakcije, bilo je visoko, u opsegu od 76 do 259 godina, te stoga ova tehnika nije idealna alternativa za dalja proučavanja u oblasti zemljišta. Ovo je jedno od glavnih ograničenja fitoekstrakcije, posebno na zemljištima sa visokom koncentracijom metala(oida). Međutim, dobar razvoj u kontaminiranom zemljištu uz ograničenje translokacije metala(oida) na izdanke, upućuje da se ricinus može koristiti za fitostabilizaciju. Pored toga, uzgoj ricinusa može biti alternativa za ekonomski prinos koji proizilazi iz proizvodnje biogoriva.

Treba naglasiti da su i mnogi istraživači iz Srbije uspešno primenili metodu hemometrijske analize dobijenih rezultata kako bi odredili biljne potencijale za primenu u biomonitoringu, ili fitoremedijaciji.

Tako na primer, u radu Randelović i sar. (2018), povišena akumulacija teških metala je prepoznata kao veoma važan globalni problem zagađenja poslednjih decenija, a biljne vrste su prepoznate kao prirodni bioindikator zagađenja životne sredine (posebno za količine teških metala u zemljištu). Ova studija ispitivala je hemijski sastav i potencijal akumulacije biljke *Calamagrostis epigejos* (iz familije trava - *Poaceae*) sa pet lokaliteta izloženih različitim nivoima antropogenog uticaja. Rezultati su pokazali da ova biljka može da preuzme značajan deo raspoložive frakcije teških metala u zemljištu, kao i da ga skladišti u korenu, pokazujući time određeni potencijal za fitostabilizaciju metala. Naime, značajne vrednosti faktora BCF u odnosu na raspoložive metale u zemljištu bile su zabeležene u korenu ispitivane biljne vrste. Analiza istraživanih antropogeno degradiranih zemljišta pokazala je razlike u njihovim fizičko-hemijskim osobinama (posebno u sadržaju teških metala) kao rezultat različitih izvora zagađenja i istorije korišćenja zemljišta, pa je zaključeno da su industrijalizacija, poljoprivreda i urbanizacija među glavnim faktorima odgovornim za degradaciju zemljišta. Istovremeno, zaključeno je da je *Calamagrostis epigejos* jedna od retkih vrsta koja može uspešno da napreduje u ovako teškim antropogenim uslovima devastiranih lokaliteta i predložena je za upotrebu kao vegetacijskog pokrivača, a posebno za područja rudarskog otpada; ona bi mogla da izgradi gust prekrivač koji bi značajno doprinosa prevenciji erozije i usporio procese ispiranja metala u životnoj sredini. Takođe, ne treba zanemariti ulogu *C. epigejos* kao pionirske vrste i nakon ekoloških akcidenata, jer ova vrsta smanjuje bioraspoloživost zagađivača, čime se sprečava njihovo širenje kroz zemljište, vazduh i vodu, ali i kroz lance ishrane u kritičnim fazama ispiranja i zagađenja. Jasno je da spontani rast *C. epigejos* u zapuštenom periurbanim i poljoprivrednim površinama, kao i pored puteva, doprinosi prirodnoj sanaciji ovih lokaliteta. Ovi nalazi su veoma važni jer se lokacije koje zahtevaju sanaciju često karakterišu kiselošću i pratećom povećanom pokretljivošću određenih teških metala, faktora koji povećavaju rizik od zagađenja životne sredine, a hemometrijski pristup sa statističkim metodama kao što su: One-way ANOVA, Welch's ANOVA, Tukey's HSD post hoc test, Spearman rank-order korelacija i regresiona analiza, doprineo je značajno formiranju ispravnih zaključaka.

Ličina i sar. (2017) su putem određivanja akumulacije teških metala u više biljnih vrsta (*Zea mays*, *Medicago sativa*, *Melilotus officinalis*, *Triticum aestivum*, *Hordeum sativum*, *Trifolium repens*, *Poa sp.*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* i *Daucus carota*) sa područja basena lignita Kostolac, pokušali da utvrde nivo zagađenja ove oblasti, kao i mogućnost njene rehabilitacije pomoću ispitivanih biljaka. Koncentracija metala u odabranim biljkama određivana je pomoću plamene AAS i prethodnog rastvaranja 70%-nom azotnom kiselinom i vodonik-peroksidom u sistemu otvorenih sudova, dok su upotrebljene statističke metode bile: One-Way ANOVA i PCA. Primenjene metode ukazale su na povećano zagađenje pojedinim metalima, kao i da je koren bio glavni organ akumulacije (takođe i krtola krompira kao podzemno stablo). Međutim, translokacija metala u nadzemne biljne delove nije bila na nekom značajnijem nivou, što ukazuje na mogućnost upotrebe ispitivanih biljaka u fitostabilizaciji.

Konačno i mnogi istraživači iz Bora su takođe ukazali na značaj upotrebe hemometrije u svrhe fitoremedijacije, a podjednako i u svrhe biomonitoringa. Tako na primer, u pomenutim studijama o mogućnostima primene voćnih vrsta za navedene namene - vinova loza, varijetet Tamjanika (Alagić i sar. 2015a, 2018b), vinogradarska breskva (Dimitrijević i sar. 2016), divlja kupina (Nujkić i sar. 2016) i jabuka (Tošić i sar. 2016), došlo se do zaključka da kombinacija mikrotalasno asistirane ICP-OES sa različitim statističkim metodama kao što su: Pearson-ova korelaciona studija, HCA, PCA i One-Way ANOVA (sa najčešće primenjivanim Kolmogorov-Smirnov testom za utvrđivanje distribucije varijabli), predstavlja izuzetno koristan alat za utvrđivanje autentičnih biljnih remedijacionih- i monitoring-potencijala. Ove studije su korišćenim metodama dokazale moguću primenu svake od ispitivanih vrsta u fitostabilizaciji, kao jednoj od metoda fitoremedijacije, ali i u više različitih metoda biomonitoringa, što je kasnije bilo dodatno potvrđeno i u specifičnim studijama ovih autora, na način jednog uporednog pregleda među biljnim vrstama (Alagić i sar. 2019; Alagić 2022). Takođe je bilo pokazano da je udeo različitih izvora zagađenja u ukupnom zagađenju ispitivanim metalima (Cu, Zn, Pb, As, Cd i Ni) u regionu Bora bio na različitom nivou. Ipak, kao glavni izvor zagađenja izdvojio se, pre svega rudarsko-metalurški

kompleks, zatim površinski kopovi, ali i kisele rudničke vode (eng. *Acid Mine Drainage, AMDs*), kao i saobraćaj (pre svega u slučaju Pb).

Krajnji rezultati istraživača iz Bora koji su proučavali lipu, zovu i bor (Kalinović i sar. 2016), hrast, smreku i lesku (Radojević i sar. 2017) i različite divlje vrste iz familije ruža (šipurak, glog i trnjina) (Kalinović i sar. 2019), bili su velikim delom slični, ali i sa izvesnim razlikama koje verovatno potiču od različitih sposobnosti biljaka da usvajaju i akumuliraju metale, mada je moguće da su i različiti vremenski uslovi u različitim periodima uzorkovanja imali značajan uticaj. Osim toga, ova grupa istraživača ispitivala je nešto veći broj metala i koristila drugačiji način hemometrijskog pristupa. Naime, oni su određivali koncentracije teških metala koristeći mikrotalasno asistiranu ICP-AES metodu, dok je obrada dobijenih rezultata bila izvršena statističkim metodama kao što su: 1) Shapiro–Wilk test za utvrđivanje distribucije varijabli i 2) pošto se pokazalo da nije bilo normalne raspodele, primenjene su neparametrijske statističke metode kao što su: upareni Wilcoxon Signed-Rank test (radi poređenja koncentracija u opranom i neoprano lišću ispitivanih biljaka) i izračunavanje Spearman-ovog koeficijenta (kako bi se odredile korelacije između ispitivanih parametara); u pojedinim slučajevima, rađena je i HCA.

Pomenuti radovi istraživača iz Bora su u najvećem broju slučajeva ispitivali i uticaj zemljišnih parametara (pH, EC, OM idr.) na biljno usvajanje metala iz podloge i rezultati nisu ukazivali na neko jedinstveno pravilo vezano za usvajanje određenog metala, već najviše za određenu biljnu vrstu; ovo dalje ukazuje da svaka biljna vrsta, u određenim okolnostima, razvija svoj specifični mehanizam za usvajanje i akumuliranje metala, te na taj način, igra i glavnu ulogu u ovim procesima. Na ove činjenice ukazivali su i izračunati faktori akumulacije metala u ispitivanim biljnim delovima.

### 3. Osnovne polazne hipoteze i cilj rada

Predmet i cilj ove doktorske disertacije, u najširem smislu, jeste hemometrijski pristup u ispitivanju autentičnih potencijala pionirskih biljnih vrsta iz ekstremno zagađenog regiona Bora (istočna Srbija), za usvajanje i akumulaciju teških metala, a radi potencijalne primene odabranih biljaka u svrhe fitoremedijacije i biomonitoringa, kao dve ekološki prijateljske metode u kontroli i zaštiti životne sredine od pomenutih, izrazito opasnih zagađujućih materija.

Naime, u Uvodu ovog rada, ukazano je da su problemi uzrokovani teškim metalima antropogenog porekla, a naročito poreklom od rudarskih i metalurških aktivnosti, prisutni u celom svetu. Mnoge lokalne oblasti (poput borskog regiona), izložene su dugogodišnjem zagađenju ne samo okolnog biotopa, već i prisutnih biocenoza i što je najvažnije – ljudske populacije. Zbog toga i menadžment zagađenih matriksa životne sredine predstavlja temu od globalnog interesa, a posebno u odnosu na zemljište kao prirodni rezervoar brojnih zagađujućih materija. I kao što je već istaknuto, među masom različitih remedijacionih tehnologija (fizičke, hemijske, termalne, biološke, ili njihove kombinacije), sve više je počela da se ističe jedna nova i ekološki krajnje prihvatljiva metoda – fitoremedijacija i to zbog njene relativne jednostavne primene i ekonomske isplativosti, kako u odnosu na zagađeno zemljište, kao jedan važan, ali i slabo obnovljivi, takoreći - neobnovljivi prirodni resurs, tako i u odnosu na zagađenu vodu i vazduh. Naime, u brojnim novijim studijama bilo je dokazano da kod zemljišta, fitoremedijacija, iako prilično dugotrajan proces (zasnovan na posebnim biljnim kapacitetima za toleranciju metala), može potpuno da eliminiše, ili bar da imobilise teške metale na prostranim zagađenim površinama i to na jedan vrlo efektivan i bezbedan način, popravljajući u isto vreme mnoge hemijske, fizičke i biološke osobine tretirane površine.

Kako biljke mogu usvajati metale ne samo putem korena, već i preko listova (iz nataloženih čestica prašine), to se ova pojava može koristiti ne samo za izvesno uklanjanje teških metala iz atmosfere, već još češće, u različitim procedurama fitomonitoringa, kao još jedne ekološke, jednostavne i ekonomski isplative metode u kontroli i zaštiti životne okoline, a pre svega, za monitoring stanja i nivoa kontaminacije u odgovarajućim matriksima životne sredine; osim toga, lišće i drugi nadzemni biljni delovi mogu da zadrže deo neusvojenih atmosferskih čestica na svojim površinama, tako da se ponekad, u svrhe praćenja atmosferskog zagađenja, mogu upotrebiti i neoprani nadzemni delovi.

S obzirom na iznete činjenice, cilj ovog rada u užem smislu definisan je kao ispitivanje autentičnih potencijala raspoloživih pionirskih biljnih vrsta iz regiona Bora prema usvajanju i akumulaciji teških metala (bakra, cinka, olova, kadmijuma i arsena) u njihovim nadzemnim delovima tj, izdancima, ali i u okolnom zemljištu, kako bi se na taj način odredila i njihova primenjivost u fitoekstrakciji kao jednoj od najpoželjnijih metoda fitoremedijacije, ali i u biomonitoringu zemljišta i vazduha. Detektovane koncentracije izabranih teških metala upoređene su među ispitivanim biljnim vrstama kako bi se izdvojila upravo ona koja je uspešnija u akumulaciji, ali su izvedena i poređenja sa odgovarajućim literaturnim podacima, kao i preporukama i zakonskim ograničenjima, tj. graničnim vrednostima, GV (eng. *Limit Values, LV*), da bi se što jasnije stekao uvid u nivo i rizike od prisutnog zagađenja. Takođe, ispitan je i uticaj zemljišnih parametara kao što su pH, EC i OM, ali i sadržaj odgovarajućih zemljišnih metal(oid)a, kao i ukupnog zemljišnog azota, N i fosfora, P, na usvajanje ispitivanih teških metala. Dodatno, istraživano je i poreklo teških metala u ispitivanim matriksima, tj. u zemljištu/sedimentu i izdancima odabranih biljaka. Detekcija metal(oid)a i obrada dobijenih rezultata izvršena je najsavremenijim hemometrijskim pristupom, tj. najsavremenijim hemijskim metodama (pre svega primenom mikrotalasno asistirane ICP-MS), u kombinaciji sa različitim metodama statističke obrade rezultata, kao što su: Pearson-ova korelaciona analiza, One-way ANOVA i HCA; takođe je primenjeno izračunavanje odgovarajućih bioakumulacionih faktora (MR), radi utvrđivanja rata

akumulacije za svaki metal(oid), u svim biljnim vrstama, sa svake lokacije. U ovom radu, ukazano je i na značaj samog hemometrijskog pristupa u utvrđivanju fitoremedijacijskih i biomonitoring potencijala različitih vrsta biljaka.

Praktično, u ovoj doktorskoj disertaciji, krenulo se od nekoliko osnovnih hipoteza i to:

- da neposredna okolina rudarsko-metalurškog kompleksa u Boru predstavlja izrazito adekvatnu lokaciju za istraživanje, a posebno one tačke koje se nalaze u blizini teško zagađenih voda, jer sve one predstavljaju mesta koja su godinama bila izložena zagađenjima poreklom od rudarsko-metalurških aktivnosti i to ne samo od onih koja dolaze iz vazduha zasićenog česticama prašine sa značajnim sadržajem teških metala, već i od povremenog izlivanja prirodnih manjih, ili većih vodotokova opterećenih raznim metal(oid)ima, kao i izuzetno kiselim rudničkim vodama; dobro je poznata činjenica da je, usled dugogodišnjeg teškog zagađenja toksičnim metalima, okolina mnogih reka i rečica u borskom regionu potpuno izmenjena u odnosu na prvobitno stanje, totalno narušena i opustošena, tj. pretvorena u ogoljeni predeo, bez vegetacije;
- pretpostavljeno je takođe da, bez obzira na ovako teško stanje, postoje i neke biljke, a pre svega iz kategorije pionirskih vrsta (vrste koje prve naseljavaju područja opustošena i ogoljena usled različitih razloga), koje bi se mogle naći na izabranim mestima Bora i njegove neposredne okoline, tj. u blizini pojedinih lokalnih reka, rečica, ali i jezera Robule na napuštenom flotacijskom jalovištu (kao veštačkog rezervoara kiselih rudničkih voda), koje bi mogle poslužiti kao odlični kandidati za ispitivanje autentičnih biljnih fitoremedijacionih i biomonitoring potencijala. Naime, ukoliko bi se na više ovih kritičnih mesta pronašli primerci pojedinih biljnih pionirskih vrsta, koje kao izuzetno otporne i žilave vrste mogu da preživljavaju na teško oštećenim terenima (pre svega u uslovima fitotoksičnih koncentracija), onda bi bilo moguće i da se sprovede jedno interdisciplinarno istraživanje koje bi ukazalo da li odabrane biljne vrste poseduju i dobre sposobnosti za efektivno usvajanje i akumulaciju teških metala (ali bez ispoljavanja štetnih efekata) i da kao takve budu lako primenjive ne samo za revegetaciju i sprečavanje erozije problematičnih terena, već i za fitoremedijaciju i biomonitoring zagađenih područja;
- sledeća, ali i glavna pretpostavka, tj. očekivanje je da je moguće i uočavanje, identifikacija i analiza neke do sada neispitane biljne vrste sa izraženim akumulatorskim kapacitetima, a što bi bilo od velikog doprinosa za fitoremedijaciju i biomonitoring, kao dve relativno nove i veoma obećavajuće metode iz oblasti tehnoloških nauka;
- konačno, očekuje se da će odabir metoda istraživanja, a pre svega najsavremenijeg hemometrijskog pristupa, omogućiti dobijanje preciznih i pouzdanih podataka koji će dalje obezbediti i donošenje nedvosmislenih i pouzdanih zaključaka.

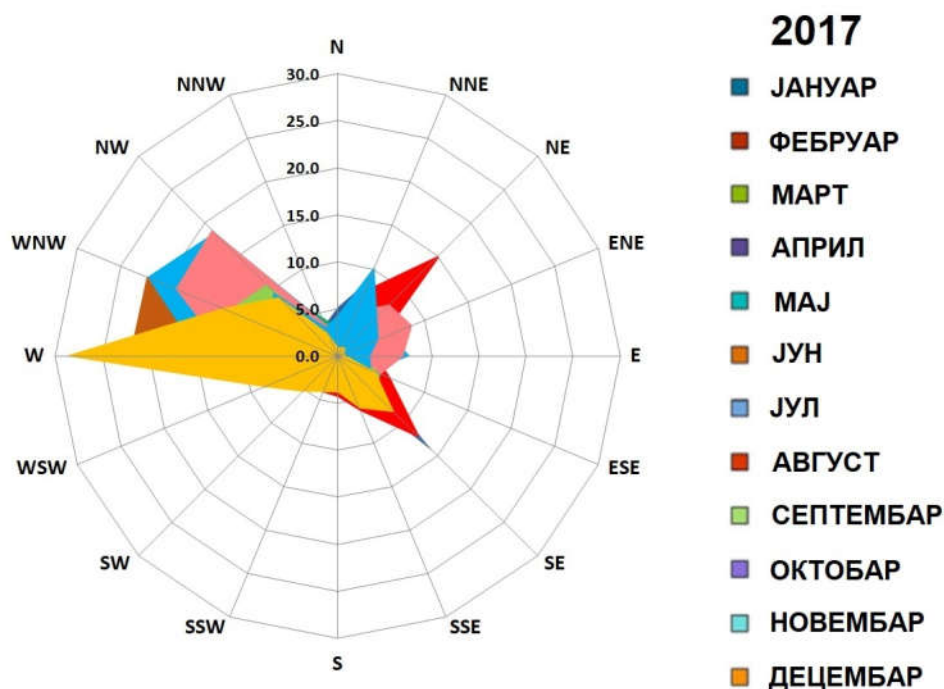
Rezultati ovog istraživanja, koji su izloženi u delovima disertacije koji slede, dali su odgovor na početne hipoteze, kao i zadate ciljeve. Tačnije rečeno, dve zeljaste višegodišnje biljne vrste, mlečika (*Euphorbia helioscopia* L.) i obična kopriiva (*Urtica dioica* L.), koje su bile pronađene na svim lokacijama od interesa (osim jedne vrste na jednoj od lokacija), bile su i izabrane kao test-biljke za procenu autentičnih, praktičnih biljnih potencijala za biomonitoring i fitoekstrakciju. Dodatno, posle pregleda dostupne naučne literature, pokazalo se da jedna od odabranih biljnih vrsta, odnosno mlečika, nije bila ranije ispitivana u ovom pogledu. Još preciznije - na nekoliko tačaka, tj. lokacija u neposrednoj blizini rudarsko-metalurškog kompleksa u Boru, pronađeni su primerci biljaka obe vrste kako spontano rastu u blizini više zagađenih vodenih tokova i površina i podvrgnuti su planiranim analizama. Obe vrste zatečene su kao neke od izuzetno retkih vrsta koje opstaju u postojećem agresivnom okruženju, jer je činjenica da su grad Bor i njegova okolina tokom 20-og veka bili stalno izloženi snažnom negativnom uticaju teških metala, koji su se oslobađali tokom glavnih privrednih delatnosti u kompletnom regionu, a to su vađenje i prerada rude bakra.

## 4. Eksperimentalni deo

### 4.1. Opis mesta istraživanja

Grad Bor u Timočkoj krajini, istočna Srbija (geografske koordinate: 44°25' severne geografske širine i 22°06' istočne geografske dužine) je jedini centar rudarsko-metalurških aktivnosti za proizvodnju bakra u Republici Srbiji. Bor je i administrativni centar istoimene opštine udaljene od glavnog grada, Beograda, nešto više od 200 km. Opština Bor, koja se prostire na oko 856 km<sup>2</sup>, sa planinama bogatim šumama: Crni Vrh, Stol i Veliki Krš (vrhovi od iznad 1000 m), ima 13 naselja koji osim samog grada Bora uključuju i 12 manjih mesta (turističkih naselja, kao i tipičnih sela). Gustina opšte populacije je 67,2 stanovnika po kilometru kvadratnom. U seoskoj, tj. ruralnoj (R) oblasti prisutne su i neke poljoprivredne aktivnosti, manjeg intenziteta, poput uzgoja stoke (zbog brojnih šumskih pašnjaka), gajenja voća, povrća, ali i različitih useva. Blizina Lazarevog kanjona kao nacionalnog spomenika prirode, sa Zlotskom rekam i Lazarevom pećinom u njegovom sastavu, zatim Borskog jezera i Brestovačke banje, omogućavaju razvoj i izvesnih turističkih aktivnosti, pre svega zdravstvenog, ali i rekreativnog i kulturno-obrazovnog tipa.

Zbog blizine šuma, vlažnost vazduha u regionu Bora, najčešće je veća od 70%, dok prosečne padavine u toku godine obično budu na nivou od 688 mm/m<sup>2</sup>; prosečna godišnja temperatura obično iznosi 10,2°C, a tip klime je umereno kontinentalna (Alagić 2022). U toku 2017. godine, kada je sakupljanje zemljišnog i biljnog materijala bilo obavljeno, osnovni meteorološki parametri bili su: padavine – 382,5 mm/m<sup>2</sup>; temperatura – 11,82°C; relativna vlažnost – 70,27% i atmosferski pritisak – 970,6 mbar. Još preciznije, pošto je uzorkovanje bilo obavljeno u toku maja meseca, ovi parametri su bili: padavine – 73,5 mm/m<sup>2</sup>; temperatura – 16,1°C; relativna vlažnost – 78,5% i atmosferski pritisak – 964,6 bar. Najfrekventniji vetrovi u opštini Bor su: severozapadni (NW), zapadno-severo-zapadni (WNW) i zapadni (W) (Alagić 2022), a u maju 2017. godine, najfrekventniji vetar je bio zapadno-severo-zapadni (WNW) (Slika 21.).



Slika 21. Ruža vetrova za 2017. godinu (autor, dr Viša Tasić)  
N – severni, S – južni, W – zapadni i E - istočni

Ovi vetrovi raznose otpadne industrijske gasove i mineralnu prašinu sa površinskih kopova, ali i sa mesta odlaganja čvrstog otpada u odgovarajućim pravcima. Ipak oduvek se uočavalo da je, najznačajniji izvor antropogenog zagađenja u celom regionu u stvari topionica, tj. proces topljenja rude Cu u topioničarskom kompleksu, smeštenom na severoistočnoj periferiji grada Bora.

Iako je poznato da rudarenje u ovom kraju potiče još iz antičkih vremena, ipak su prve moderne, ekstenzivne rudarske aktivnosti započele tek početkom 20-og veka, tačnije, 1903. godine, kada je otvoren jedini podzemni rudnik bakra u samom gradu, pod nazivom „Jama” (praktično, na severoistočnom obodu savremenog grada Bora) (Alagić i sar. 2019; Šerbula i sar. 2016). Razvoj tri površinska kopa (od kojih je jedan iscrpljen) otpočeo je kasnije i to 1912. godine (u istom, severoistočnom delu grada Bora), 1979. (u seoskom naselju Veliki Krivelj) i 1990. (u seoskom naselju Cerovo) (Dimitrijević i sar. 2009; Đorđievski i sar. 2018).

Rudarske aktivnosti su značajno uticale na kompletan okolni pejzaž formirajući pre svega karakteristične ogromne površinske kopove, ukupne površine od oko 1800 ha. Takođe, značajan uticaj na lokalni reljef, izvršen je kroz intenzivne metalurške aktivnosti koje su bile započete radi prerade rude Cu i zasnovane na tipičnoj pirometalurškoj tehnologiji. Naime, tokom 1930-ih, izgrađen je veliki topioničarski kompleks, neposredno pored podzemnog kopa „Jama” i (trenutno napuštenog) površinskog kopa u Boru, zauzimajući na taj način značajan deo prvobitnog naselja; današnji, modernizovani kompleks, zajedno sa okolnim stambenim delom, predstavlja jedan vrlo specifičan urbano/industrijski (UI) ambijent. Dalje, prirodni oblik više rečnih dolina u borskom regionu je takođe narušen i to kao posledica velikih količina deponovanog mulja nastalog tokom procesa flotacije koji je bio uveden radi izdvajanja takozvanog koncentrata Cu iz rude sa njegovim smanjenim sadržajem. Naime, tokom vremena, sadržaj Cu u sulfidnim rudama (halkopirit, halkozin i kovelin), opao je sa 10-17% (Alagić i sar. 2019; UNEP 2002) do svega 0,5-1% (zavisno od mesta eksploatacije) (Dimitrijević i sar. 2009). Vrlo često, dolazi do izlivanja zagađenih lokalnih vodotokova, prilikom čega dolazi do direktnog zagađenja okolnog zemljišta/sedimenta. Takođe, nekoliko jalovišta koja sadrže zagađene vode iz rudarsko-metalurških procesa, pokrivaju jednu značajnu površinu zemljišta u neposrednoj blizini samog grada Bora (UNEP 2002).

Što je najvažnije, pored fizički izmenjene sredine, grad Bor i njegova okolina prošli su kroz mnoge kvalitativne promene, tako da je kvalitet vazduha, vode i zemljišta kompletnog regiona uvek bio na veoma niskom nivou (Alagić i sar. 2019; Antonijević i sar. 2012; ASŽS Bor 2006). Zbog toga su tokom vremena i neka oboljenja poput opšteg opadanja imuniteta, respiratornih infekcija, astme, ali i kancera bila u stalnom porastu, pri čemu su deca kao jedna od najosetljivijih populacija, uvek bila pod posebnim rizikom (Alagić i sar. 2013; LEAP 2003; Šerbula i sar. 2012). Konačno, radi maksimalno mogućeg rešavanja dugogodišnjih, nagomilanih, ekoloških problema u borskom regionu, kompanija "RTB Bor" je od 2009. godine, preduzela prve postupke zamene zastarele tehnologije najnovijim procesom autogenog brzog topljenja (eng. *flash smelting technology*), tako da je 2016. godine stara, pirometalurška metodologija najzad bila zamenjena novom, "flash" tehnologijom topljenja, koja daje minimalne negativne efekte u životnoj sredini. U poslednje tri godine se radilo na dodatnoj modernizaciji ove tehnologije, tako da, među lokalnim stanovništvom, za ovu tehnologiju postoji očekivanje da će osigurati mnogo bolji kvalitet života u budućnosti i biti najadekvatnije rešenje za konkretne ekološke probleme (Alagić i sar. 2018b, 2019; EIA Study 2010).

Kao jedan od glavnih ekoloških problema u regionu Bora, zagađenje vazduha je uvek bilo postavljano na prvo mesto, a zastarela tehnologija topljenja je bila prepoznata kao ključni izvor direktnog zagađenja sumpor-dioksidom i raznim teškim metalima kao što su Cu, Zn, Ni, Pb i Cd, uključujući tu i toksični metaloid, As. Drugi važan izvor teških metal(oid)a je prašina koja se stalno podiže sa otvorenih kopova, kao i sa njihovih rubnih naslaga otpada (Alagić i sar. 2018b, 2019).

Praćenje kontaminacije vazduha u Boru i okolini, koje se godinama posmatra i kontroliše, zvanično je povereno Opštini Bor i Institutu za rudarstvo i metalurgiju u Boru. Na sajtu opštine, redovno se iznose podaci o zagađenju (koje pre svega potiče iz topionice koja se nalazi u okviru metalurško-topioničarskog kompleksa u Boru), pa se tako preko linka: <https://bor.rs/wp->

<content/uploads/2015/11/Izvestaj-o-kvalitetu-vazduha-u-Boru-za-maj2017.pdf>, može doći do podataka o kvalitetu vazduha u maju mesecu 2017. godine, kada je bilo izvršeno i uzorkovanje materijala koji je bio predmet rada ove doktorske disertacije. Izveštaj koji se nalazi na datom linku sadrži podatke za koncentracije sumpor-dioksida i čađi, suspendovanih čestica i taložnih materija (sa teškim metalima u njima: Pb, Cd, Ni i As). Merenja su vršena automatskim stanicama na mestima kao što su: Jugopetrol, Tehnički fakultet, Slatina, Bolnica, Gradski park, Šumska sekcija, Institut, a koja se nažalost, ne poklapaju sa mestima koja su bila izabrana za istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji. Sadržaj navedenih teških metala u taložnim materijama u maju 2017. godine, kretao se od:

- 9,7 µg kod Instituta, do 51,4 µg kod Gradske bolnice, za Pb,
- od 0,2 µg kod Instituta i u Ostrelju, do 1 µg kod Gradske bolnice za Cd,
- od 3,5 µg kod Instituta do 6,0 µg kod Gradske bolnice za Ni i
- od 4,4 µg u Ostrelju, do 37,7 µg kod Gradske bolnice, za As.

Treba pomenuti da se ponekad, za merenja navedenih parametara, koriste i izvesni pokretni sistemi za praćenje zagađenja.

Osim do sada pomenutog, kao još jedan značajan izvor zagađenja, javljaju se rudarski kopovi sa svojim otpadnim materijalima, koji dalje proizvode i karakteristične kisele procedne (rudničke) vode, naširoko poznate kao kisela drenaža rudnika, AMD. Ove vode su obično krajnji rezultat procesa hidrolize i oksidacije metalnih sulfida u rudnicima, ili u njihovim pripadajućim otpadima (jalovine i flotaciona jalovina) (Đorđievski i sar. 2018; UNEP 2002). Napušteni rudnici i jalovišta mogu da generišu kisele vode stotinama, pa i hiljadama godina i one su prvenstveno odgovorne za kontaminaciju okolnog zemljišta i voda (Stanković 2016).

Opšte je prihvaćeno da je tokom godina glavna kontaminacija lokalnih voda u Boru nastala uglavnom od veoma kiselih otpadnih voda proizvedenih tokom procesa flotacije, kao i podzemne eksploatacije rudnika. Kontaminacija je poticala i od otpadnih voda bogatih metalima, uključujući tu i otpadne vode iz metalurško-hemijskih procesa (koje plus sadrže i izuzetno agresivnu sumpornu kiselinu), jer su se one, veoma često, bez ikakvog tretmana ispuštale u male lokalne potoke, reke i rečice, kao što su na primer, Borska reka, Saraka i Kriveljska reka, koje su dalje nosile zagađenje u regionalnu, veću reku Timok (UNEP 2002). Procenjeno je da se, u životnu sredinu borskog basena, svakodnevno ispušta i do nekoliko hiljada kubnih metara AMD koje potiču sa pomenutih jalovišta, akumulacija i metalurških procesa (Stanković 2016).

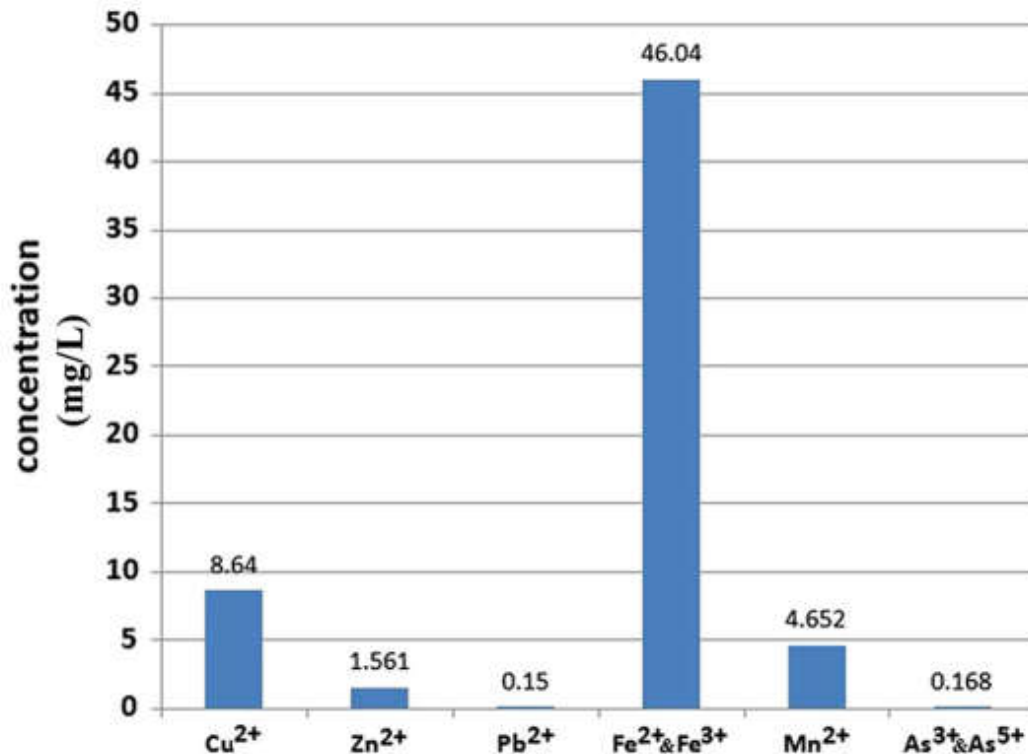
Osim toga, dugoročni monitoring kvaliteta vode u Borskom regionu dao je dokaze o veoma visokim koncentracijama pomenutih teških metala u Borskoj i Kriveljskoj reci, kao i o njihovoj izrazito kiseljoj sredini, tj. kiselim pH vrednostima njihovih voda.

Tako na primer, Šerbula i sar. (2016) navode da je Borska reka jedna od najzagađenijih u Evropi. Ova reka je dugačka 47 km sa basenom koji pokriva 364 km<sup>2</sup> i najveća je pritoka Timoka (202 km dužine i 4547 km<sup>2</sup> površine basena), koji se u konačnom uliva u Dunav, tj. najveću evropsku reku. Isti autori navode da su merenja jedne grupe istraživača iz 2007. godine, pokazala da su parametri zagađenih voda (sa nekih mesta koja su bila odabrana za istraživanje i u ovoj doktorskoj disertaciji), pokazala sledeće vrednosti pH i sadržaja metala poput Cu i Zn:

- 5,20, 1,855 mg/L i 0,387 mg/L, respektivno za otpadne i procedne vode sa mesta u blizini potoka Saraka,
- 2,70, 333,5 mg/L i 27,5, mg/L, respektivno za ispumpane otpadne vode iz podzemnog kopa Bor,
- 6,50, 0,356 mg/L i 2,612 mg/L, respektivno na mestu u blizini ulivanja preusmerenog dela Borske reke u Kriveljsku reku i
- 6,10, 55,16 mg/L i 26,5 mg/L, respektivno za jezero Robule.

Šerbula i sar. (2016) su takođe preneli rezultate petogodišnjeg istraživanja zagađenosti Borske reke, datih u vidu histograma sa predstavljanim koncentracijama određenih metala i uporednim prikazom njihovih maksimalno dozvoljenih koncentracija, MDK (Slika 22.).





**Slika 22.** Petogodišnji monitoring koncentracija jona metala u Borskoj reci, pre ulivanja u Timok (novembar 2010. godine)

MDK za merene metalne jone: Cu<sup>2+</sup> - 0,1 mg/L; Zn<sup>2+</sup> - 1 mg/L; Pb<sup>2+</sup> - 0,1 mg/L; Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> - 1 mg/L; Mn<sup>2+</sup> - nedefinisano; As<sup>3+</sup> i As<sup>5+</sup> - 0,05 mg/L (Šerbula i sar. 2016)

U radu Đorđević i sar. (2018), takođe su dati podaci za zagađene vode iz regiona Bora (s tim, što se samo par lokacija poklapalo sa onim koje su bile izabrane za analizu i u ovoj doktorskoj disertaciji). Tako na primer, vode koje su praktično bile uzorkovane 2015. godine, sa mesta kao što su naselje Brezonik (otpadne AMD, vode iz podzemnog rudnika Bor) i potok Saraka u blizini otvorenog kopa Veliki Krivelj (otpadne AMD, vode), imale su sledeće vrednosti pH: 2,79 i 4,43, respektivno i koncentracije metala u filtriranoj vodi kao što sledi:

- 133 µg/L Cu, 5670 µg/L Zn, 743 µg/L As, 34,7 µg/L Cd i 8,5 µg/L Pb i
- 124 µg/L Cu, 2010 µg/L Zn, 2,7 µg/L As, 15,6 µg/L Cd i 1,4 µg/L Pb.

Stanković (2016) je izneo obimne podatke o jezeru Robule koje je posebno interesantno, jer je izrazito bogato gvožđem, koje se ovde nalazi pre svega u oksidovanom obliku (zbog dejstva rastvorenog kiseonika, kojim su nadzemne AMD izuzetno bogate). Praktično, Fe je u ovom jezeru prisutno u vidu Fe<sup>3+</sup>-jona, koji boje vodu u karakterističnu boju tamnocrvene rđe.

Naime, jezero Robule je nastalo sredinom sedamdesetih godina 20-og veka, kao posledica nanošenja ogromnih količina rudničke raskrivke koja je oformila takozvani Oštrejski planir. Nanošenjem raskrivke, došlo je do zatrpavanja nadzemnih vodotokova, tako da je voda vremenom izbila ispod deponije i oformila samo jezero Robule (dužina: 450 m, širina 150 m, na najširem mestu). Izloženost sulfidnih minerala (pirit) iz raskrivke kiseoniku i samoj vodi, prouzrokovala je najrazličitije hemijske i biološke (pre svega, mikrobiološke) procese koji su u konačnom doveli do stvaranja AMD, a koje se dalje slivaju u jezero. Zato je voda ovog jezera postala ekstremno kisela i zagađena velikim količinama različitih metala. Stalno spiranje površinskih, oksidisanih slojeva raskrivke, otkriva neprestano nove slojeve jalovišta sa sulfidnim mineralima koji su ostali i dalje neoksidisani; ovim ponavljajućim ciklusima, jalovište već 4 decenije obnavlja jezero kiselim vodama. Osim toga, u jezero dospevaju i kisele vode iz metalurških procesa u RTB Bor. Iz jezera dalje, svakodnevno ističe oko 500 m<sup>3</sup> izrazito zagađene vode koje odlazi u Borsku reku. Jezero se

bez prestanka snabdeva i svežom vodom, te je količina vode prilično ujednačena već godinama (Stanković 2016). Stanković (2016) navodi i rezultate pojedinih istraživača koji su objavili podatke 30-godišnjeg monitoringa fizičko-hemijskih i mikrobioloških osobina jezera Robule iz kojih je moguće zaključiti da je:

- najveća koncentracija Cu u vodi bila izmerena 1975. godine: 153 mg/L, a najniža 2008.: 96 mg/L,
- najveće koncentracije Fe i vrednosti redoks-potencijala izmerene su 1988. i iznosile su 961 mg/L i +527 mV, a najmanje 1975.: 562 mg/L i +297 mV, respektivno,
- u periodu od juna 2011. do maja 2012. uočene su velike fluktuacije u pH vrednosti vode: od 4,48 do 2,56, ali i koncentraciji Fe: od 520 mg/L do 835 mg/L; koncentracije Cu varirale su oko vrednosti od 70 mg/L.

Neka kasnija merenja, iz 2018. i 2019. godine, takođe su ukazala na niske vrednosti pH zagađenih voda u blizini mesta uzorkovanja iz ove disertacije, kao i visoke koncentracije raznih metala. U merenjima iz 2018. godine, AMD otpadne vode koje potiču iz podzemnog rudnika u samom Boru bile su izrazito kisele: 3,62 (E-cube, 2015-2020).

U merenjima iz 2019. godine, Robule jezero, preusmereni deo Borske reke (prema Kriveljskoj reci) i Kriveljska reka imale su sledeće vrednosti pH, rastvorenog kiseonika i električnog konduktiviteta (RoRS 337, 2021):

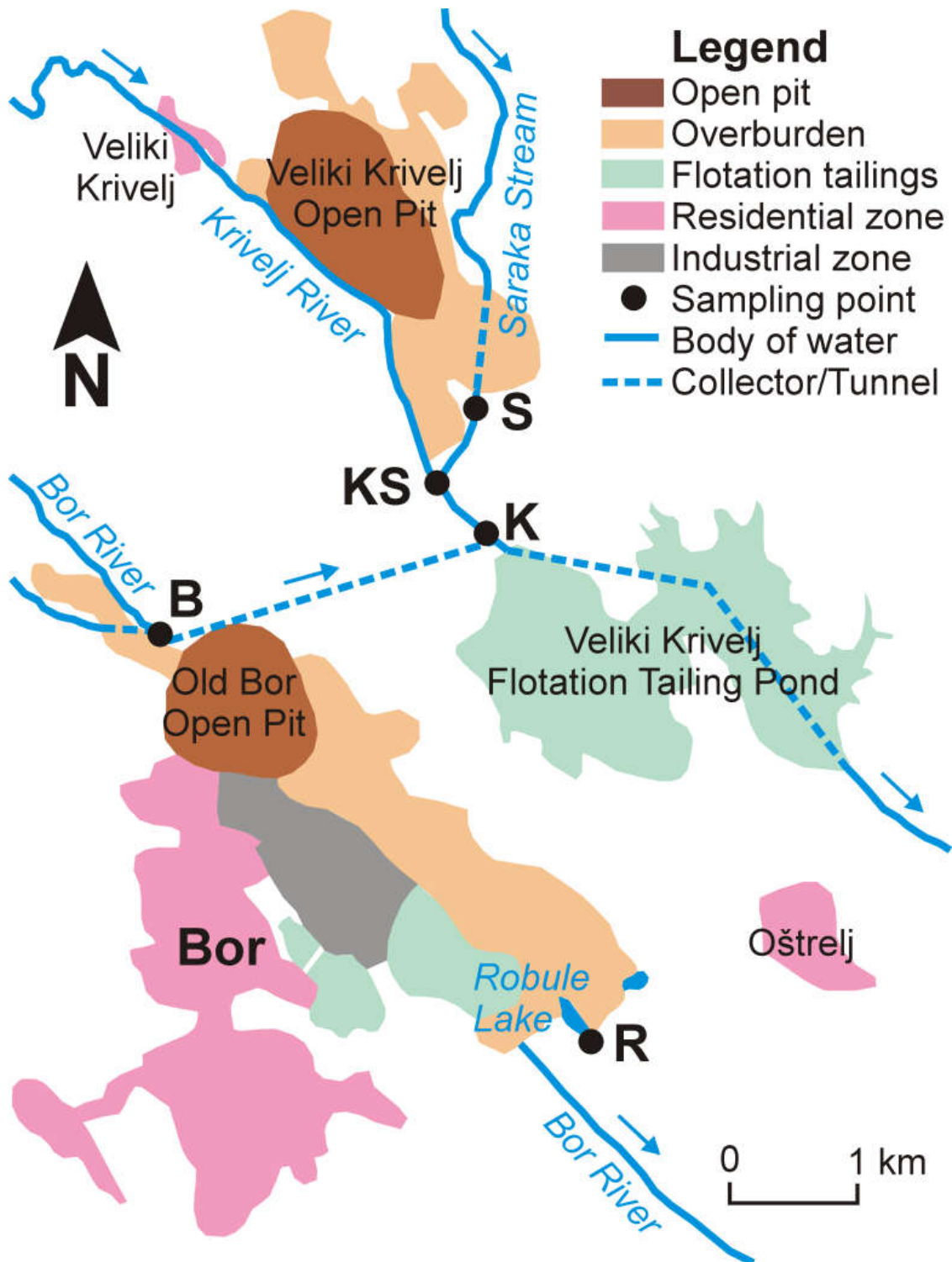
- Robule jezero – 2,77, 6,04 mg/L i 7733  $\mu$ S/cm, respektivno,
- preusmereni deo Borske reke – 3,04, 7,07 i 3232  $\mu$ S/cm, respektivno i
- Kriveljska reka – 7,31, 10,35 i 1910  $\mu$ S/cm, respektivno.

Takođe, merenja iz 2019. godine, su pokazala da Robule jezero, preusmereni deo Borske reke, Kriveljska reka i AMD iz podzemnog rudnika u Boru imaju sledeće vrednosti merenih koncentracija metala Fe (ukupno), Cu, Zn, As, Ni, Pb, Cd i Cr, izraženo u mg/L (RoRS 337, 2021):

- Robule jezero – 981, 56,4, 23,3, < 0,02, 0,21, < 0,02, 0,068 i < 0,005, respektivno,
- preusmereni deo Borske reke – 148,6, 111, 9,4, 0,27, 1,1, 0,49, 0,8 i 0,032, respektivno
- Kriveljska reka – 0,26, < 0,005, 0,022, < 0,02, 0,031, < 0,02 i < 0,008, respektivno i
- AMD iz podzemnog rudnika u Boru – 181,3, 21,17, 2,59, < 0,02, 0,046, < 0,02, < 0,008 i < 0,005, respektivno.

Sve ove okolnosti, snažno i negativno su uticale na kvalitet zemljišta/nanosa na obalama reka i rečica, čineći gotovo nemogućim uslove za opstanak vegetacije. Danas se samo nekoliko biljnih vrsta (uglavnom zeljastih i žbunastih biljaka) može naći na zagađenim obalama i gotovo redovno na udaljenosti od nekoliko do nekoliko desetina metara od vodenog toka, ili površine. Među njima, mlečika i kopriva, bile su uočene na više mesta u blizini metalurško-topioničarskog kompleksa u Boru (Slika 23.), kao tipične pionirske, odnosno kolonizatorske vrste, u vidu karakterističnih mini populacija od svega nekoliko biljaka, naizgled zdravog izgleda i praktično, bez ikakvih vidljivih simptoma toksičnosti.

Ovi detalji predstavljali su prve znakove finih potencijala obe biljne vrste za relativno laku adaptaciju na izrazito neprijateljsko okruženje, što je u suštini predstavljalo jednu solidnu početnu osnovu za dalja istraživanja njihovih praktičnih i autentičnih biomonitring i fitoremedijacionih potencijala i eventualnu primenu u obnavljanju vegetacije (ne samo na lokalnom, već i na opštem nivou).



Slika 23. Mapa mesta uzorkovanja u blizini rudarsko-metalurškog kompleksa bakra u Boru (Petrović i sar. 2021)

Osnovni opisni podaci za mesta uzorkovanja sa Slike 23. su sledeći:

- 1) Lokacija S - u neposrednoj blizini odlagališta površinskog kopa u Velikom Krivelju, pored lokalnog potoka Saraka (prvenstveno ugrožen formiranim AMD) (Slika 24.). GPS koordinate za ovo mesto su: N 44° 06'.441'' i E 022° 07'.405'', a udaljenost od glavnog izvora zagađenja, tj. topionice bakra u centru metalurškog kompleksa u Boru je 4 km (N).



**Slika 24.** Mesto uzorkovanja, S, kod potoka Saraka (autor, mr Jelena Petrović)

2) Lokacija KS - mesto ušća Saraka potoka u Kriveljsku reku (Slika 25.), koja nosi otpadne vode sa površinskih rudnika bakra u Cerovu i Velikom Krivelju, ali i iz flotacije u Velikom Krivelju; Kriveljska reka je primalac i AMD pomenutih rudnika i njihovih okolnih deponija. Udaljenost ovog mesta od topionice bakra u centru metalurškog kompleksa u Boru je 3,9 km (N), dok su GPS koordinate: N 44° 06' .441'' i E 022° 07' 405''.



**Slika 25.** Mesto uzorkovanja, KS, kod ušća potoka Saraka u Kriveljsku reku (autor, mr Jelena Petrović)

3) Lokacija K - mesto u blizini ušća (preusmerenog dela) Borske reke u Kriveljsku reku (tačnije, radi prevođenja otpadnih voda iz podzemnog kopa „Jama” u Kriveljsku reku, pomenuti deo Borske reke je namerno preusmeren sa originalnog toka); praktično, mesto uzorkovanja je pozicionirano veoma blizu ulaza u betonski kolektor koji je izgrađen radi usmeravanja Kriveljske reke u tok ispod najvećeg flotacionog jalovišta (dužine približno 2 km) (Slika 26.). GPS koordinate ovog mesta su: N 44°06' .000'' i E 022°07' 724'', dok je udaljenost od topionice 3,4 km (N).



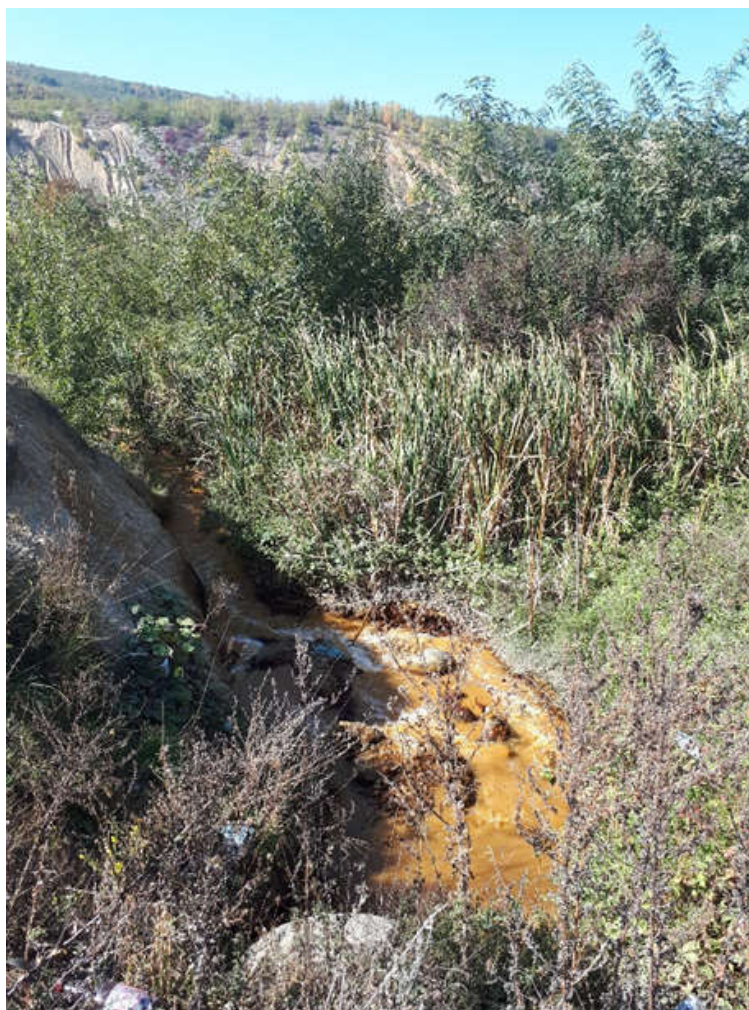
**Slika 26.** Mesto uzorkovanja, K, u blizini ušća (preusmerenog dela) Borske reke u Kriveljsku reku (autor, mr Jelena Petrović)

4) Lokacija R - jezero Robule formirano od AMD poreklom od jalovine koja okružuje napušteni površinski kop u Boru (praktično, veoma blizu UI zone) i kako je već opisano, karakteristično je po niskom pH i visokom sadržaju Fe (Slika 27.). GPS koordinate jezera Robule su: N 44° 06' .384'' i E 022° 13' 574'', a udaljenost od topionice je 2,3 km (SE).



**Slika 27.** Mesto uzorkovanja, R, jezero Robule (autor, mr Jelena Petrović)

5) Lokacija B - naselje Brezonik (predgrađe grada Bora, iza gradske bolnice, UI zona) koje okružuje uski tok AMD formiranim u podzemnom kopu, „Jama” u Boru (Slika 28.); na ovoj lokaciji, biljke K nisu pronađene. GPS koordinate naselje Brezonik su: N 44° 03' .612'' i E 022° 05' 742'', a udaljenost od topionice je 2,2 km (NW).



**Slika 28.** Mesto uzorkovanja, B, u naselju Brezonik, predgrađe grada Bora (autor, mr Jelena Petrović)

6) Lokacija O – seosko naselje Oštrelj, oko 4-5 km udaljeno od metalurškog kompleksa u Boru, gde ispitivane biljne vrste nisu bile pronađene u blizini nekog vodenog toka, ili površine, već na poljoprivrednom zemljištu, preciznije, na samoj ivici poljoprivredne parcele, u blizini jalovišta u ovom naselju, za koju je poznato da je bila tretirana raznim agrotehničkim merama (Slika 29.); uzorci su bili sakupljeni sa nekoliko tačaka (po pet biljaka svake vrste, a zatim je za svaku vrstu, spajanjem, formiran po jedan reprezentativni uzorak); u tom smislu, uzorci sa mesta O nisu ispunjavali osnovni postavljeni kriterijum, odnosno, biljke nisu bile pozicionirane pored zagađenih voda, te tako nisu bile ni podvrgnute statističkim analizama, zajedno sa rezultatima dobijenim za biljke sa svih ostalih lokacija; ipak, na kraju ovog doktorskog rada, prikazani su rezultati merenja koncentracija i za ovo mesto, kao i rezultati za izračunate MR, kako bi se stekao makar jedan blagi uvid u fitoekstrakcione potencijale ispitivanih biljaka i sa ovako različitog mesta uzorkovanja, odnosno sa različitog tipa zemljišta; rezultati iz O, dati su u posebnoj tabeli, odvojeno od ostalih lokacija.



**Slika 29.** Mesto izdvojenog uzorkovanja, O, u seoskom naselju Oštrelj (autor, mr Jelena Petrović)

## 4.2. Opis ispitivanih biljnih vrsta

Kao što je već objašnjeno, dve različite višegodišnje biljne vrste, mlečika suncogled, MS (*Euphorbia helioscopia* L.) (Slika 30.) i obična kopriva, OK (*Urtica dioica* L.) (Slika 31.), dve dobro poznate otporne, korovske biljke (naseljavaju različita prirodna, ali i kultivisana staništa) sa odavnina poznatom i širokom primenom u tradicionalnoj medicini (Perčić 2013), bile su pronađene na svim lokacijama od interesa (osim OK na lokaciji B) i zato su bile i odabrane za procenu praktičnih, autentičnih biljnih potencijala za biomonitoring i fitoekstrakciju.

Obe uzorkovane biljne vrste su zeljastog tipa, ali pripadaju potpuno različitim biljnim familijama, tako da su botanički posmatrano, prilično udaljene. Botanička sistematika za vrstu *Euphorbia helioscopia* L., tj. mlečiku koji brojni autori nazivaju i "suncogled" je kao što sledi (<https://onlineherbar.bio.bg.ac.rs/066.html>):

Razdeo Magnoliophyta  
 Klasa Magnoliopsida  
 Familija Euphorbiaceae  
 Vrsta *Euphorbia helioscopia* L.



a)



b)

**Slika 30.** *Euphorbia helioscopia* L., mlečika, suncogled, MS; a) fotografija, [https://en.wikipedia.org/wiki/Euphorbia\\_helioscopia](https://en.wikipedia.org/wiki/Euphorbia_helioscopia); b) slika iz botaničkog atlasa, <https://www.weberseeds.de/euphorbia-helioscopia.html>

Naučno, latinsko ime svih vrsta mlečika potiče od imena grčkog lekara Euforbija koji je bio lični lekar kralja Mauritanije, Juba II-og (52. pre nove ere – 23.). Ime same vrste *helioscopia*, poreklom je od grčke reči *helios* (tj. Sunce) i *skopein* (tj. gledati), jer biljka svoje cvetove uvek okreće prema Suncu ("gleda u Sunce").



Ova vrsta mlečike ima tanak, vretenasti koren; stabljike su većinom pojedinačne, uspravljene, duge 5-40 cm; listovi su naizmenični, oblika jajeta, ili skoro okrugli (oni koji se nalaze ispod same cvasti, krupniji su od listova na stablu); cvast je pojedinačna, 5-to radijalna, a zraci na krajevima su trokraki. Čaura je gola i glatka i ima tri duboke brazde. Cveta i plodonosi od aprila do novembra. Njena najčešća staništa su pre svega na osunčanim zakorovljenim mestima, u blizini naselja, uz staze i puteve, ali i u vinogradima i povrtnjacima. Može se naći u Evropi, uključujući i Balkansko poluostrvo i Srbiju, zatim u severnoj Africi, Maloj Aziji i Aziji (sve do Japana); proširila se i na Severnu Ameriku, Australiju i Novi Zeland (<https://onlineherbar.bio.bg.ac.rs/066.html>). Kao i sve druge vrste mlečike i ova je otrovna; ona sadrži otrovan, lepljivi "mlečni" sok, takozvani "lateks", koji već i ako se samo prsti posle dodira sa biljkom stavljaju u usta, može izazvati plikove na jeziku i ustima (<https://www.plantea.com.hr/mljecika-suncogled/>). Ipak, iako lateks ima toksične efekte, ova biljka može poslužiti i kao lekovita. Beli lateks koji se oslobađa iz stabla može se koristiti u lečenju kožnih lezija – bradavica, ali i mrlja nastalih od preteranog izlaganja suncu. Ipak, da bi se on mogao dobro iskoristiti, potrebno je poznavati tačne koncentracije, kao i vreme primene i količine. Ako se ne koristi pod definisanim uslovima, može oštetiti bubrege, jetru, izazvati mučninu i povraćanje, diareju, pa čak i srčani udar ([https://www.jardineriaon.com/bs/helioskopija-euforbije.html#Propiedades\\_medicinales](https://www.jardineriaon.com/bs/helioskopija-euforbije.html#Propiedades_medicinales)).

Kada je u pitanju kopriva (koja može biti i jednodoma i dvodoma biljka, zbog pojave odvojenih muških i ženskih cvetova na zasebnim biljkama), njena botanička sistematika je (<https://www.plantea.com.hr/kopriva/>):

Razdeo Magnoliophyta  
Klasa Magnoliopsida  
Familija Urticaceae  
Vrsta *Urtica dioica* L.



a)



b)

Slika 31. *Urtica dioica* L., obična kopriva, OK; a) fotografija,

<https://sr.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%B2%D0%B0>; b) slika iz botaničkog atlasa, <https://bs.wikipedia.org/wiki/Kopriva>

Stabljika koprive je uspravna, četvrtasta, tj. na četiri ivice i može da poraste i do 150 cm visine. Koren je žiličast i ima žućkastu boju, a listovi su poređani jedan nasuprot drugog, izduženo

su jajasti, zašiljeni i blago nazubljeni, a nalaze se na dužoj, ili kraćoj peteljci. Cijela biljka pokrivena je dlačicama koje sadrže i ispuštaju mravlju kiselinu te zbog toga žare površinu kože. Cvetovi su jednopolni, sitni i neugledni, žućkastozelene boje, sakupljeni u guste cvatove koji vise iz pazuha gornjih listova. Cveta od jula do septembra. Seme je brojno i veoma sitno (i do 20000 u sezoni, a sposobnost klijanja zadržava i posle 600 godina). Raširena je u celom svetu i nalazi se u prirodi gde raste u gustim skupinama, na zapuštenim mestima, polusenovitim livadama, na ruralnim staništima, poplavljenim predelima, na mestima bogatim hranjivim materijama, posebno azotom. To je jedna od najsvestranijih biljaka, kao lekovita za čovjeka, ali i kao biljka za baštu (Perčić 2013). Naziv *Urtica* potiče od latinske reči *urere* (što znači: pržiti, žariti), dok *dioica* znači dvodoman. Mladi izdanci i listovi koprive su jestivi, ali se u ove svrhe beru na početku proleća kada još nisu potpuno razvili sastojak koji žari i imaju puno vitamina C (75-140 mg%), karotina (do 20 mg%), minerale (Fe, P, Ca), itd. Kopriva sadrži kremenu, oksalnu, pa i mravlju kiselinu (koja žari). Može se kuvati kao povrće, naročito kao dodatak supama. Čaj od koprivinog lista podstiče razmenu materija u organizmu, a posebno je koristan za izlučivanje mokraćne kod ljudi koji pate od gihta, reumatizma i problema sa bešikom. Ovaj čaj čisti krv, pa je kopriva skoro neizbežna u prolećnim tretmanima za čišćenje organizma (<https://www.plantea.com.hr/kopriva/>).

### 4.3. Uzorkovanje, priprema i analiza biljnog i zemljišnog materijala

Uzorci izdanaka obe ispitivane biljne vrste uzeti su iz prisutnih malih populacija biljaka koje su rasle na udaljenosti od 1-3 m od svakog odabranog vodotoka, ili vodene površine. Rastojanje između biljnih populacija (posmatrajući obe vrste) bilo je maksimalno 5 m. Na svakoj lokaciji, biljni materijal je sakupljen sa 6 biljaka (od svake vrste); zemljišni/sedimentni materijal je sakupljen iz površinskog sloja (dubine do 10 cm) koji je okruživao uzorkovane biljke, izbegavajući na taj način uništavanje korenja obe istraživane višegodišnje biljke (važno za potrebe restauracije selektovanih mesta). Ovi prvobitno sakupljeni uzorci (sub-uzorci) su kasnije spojeni tako da se dobije reprezentativni uzorak svakog ispitivanog matriksa (tj. izdanak MS, izdanak OK i gornji sloj tla koji je okruživao pomenute, mešovite populacije biljaka) za svaku izabranu lokaciju. Svi reprezentativni uzorci sušeni su na vazduhu do konstantne težine (od jednog do tri meseca, zavisno od matriksa), u čistoj prostoriji, zaštićeni od bilo kakve dalje kontaminacije. Pre procesa sušenja, izdanci su isprani običnom, tekućom vodom iz slavine, a zatim i bi-distilovanom vodom. Osušeni uzorci izdanaka samleveni su u mlinu: Retch Vibratory Disc Mills RS 200, dok su uzorci zemljišta/sedimenta prosejani kroz 2 mm-sito od nerđajućeg čelika.

Homogenizovani uzorci zemljišta i izdanaka su dalje bili odmereni na po 0,5 g svaki i rastvoreni kombinacijom sledećih reagenasa: 1) 65% HNO<sub>3</sub> i 37% HCl za uzorke zemljišta i 2) 65% HNO<sub>3</sub> i 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za uzorke biljaka, po USEPA (United States Environmental Protection Agency) metodama: 3051A za zemljišni (USEPA 2007) i 3052 za biljni materijal (USEPA 1996). Digestija obe vrste uzoraka sprovedena je u mikrotalasnom sistemu Milestone ETHOS 1 (Bergamo, Italija) (Slika 32.) podižući temperaturu do 200°C u toku 15 min, a zatim je ista zadržana 30 min. Dobijeni digestati razblaženi su do konačne zapremine od 100 mL za zemljišne i 50 mL za biljne uzorke, korišćenjem ultra-čiste destilovane vode. Ovako pripremljeni rastvori su dalje bili analizirani ICP-MS metodom na aparatu Agilent 7700 ICP-MS (Agilent Company, USA) (Slika 33.). Kvantitativna analiza bila je zasnovana na jonima kvantifikatorima ispitivanih elemenata. Kvantifikacioni joni (m/z) za ispitivane metale bili su: 63 za Cu, 66 za Zn, 111 za Cd, 75 za As i 208 za Pb. Obezbeđenje i kontrola kvaliteta ostvareni su korišćenjem slepih proba i sertifikovanih referentnih materijala NCS DC 70311 (Tibet sediment) za zemljište i NIST SRM 1570a (lišće spanaća) za uzorke biljaka.



Slika 32. Sistem za mikrotalasno rastvaranje, Milestone ETHOS 1 (Bergamo, Italija) (autor, mr Jelena Petrović)



**Slika 33.** ICP-MS aparat Agilent 7700 ICP-MS (Agilent Company, USA)

Instrument Agilent 7700 ICP-MS, povezan je na ventilaciju i poseduje autosampler preko koga se uzorci unose u uređaj. Softver preko koga se upravlja uređajem je MassHunter, dok su parametri pod kojima je uređaj radio bili:

- Brzina pumpe za ispiranje - 100 rpm
  - Brzina pumpe tokom analize - 50 rpm
  - Snaga RF generatora - 1550 W
  - Protok gasa u raspršivaču – 0,7 L/min
  - Protok rashladnog gasa - 12 L/min
  - Protok pomoćnog gasa – 0,5 L/min
  - Pozicija plazme – Axial
- Parametri peristaltičke pumpe:
- Uzimanje uzorka - 45 s, brzina 0,4rpm
  - Stabilizacija - 30 s, brzina 0,1 rpm
  - Ispiranje sonde (uzorak) 40 s, brzina 0,4 rpm
  - Ispiranje sonde (standard) 40 s, brzina 0,4 rpm.

Sva ICP-MS merenja urađena su analizom rastvorenih triplikata od svakog uzorka, a snimanje je vršeno u pet ponavljanja za svaki uzorak i rezultati su predstavljeni u Tabeli 11., u odeljku koji sledi: Rezultati i diskusija. Ova tabela sadrži detektovane koncentracije ispitivanih metal(oid)a prikazane kao: srednja vrednost ± standardna devijacija, SD i to na bazi suve mase, SM, izražene u mg/kg, ali i rezultate provere tačnosti primenjene ICP-MS metode, korišćenjem navedenih SRM (izraženo u % i prikazano u Tabeli 11. kao: netačnost), kao i limit detekcije, LOD. Netačnost određivanja iskazana je kao relativna greška računata po formuli:

$$[(\text{Određen sadržaj} - \text{sertifikovan sadržaj}) / \text{sertifikovan sadržaj}] \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

Fosfor u zemljištu određen je na isti način, ali su odgovarajući rezultati dati u Tabeli 12. (Rezultati i diskusija), zajedno sa rezultatima za N u zemljištu, kao i drugim važnim zemljišnim parametrima: pH, OM i EC. U Tabeli 12. se takođe nalaze i rezultati analize teksture zemljišta, koja je urađena primenom Gee i Bauder (1986) hidrometerske metode. Sadržaj (ukupnog) zemljišnog N određen je metodom suvog sagorevanja (ISO 13878, 1998), dok je OM zemljišta određena gubitkom mase na

550°C (Jolivet i sar. 1998). pH i EC su mereni u rastvorenim uzorcima (osušenog) zemljišta (zemljište/destilovana voda = 1:2,5 w/v), korišćenjem pH-metra 3510 Jenway (UK) i EC-metra 4510 Jenway (UK), respektivno.

Sve hemijske analize urađene su u laboratoriji Instituta za rudarstvo i metalurgiju u Boru.

#### **4.4. Procesuiranje rezultata dobijenih hemijskom analizom**

Statistička obrada rezultata hemijske analize obavljena je korišćenjem (Alagić i sar. 2013, 2015a, 2018b, 2019; Al-Khashman i Shawabkeh 2006; Dimitrijević i sar. 2016; Elshamy i sar. 2019; Jabłońska-Czapla i sar. 2020; Miller i Miller 2005; Tošić i sar. 2016):

1) Pearson-ove korelacione studije - za detektovanje značajnih korelacija između dobijenih rezultata koji su tretirani kao varijable; varijable su bile: detektovane koncentracije teških metala u svim ispitivanim matriksima, mereni zemljišni parametri (pH, OM, EC, ukupni N i P), kao i udaljenost lokacija od metalurškog kompleksa u Boru sa topionicom bakra kao glavnim izvorom atmosferskog zagađenja u celom regionu;

2) One-way ANOVA sa Tukey-testom kao post hoc tehnikom poređenja – za identifikaciju statistički značajnih razlika između varijabli od interesa: detektovane koncentracije teških metala u zemljištu, kao i detektovane koncentracije teških metala u izdancima obe ispitivane vrste; i

3) HCA – radi klasifikacije objekata sistema u kategorije (klastere) na osnovu njihovih sličnosti; HCA je izvedena korišćenjem dve metode: 1) primenom Ward-ove metode povezivanja, kao i kvadrata Euclidean-udaljenosti, kao mernog intervala i 2) metodom povezivanja srednjih vrednosti između grupa sa Pearson-ovom korelacijom kao mernim intervalom.

Pre primene ovih metoda, Shapiro-Wilk-test bio je iskorišćen da bi se pokazalo da podaci potiču iz populacije sa normalnom distribucijom (nivo značajnosti,  $\alpha = 0,05$ ), dok je homogenost varijanse bila potvrđena Levene-ovim testom. Sve statističke metode urađene su primenom softvera IBM SPSS statistic 20 (SAD).

Rate akumulacije ispitivanih metal(oid)a u sakupljenim izdancima obe biljne vrste izračunate su za svaku lokaciju primenom odgovarajućeg bioakumulacionog faktora MR (po formuli (3)), koji ukazuje na fitoekstrakcioni potencijal biljke. Izračunavanje MR bioakumulacionih faktora, kao i izrada odgovarajuće slike (Slika 34.), urađeni su u Excel-programu paketa Windows Office 7.

## 5. Rezultati i diskusija

Rezultati ICP-MS analize biljnog i zemljišnog/sedimentnog materijala dati su u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Koncentracije teških metala u sakupljenim zemljišnim/sedimentnim i biljnim uzorcima (mg/kg)\* sa odgovarajućim analitičkim parametrima i literaturnim podacima

Mesto/Metal(oid)	Cu	Zn	Pb	As	Cd
<b>Koncentracije u uzorcima zemljišta/sedimenta (mg/kg)</b>					
S	2888,8 ± 31,5	67,55 ± 0,16	13,16 ± 0,16	6,95 ± 0,25	0,268 ± 0,034 <sup>B</sup>
KS	188,71 ± 1,26	74,7 ± 0,8 <sup>A</sup>	23,58 ± 0,33	18,26 ± 0,47 <sup>A</sup>	0,33 ± 0,05 <sup>B</sup>
K	805,17 ± 7,96 <sup>A</sup>	75,58 ± 0,69 <sup>A</sup>	34,31 ± 0,25	16,7 ± 0,6 <sup>A</sup>	0,476 ± 0,027
R	741,66 ± 3,01	146,46 ± 0,97	31,94 ± 0,22	59,8 ± 1,1	1,58 ± 0,08 <sup>A</sup>
B	815,3 ± 3,8 <sup>A</sup>	97,06 ± 0,23	136,13 ± 0,94	273,54 ± 5,15	1,61 ± 0,05 <sup>A</sup>
LOD	0,535	1,719	0,015	0,041	0,086
Netačnost	1,07%	1,04%	1,01%	1,05%	1,02%
<b>Literaturni podaci za zemljište/sediment (mg/kg)</b>					
Prosečne koncentracije za zemljišta u svetu	14 <sup>a</sup> 38,9 <sup>b</sup>	62 <sup>a</sup> 70 <sup>b</sup>	25 <sup>a</sup> 27 <sup>b</sup>	4,7 <sup>a</sup> 6,83 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup> 0,41 <sup>b</sup>
Srpsko zakonodavstvo, LV	36 <sup>c</sup> /190 <sup>d</sup>	140 <sup>c</sup> /720 <sup>d</sup>	85 <sup>c</sup> /530 <sup>d</sup>	29 <sup>c</sup> /55 <sup>d</sup>	0,8 <sup>c</sup> /12 <sup>d</sup>
Evropsko zakonodavstvo <sup>e</sup> , LV	50–140	150-300	50-300	/	1-3
Fitotoksični nivoi u zemljištu <sup>a</sup>	36-698 <sup>f</sup>	100-500	/	40 <sup>g</sup> /200 <sup>b</sup>	/
<b>Koncentracije u biljnim uzorcima (mg/kg)</b>					
<b>Mlečika, MS</b>					
S	684,99 ± 4,44	72,72 ± 0,81	24,04 ± 0,29	1,08 ± 0,16 <sup>C</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>E,F,H</sup>
KS	89,27 ± 0,34	28,6 ± 0,3	6,26 ± 0,14	1,59 ± 0,19 <sup>B,D</sup>	0,088 ± 0,015 <sup>C,D</sup>
K	112,43 ± 0,59	44,84 ± 0,33	12,13 ± 0,05 <sup>A</sup>	1,87 ± 0,18 <sup>A,D,E</sup>	0,074 ± 0,005 <sup>A,C</sup>
R	1001,6 ± 9,2	39,81 ± 0,36	8,09 ± 0,16	2,3 ± 0,3 <sup>E</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>E</sup>
B	1224,6 ± 2,9	94,64 ± 0,69	23,56 ± 0,38	6,4 ± 0,3	0,46 ± 0,04 <sup>G</sup>
<b>Kopriva, OK</b>					
S	341,25 ± 2,89	34,86 ± 0,55	12,40 ± 0,14 <sup>A</sup>	0,86 ± 0,18 <sup>C</sup>	0,228 ± 0,004 <sup>B,H</sup>
KS	126,31 ± 1,59	31,204 ± 0,209	7,34 ± 0,04	1,78 ± 0,09 <sup>A,B</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>A,D</sup>
K	307,91 ± 2,91	53,04 ± 0,46	26,97 ± 0,33	2,91 ± 0,12	0,43 ± 0,05 <sup>G</sup>
R	226,20 ± 1,52	90,014 ± 1,038	13,55 ± 0,15	5,20 ± 0,35	0,22 ± 0,03 <sup>B,F</sup>
LOD	3,208	0,976	0,042	0,116	0,025
Netačnost	1,09%	0,98%	1,14%	0,96%	0,93%
<b>Literaturni podaci za biljke (mg/kg)</b>					
Normalni opsezi u biljkama <sup>i</sup>	4-15 <sup>a,j</sup> 5-30 <sup>k</sup>	60 <sup>a</sup> 27-150 <sup>b,k</sup>	5-10 <sup>b,k</sup> 1-13 <sup>l</sup>	0,009-1,5 <sup>a,b</sup> 1-1,7 <sup>b,k</sup>	0,05-0,2 <sup>b,k</sup> 0,1-2,4 <sup>l</sup>
Fitotoksični opsezi u biljkama <sup>i</sup>	15-20 <sup>b,j,k,m</sup> 20-100 <sup>k</sup> 5-40 <sup>a</sup>	100-400(500) <sup>a,b</sup> 150-200 <sup>b,j,k,m</sup> 100-400 <sup>k</sup>	10-20 <sup>j</sup> 30-300 <sup>b,k</sup>	>~20 <sup>j</sup> 5-20 <sup>b,k</sup>	5-10 <sup>j,k,m</sup> 5-30 <sup>b,k</sup>

\* – Podaci su prezentovani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) za merenja u triplikatu; srednje vrednosti u istoj koloni sa istim velikim slovom u superskriptu označavaju da ne postoji značajna statistička razlika na nivou 0.05; A je uvek niže od B, B je uvek niže od C, itd. (ove oznake, tj. superskripti za zemljišne metale moraju se posmatrati odvojeno od oznaka za metale u biljnim izdancima)

a – Alloway (2013)

b – Kabata-Pendias (2011)

c – Granična vrednost, GV (Sl. glasnik RS, 30/2018)

d – Remedijaciona vrednost, RV (Sl. glasnik RS, 30/2018)

e – European Communities Council (1986)

f – Dikotiledone biljke

g – Peskovito zemljište i ilovača

h – Glinovito zemljište

i – Uglavnom tkivo razvijenog, zrelog lišća

j – Vamerali i sar. (2010)

k – Kabata-Pendias i Pendias (2001)

l – Nagajyoti i sar. (2010)

m – Kod osetljivih biljnih vrsta

Dobijeni rezultati otkrili su enormno visoke koncentracije Cu u svim prikupljenim zemljišnim/sedimentnim uzorcima, a posebno u uzorku sa lokaliteta S: 2888,8 mg/kg. Najniža koncentracija Cu zabeležena je u uzorku sa lokaliteta KS: 188,71 mg/kg; međutim, čak je i ova koncentracija bila mnogo veća od odgovarajućih LV-vrednosti datih u relevantnim srpskim i evropskim direktivama: 36 mg/kg (Sl. glasnik RS, 30/2018) i 50-140 mg/kg (European Communities Council, 1986); takođe, ona je bila veoma blizu remedijacione vrednosti, RV, za Cu od 190 mg/kg, koja je u srpskoj regulativi navedena kao krajnje alarmantna koncentracija, koja zahteva hitne mere sanacije (Sl. glasnik RS, 30/2018). Sve detektovane koncentracije zemljišnog Cu takođe su bile znatno veće, ili u granicama fitotoksičnih nivoa u raznim zemljištima (izveštenih od strane različitih autora) i izuzetno visoke u poređenju sa prosečnim zemljišnim koncentracijama ovog metala na svetskom nivou (Tabela 11.). Slično alarmantno stanje je takođe bilo primećeno i u slučaju visoko toksičnog metaloida As; naime, njegove koncentracije na lokalitetima R i B (u UI zoni) bile su veće od odgovarajuće RV od 55 mg/kg i LV od 29 mg/kg (Sl. glasnik RS, 30/2018); ove koncentracije takođe su bile u opsegu zemljišnih fitotoksičnih pragova. Takođe, sve koncentracije As u zemljištu bile su veće od prosečnih koncentracija u svetu i kretale su se od 6,95 mg/kg na lokalitetu S, do 273,54 mg/kg na lokaciji B (Tabela 11.). Situacija sa ostalim ispitivanim metalima, Zn, Pb i Cd nije bila toliko problematična, jer je bilo očigledno da je većina detektovanih koncentracija bila na nivou, ili tek nešto viša od zemljišnih proseka u svetu; osim u nekim retkim primerima (Zn na lokaciji R, Pb na lokaciji B i Cd na lokalitetima R i B), koncentracije pomenutih metala nisu prevazile srpske LV (i dodatno - bile su znatno niže od definisanih RV) (Sl. glasnik RS, 30/2018); takođe, nisu bile prevaziđene odgovarajuće LV navedene u Evropskoj regulativi (European Communities Council, 1986). Koncentracije Zn, Pb i Cd kretale su se kao što sledi: od 67,55 mg/kg (mesto S) do 146,46 mg/kg (mesto R), od 13,16 mg/kg (mesto S) do 136,13 mg/kg (mesto B) i od 0,268 mg/kg (mesto S) do 1,61 mg/kg (mesto B), respektivno (Tabela 11.). Primetno je da su najveće koncentracije ispitivanih metala (osim Cu) pronađene na UI lokacijama, odnosno R i B; ove lokacije karakterišu i najniže pH vrednosti - 5,34, odnosno 5,14, respektivno (Tabela 12.). Vrednosti pH zemljišta na ostalim lokacijama bile su znatno veće, odnosno u alkalnoj oblasti (Tabela 12.). Vrednosti EC zemljišta na pomenutim lokacijama R i B, bile su među najnižima izmerenim, kao i sadržaj OM zemljišta (Tabela 12.). Sadržaj zemljišnog N bio je veoma nizak na svim lokacijama (Tabela 12.), u rasponu od 0,11% na lokalitetu B do 0,19% na lokalitetu K. Tekstura zemljišta, odnosno analiza veličina čestica zemljišta, ukazala je da je na selektovanim lokacijama preovlašivalo peskovito zemljište (Tabela 12.).

**Tabela 12.** Karakteristike zemljišta/sedimenta

Mesto	pH	EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	OM (%)	N (%)	P (mg/kg)	Tekstura (%) (Pesak-Mulj-Glina)
S	7,32	1956	6,59	0,13	1068,55	45-38-17 ilovača
KS	8,45	176	3,90	0,15	648,05	85-11-4 ilovasti pesak
K	8,45	1455	6,07	0,19	783,75	95-4-1 pesak
R	5,34	484	4,22	0,16	328,75	93-6-1 pesak
B	5,14	238	5,28	0,11	602,55	88-9-3 pesak

Rezultati statističke metode One-way ANOVA (takođe dati u Tabeli 11., u vidu velikog latiničnog slova, na mestu superskripta), koja je primenjena na svaki pojedinačni metal (posmatrano po uzorcima zemljišta prikupljenih sa 5 odabranih lokacija i praktično, upoređujući srednje vrednosti koncentracija iz 5 nezavisnih grupa), pokazali su brojne statistički značajne razlike između detektovanih koncentracija. Broj lokacija bez statistički značajnih razlika bio je veoma mali: lokacije B i K za Cu, lokacije KS i K za Zn i As i parovi mesta R i B, kao i S i KS za Cd. Ovi nalazi potvrdili su da su koncentracije svakog ispitivanog zemljišnog metala značajno varirale, osim u slučaju Cd, gde su otkrivene samo minimalne varijacije.

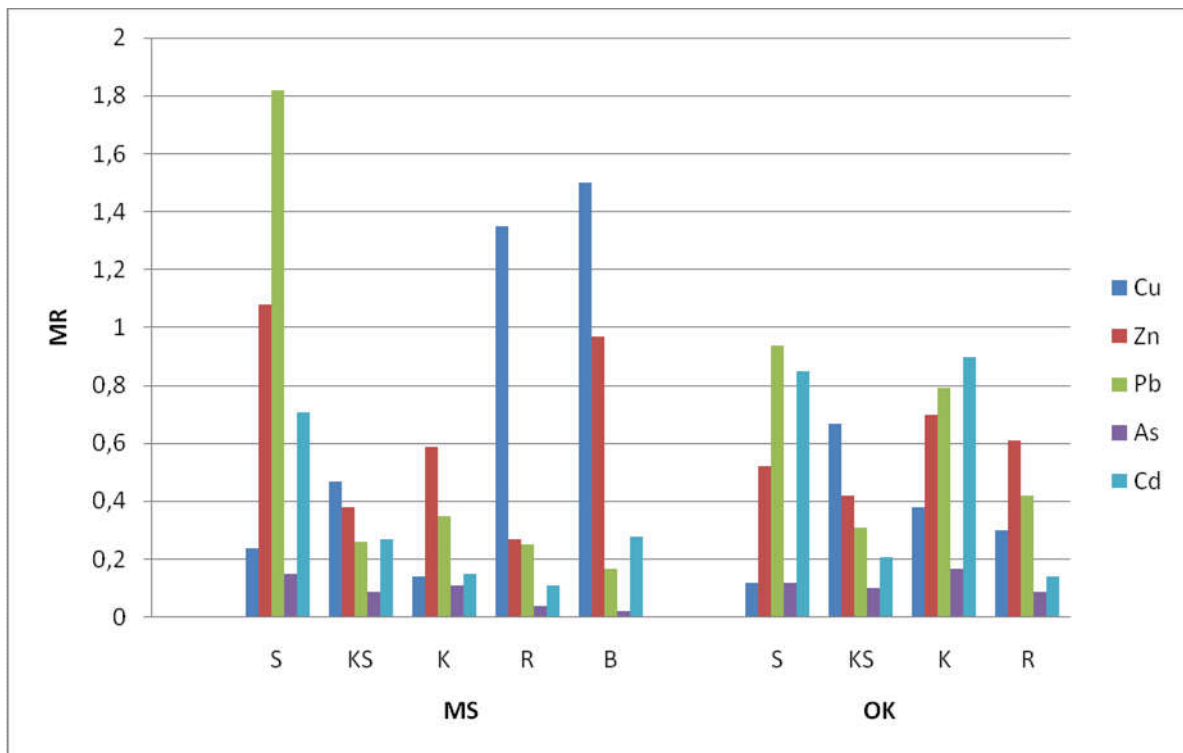
Slična situacija je primećena i kada je One-way ANOVA primenjena na koncentracije teških metala u izdancima biljaka (posmatrajući obe ispitivane vrste, gde su bile upoređene srednje



vrednosti iz 9 nezavisnih grupa, Tabela 11.); Naime, u većini slučajeva, koncentracije u izdancima varirale su značajno, osim u slučaju Cd i naročito As. Takođe, odsustvo statistički značajnih razlika registrvano je i za Pb u slučaju sledećih parova izdanaka: izdanci MS sa lokaliteta K i izdanci OK sa lokaliteta S.

Koncentracije teških metala u izdancima kretale su se u sledećim opsezima (Tabela 11.): 1) za Cd - od 0,07 mg/kg u izdancima OK sa lokaliteta KS, do 0,228 mg/kg u izdancima iste biljke sa mesta S; 2) za As - od 0,86 mg/kg u izdancima OK sa mesta S, do 6,4 mg/kg u izdancima MS sa mesta B; 3) za Pb - od 6,26 mg/kg u izdancima MS sa lokaliteta KS, do 26,97 mg/kg u izdancima OK sa lokaliteta K; 4) za Zn - od 28,6 mg/kg u izdancima MS sa lokaliteta KS, do 94,64 mg/kg u izdancima iste biljke sa lokaliteta B; i 5) za Cu - od 89,27 mg/kg u izdancima MS sa lokaliteta KS, do 1224,6 mg/kg u izdancima iste biljke sa lokaliteta B. Bilo je jasno da je najzastupljeniji element u svim istraživanim uzorcima izdanaka (posmatrano po svakoj ispitivanoj lokaciji zasebno) bio Cu; redosled zastupljenosti ostalih elemenata bio je sledeći: Zn > Pb > As > Cd. Sve koncentracije Cu u ispitivanim izdancima, bile su mnogo veće od normalnih koncentracija za većinu biljaka; štaviše, ove koncentracije su takođe bile znatno iznad fitotoksičnih pragova koje su izvestili različiti autori (Tabela 11.); takođe, fitotoksični rasponi su bili dostignuti, ili čak prevaziđeni u sledećim slučajevima: 1) u OK sa mesta R i u MS sa mesta B za As i 2) u OK sa mesta S, K i R i u MS sa mesta S, K i B za Pb (uzimajući u obzir strogi opseg koji su naveli Vamerali i sar. (2010)). Sve ostale koncentracije detektovane u izdancima biljaka bile su na normalnim nivoima. Kada su detektovane koncentracije teških metala u ispitivanim izdancima bile upoređene sa koncentracijama nađenim u koprivi sa obala zagađene reke Bytomka u Poljskoj (Jabłońska-Czapla i sar. 2020), bilo je uočljivo da su koncentracije Cu iz Borskog basena mnogo veće od onih u Bytomka River-basenu, koje su se na 5 mernih mesta kretale od 6,12 mg/kg do 11,5 mg/kg (Tabela 6.). U slučaju Zn, As i Cd situacija je bila obrnuta, jer su se njihove koncentracije u koprivi sa obala reke Bytomka kretale od 49,6 mg/kg do 399,0 mg/kg, od 3,48 mg/kg do 29,9 mg/kg i od 0,24 mg/kg do 1,93 mg/kg, respektivno (Tabela 6.). Situacija sa Pb je u dosta slučajeva bila slična kada su u pitanju dva različita upoređena basena i njegove koncentracije u koprivi iz Bytomka-basen-a kretale su se od 4,44 mg/kg do 56,7 mg/kg (Tabela 6.). Jasno je da je jedino opterećenje bakrom bilo značajnije u slučaju svih izdanaka iz Borskog basena nego kod koprive iz basena reke Bytomka, što sugerise i da je zagađenje ovim elementom bilo izraženije na ispitivanim lokacijama u Borskom okruženju nego na lokacijama u basenu reke Bytomka u Poljskoj.

Kada su koncentracije teških metala u izdancima dalje bile upoređene sa odgovarajućim koncentracijama u zemljištu/sedimentu, bilo je očigledno da one nisu na istim nivoima (Tabela 11.). Samo su koncentracije Zn u uzorcima izdanaka MS sa lokacija B i S bile veoma bliske koncentracijama Zn u zemljištu, odnosno samo u ovim slučajevima, izračunati odnosi između koncentracija u izdancima i zemljištu, MR, bili su veoma blizu 1 (Slika 34.), što je odlika biljaka-indikatora. Ipak, u najvećem broju slučajeva, koncentracije Zn, ali i ostalih teških metala u izdancima bile su znatno niže od odgovarajućih koncentracija u zemljištu, što sugerise da transfer metal(oid)a: zemlja-izdanak, kao i bioakumulacija u izdancima, nisu bili na nekim značajnijim nivoima; praktično, ogromna većina izračunatih vrednosti MR, bila je mnogo niža od 1 (Slika 34.). S obzirom na to da su koncentracije teških metala detektovane u izdancima delimično poticale i od apsorpcije preko listova, može se pretpostaviti da je pomenuti transfer bio čak i niži nego što je to bilo originalno uočeno iz izračunatih MR. Ovo sugerise da su se obe biljke, u konkretnim uslovima, za većinu metal(oid)a ponašale kao tolerantne, ali nehiperakumulatorske biljke, a možda čak i kao ekskluderi. Najznačajnije vrednosti MR (koje ukazuju na efikasnu bioakumulaciju), bile su izračunate za Cu u MS sa lokaliteta R i B i za Pb u istoj biljci sa lokaliteta S (Slika 34.). Zanimljivo je i da su koncentracije Cu u MS, sa pomenutih mesta R i B (sa najvećim koncentracijama Cu i najkiselijim zemljištem) takođe bile veće od 1000 mg/kg, što je iznad nivoa pronađenih u biljkama-hiperakumulatorima. Ovo sve dalje ukazuje da, pod određenim uslovima (a pre svega u uslovima kiselog pH zemljišta), MS može da pokaže jedan poseban afinitet prema Cu, a što dalje može biti od interesa za fitoremedijaciju.



Slika 34. Vrednosti MR za ispitivane metale kod mlečike, MS i koprive, OK

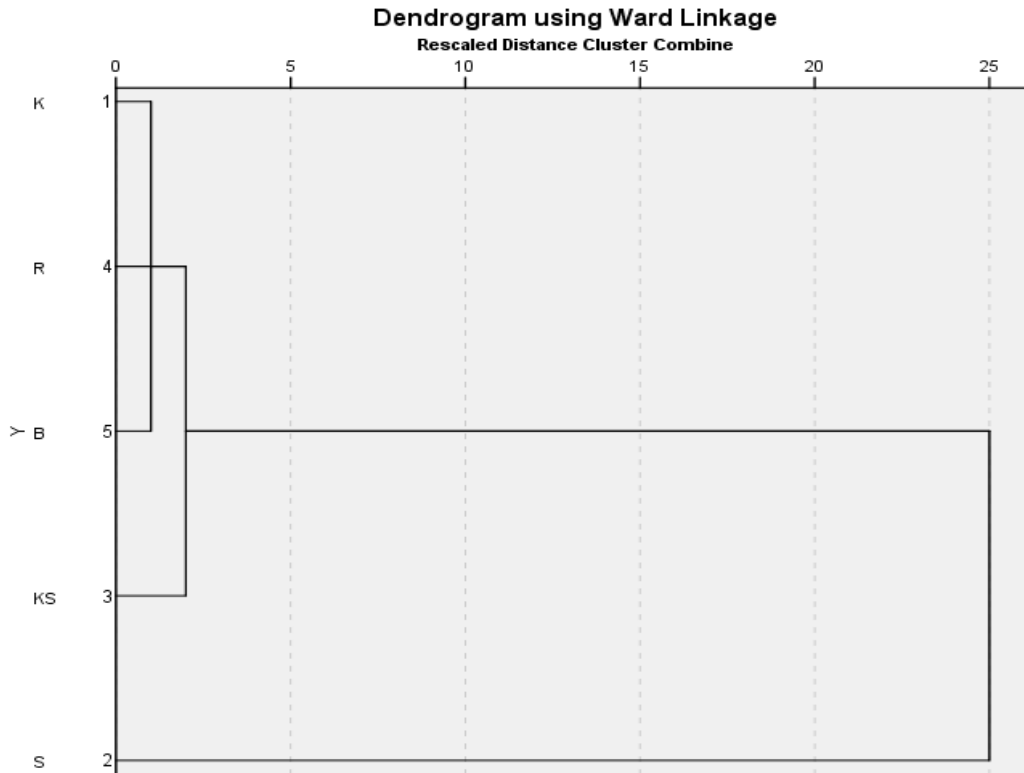
Ovi nalazi su takođe pokazali da izdanci obe ispitivane biljke ne mogu precizno da ilustruju postojeće stanje u zemljištu, što je najverovatnije posledica mešovitog porekla teških metala u njima (tj. zemljište i atmosfera), a takođe i posledica različitih sposobnosti biljaka za toleranciju metal(oid)a i praktično, za njihovu ekstrakciju, translokaciju i bioakumulaciju; konačno, sa liste uticajnih faktora, ne može se isključiti ni uloga nekih važnih parametara zemljišta kao što su pH, sadržaj OM, itd., ali i usvajanje teških metala ne samo preko korena, već i preko listova. Drugim rečima, ovi nalazi sugerišu da se ispitivani izdanci svakako ne mogu smatrati sigurnim alatom u biomonitoringu zemljišta. Sa druge strane, njihova primena u skringingu jednog opšteg nivoa zagađenja u oblastima od interesa (i više nekog sezonskog karaktera), deluje sasvim prihvatljivo. Tačnije, može se reći da su rezultati dobijeni za ispitivane metale u zemljištu odražavali jedno stanje koje predstavlja manifestaciju dugotrajne, stalne kontaminacije, dok je prisustvo metala u izdancima više bilo sezonske prirode.

Jasna ilustracija razlika između postojećeg stanja u zemljištu/sedimentu i stanja u izdancima svake ispitivane biljne vrste može se naći u odgovarajućim hijerarhijskim dendrogramima za ispitivane lokacije, dobijenim nakon urađene HCA (Slike 35-37.), gde su dendrogrami generisani na osnovu sadržaja svih ispitivanih teških metala, a uzimajući u obzir svaki ispitivani matriks posebno - zemljište/sediment (Slika 35.), izdanak MS (Slika 36.) i izdanak OK (Slika 37.); tokom ove vrste HCA, detektovane koncentracije teških metala tretirane su kao varijable, dok su lokacije tretirane kao slučajevi, a kao merni interval, korišćen je kvadrat Euclidean-udaljenosti (Alagić i sar. 2015a, 2018b; Tošić i sar. 2016).

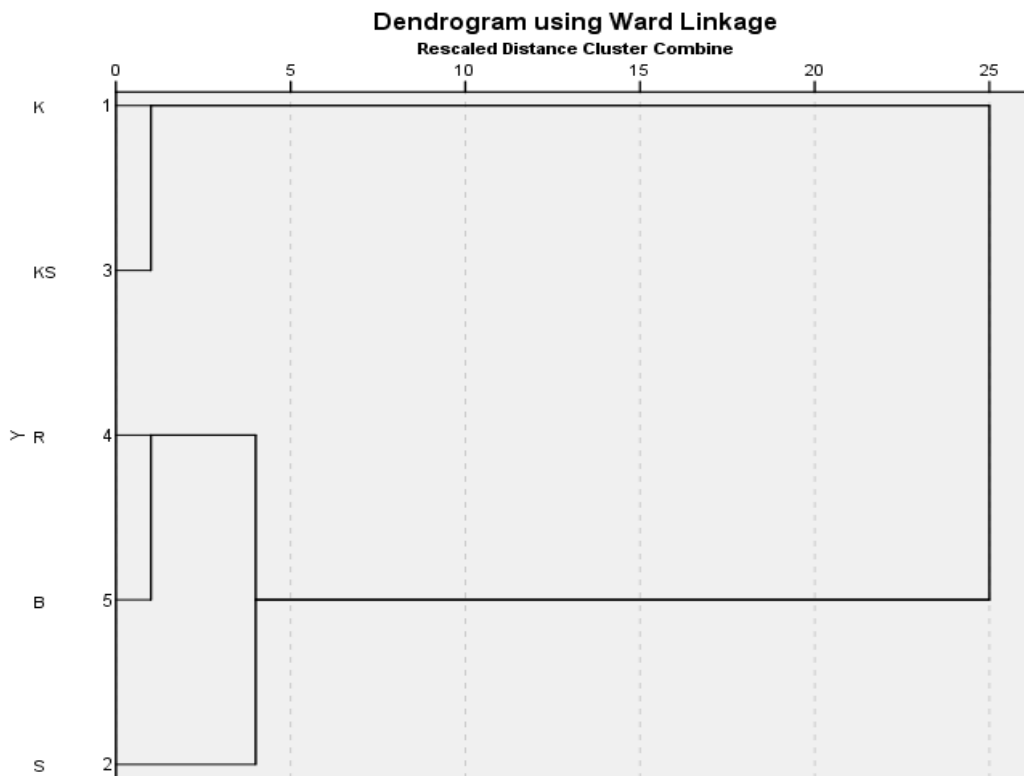
Hijerarhijski dendrogram baziran na koncentracijama teških metala u zemljištu/sedimentu (Slika 35.) pokazao je grupisanje lokacija u vidu dva glavna klastera – jedan izolovan za lokaciju S (sa najvišim nivoom Cu, što je verovatno značajno doprinelo dizajnu konkretnog dendrograma) i drugi, koji se sastojao od nekoliko pod-klastera u sledećem rasporedu: KS/B-R-K. Međutim, klasifikacije lokacija bazirane na sadržaju teških metala u izdancima biljaka, bile su potpuno različite (Slike 36. i 37.).

Dva uočljiva glavna klastera u svakom od dva "biljna" dendrograma bila su sastavljena od pod-klastera kao što sledi: S/B-R i KS-K za dendrogram baziran na koncentracijama teških metala u

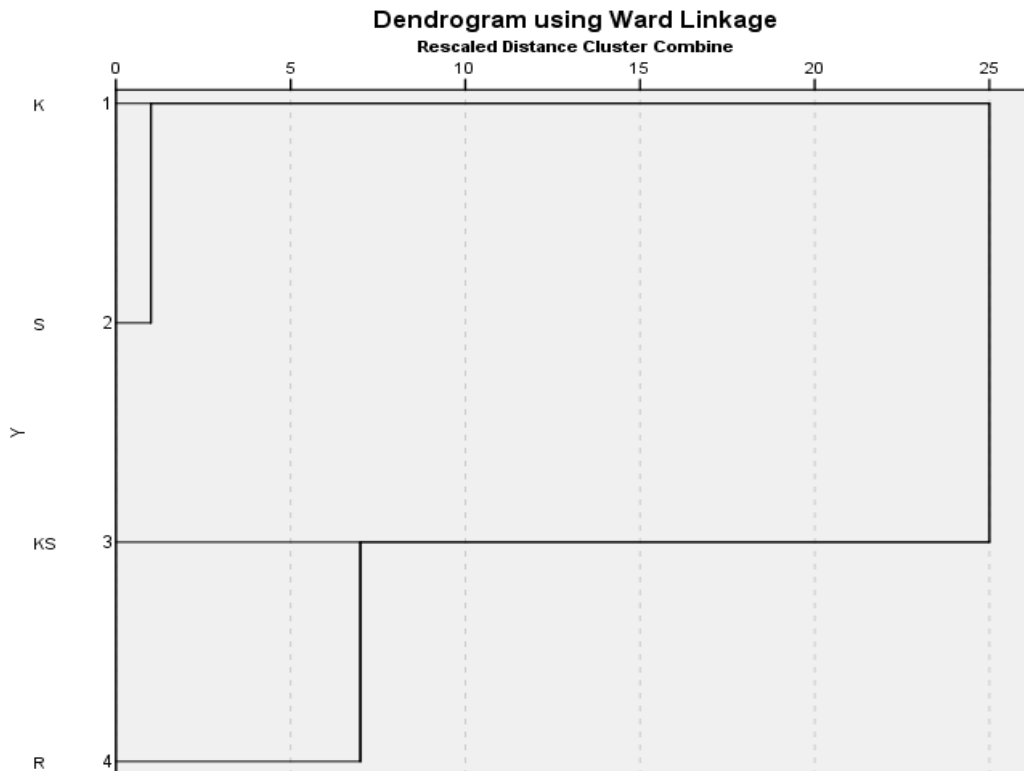
izdancima MS (Slika 36.) i R-KS i S-K za dendrogram na bazi teških metala u izdancima OK (Slika 37.).



Slika 35. Klasifikacija ispitivanih lokacija na hijerarhijskom dendrogramu baziranom na detektovanim koncentracijama teških metala u zemljištu/sedimentu



Slika 36. Klasifikacija ispitivanih lokacija na hijerarhijskom dendrogramu baziranom na detektovanim koncentracijama teških metala u mlečiki, MS



**Slika 37.** Klasifikacija ispitivanih lokacija na hijerarhijskom dendrogramu baziranom na detektovanim koncentracijama teških metala u koprivi, OK

Normalno, grupisanje lokacija u poslednjem dendrogramu (Slika 37.) predstavlja takođe i jednostavnu posledicu već objašnjenog odsustva biljaka OK na lokaciji B, što je dodatno ograničilo mogućnosti za potpuno adekvatno poređenje između aranžmana prikazanih na Slikama 36. i 37.

Međutim, istovremeno se može reći da, na neki način, postojeće razlike u dendrogramima baziranim na teškim metalima u različitim izdancima (Slike 36. i 37.) takođe predstavljaju normalnu posledicu različitih sposobnosti ispitivanih vrsta u pogledu upravljanja određenim metal(oid)ima (praktično, tokom njihove ekstrakcije/transfere/bioakumulacije). Tako na primer, primetno je da je najveća koncentracija svakog ispitivanog teškog metala (u izdancima), često bila pronađena u slučaju MS (posmatrajući svaku od 5 istraživanih lokacija, Tabela 11.), kao i da su najveće vrednosti izračunatih MR takođe bile pronađene u slučaju ove iste biljne vrste (Slika 34.); ovo može biti signal da generalno, MS ima bolji potencijal za fitoekstrakciju/fitoakumulaciju ispitivanih teških metala od OK, a posebno u pogledu Cu.

Da bi se dobili još pouzdaniji i informativniji podaci o potencijalima obe biljke, konačno je i Pearson-ova korelaciona analiza bila primenjena na ispitivane varijable, odnosno na detektovane koncentracije teških metala i merene parametre zemljišta/sedimenta (Tabele 13. i 14.), ali i na te iste koncentracije i udaljenosti mesta uzorkovanja od rudarsko-metalurškog kompleksa tj., topionice kao glavnog izvora atmosferskog zagađenja u regionu Bora (Tabela 15.).

Izračunati Pearson-ovi korelacioni koeficijenti dati u Tabeli 13., otkrili su da koncentracije ispitivanih teških metala u biljnim izdancima nisu bile toliko snažno zavisne od odgovarajućih koncentracija u zemljištu/sedimentu. Tačnije rečeno, iako je većina detektovanih koncentracija u izdancima bila u pozitivnim korelacijama sa odgovarajućim koncentracijama u zemljištu (i to često sa relativno povišenim vrednostima izračunatih Pearson-ovih koeficijenata korelacije), bilo je jasno da ove korelacije nisu bile na statistički značajnom, tj. pouzdanom nivou, što dalje implicira da se one i ne mogu tretirati kao pouzdane. Jedino je sadržaj As u izdancima MS bio u veoma jakoj pozitivnoj korelaciji sa zemljišnim As ( $p = 0,995^{**}$ , na nivou 0,01), što znači da su koncentracije As u izdancima rasle sa povećanjem koncentracije As u zemljištu (praktično - lokacije sa visokom koncentracijom As u zemljištu, takođe su imale i visok sadržaj As u analiziranim izdancima MS).

Zanimljivo je da je As u izdancima MS takođe bio u jakoj pozitivnoj korelaciji sa zemljišnim Pb ( $p = 0,996^{**}$ , na nivou 0,01). Snažne pozitivne korelacije su takođe bile prisutne u sledećim slučajevima: Cd u izdancima MS sa zemljišnim Pb ( $p = 0,909^*$ , na nivou 0,05) i zemljišnim As ( $p = 0,949^*$ , na nivou 0,05), kao i Zn u izdancima OK sa zemljišnim Cd ( $p = 0,971^*$ , na nivou 0,05). Ovo pokazuje da koncentracije u ispitivanim izdancima:

- 1) nisu bile u nekoj značajnijoj meri zavisne od odgovarajućih zemljišnih koncentracija i
- 2) da su neki teški metali bili u kompeticiji prilikom usvajanja putem korena (korelacije sa negativnim predznakom), a neki ne (korelacije sa pozitivnim predznakom).

Zanimljivo je i da su u slučaju MS, koncentracije Cd u izdancima bile u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama Zn u istim ( $p = 0,884^*$ , na nivou 0,05), kao i sa koncentracijama As ( $p = 0,916^*$ , na nivou 0,05); takođe, koncentracije Zn i Pb u istim izdancima snažno su korelirale među sobom ( $p = 0,947^*$ , na nivou 0,05). U slučaju koncentracija metala u OK izdancima, neke snažne pozitivne korelacije uočene su u sledećim slučajevima: za Zn i As ( $p = 0,965^*$ , na nivou 0,05) i za Pb i Cd ( $p = 0,976^*$ , na nivou 0,05). Konačno, kada su koncentracije detektovane u izdancima bile korelisane sa merenim parametrima zemljišta: pH, EC, OM, kao i zemljišnim P i N (Tabela 13.), bilo je jasno da nije bilo statistički značajnih korelacija, osim u dva slučaja, naime, u slučajevima parova varijabli: pH-Cu u izdancima MS ( $p = -0,974^{**}$ , na nivou 0,01) i EC-Cu u izdancima OK ( $p = 0,955^{**}$ , na nivou 0,01). Ovi nalazi su jasno pokazali da je kod fitoekstrakcije Cu, MS bila efikasna u kiselim zemljištima, odnosno najefikasnija na lokacijama sa najnižim pH (što bi se moglo reći i za ostale metale u MS), dok je OK bila najefikasnija na lokacijama sa najvećim vrednostima EC (situacija sa ostalim metalima je bila komplikovanija i ne tako uniformna). Takođe, bilo je jasno da su skoro sve koncentracije u izdancima bile u negativnoj korelaciji sa pH zemljišta, a u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem OM zemljišta, dok situacija sa EC zemljišta, kao i sa zemljišnim P i N nije bila tako jednostavna; kao zanimljiv detalj - zemljišni N je bio u pozitivnim korelacijama sa detektovanim koncentracijama svih metala u izdancima OK i u negativnim korelacijama sa koncentracijama teških metala u izdancima MS; ipak, kao što je pomenuto, sve ove poslednje navedene korelacije nisu bile na statistički pouzdanim nivoima.

**Tabela 13.** Pearson-ovi korelacioni koeficijenti za jačinu odnosa između detektovanih koncentracija teških metala u izdancima sa koncentracijama u zemljištu, ali i drugim merenim zemljišnim parametrima

Varijable	CuMS	ZnMS	PbMS	AsMS	CdMS	CuOK	ZnOK	PbOK	AsOK	CdOK
pH	<b>-0,974<sup>**</sup></b>	-0,546	-0,336	-0,688	-0,768	-0,065	-0,825	0,209	-0,698	0,081
OM	0,005	0,546	0,738	-0,084	0,102	0,942	-0,308	0,542	-0,484	0,658
EC	-0,236	0,145	0,423	-0,534	-0,324	<b>0,955<sup>**</sup></b>	-0,275	0,480	-0,470	0,615
PZ	-0,345	0,306	0,575	-0,355	-0,132	0,608	-0,777	0,127	-0,892	0,199
NZ	-0,635	-0,698	-0,633	-0,542	-0,777	0,123	0,384	0,865	0,490	0,755
CuZ	0,206	0,472	0,710	-0,285	0,083	0,783	-0,268	-0,023	-0,510	0,168
ZnZ	0,600	-0,126	-0,325	0,251	0,186	-0,219	0,946	-0,085	0,929	-0,048
PbZ	0,630	0,723	0,473	<b>0,996<sup>**</sup></b>	<b>0,909<sup>*</sup></b>	-0,193	0,654	0,593	0,788	0,476
AsZ	0,732	0,738	0,484	<b>0,995<sup>**</sup></b>	<b>0,949<sup>*</sup></b>	-0,315	0,932	-0,087	0,947	-0,076
CdZ	0,833	0,358	0,080	0,745	0,672	-0,155	<b>0,971<sup>*</sup></b>	0,001	0,948	0,040
CuMS	1	0,694	0,530	0,679	0,832					
ZnMS		1	<b>0,947<sup>*</sup></b>	0,702	<b>0,884<sup>*</sup></b>					
PbMS			1	0,439	0,697					
AsMS				1	<b>0,916<sup>*</sup></b>					
CdMS					1					
CuOK						1	0,021	0,597	-0,188	0,744
ZnOK							1	0,238	<b>0,965<sup>*</sup></b>	0,278
PbOK								1	0,227	<b>0,976<sup>*</sup></b>
AsOK									1	0,211
CdOK										1

\* - Korelacija je značajna na nivou 0,05 (dvostrani test); \*\* - Korelacija je značajna na nivou 0,01 (dvostrani test)

MS – mlečika

OK – kopriva

Z – zemljište

P – fosfor

N - azot

**Tabela 14.** Pearson-ovi korelacioni koeficijenti za jačinu odnosa između detektovanih koncentracija teških metala u zemljištu/sedimentu

Metali u zemljištu	Cu	Zn	Pb	As	Cd
Cu	1	-0,329	-0,266	-0,221	-0,330
Zn		1	0,166	0,260	0,829
Pb			1	<b>0,987**</b>	0,685
As				1	0,751
Cd					1

\* - Korelacija je značajna na nivou 0,05 (dvostrani test); \*\* - Korelacija je značajna na nivou 0,01 (dvostrani test)

**Tabela 15.** Pearson-ovi korelacioni koeficijenti za jačinu odnosa između detektovanih koncentracija teških metala u zemljištu, kao i u izdancima obe biljne vrste sa udaljenošću mesta uzorkovanja od rudarsko-metalurškog kompleksa, tj. od topionice u Boru

Udaljenost/Metali u ispitivanim matriksima	CuZ	ZnZ	PbZ	AsZ	CdZ
Udaljenost	0,373	-0,800	-0,703	-0,747	<b>-0,987**</b>
	CuMS	ZnMS	PbMS	AsMS	CdMS
Udaljenost	-0,773	-0,345	-0,063	-0,756	-0,639
	CuOK	ZnOK	PbOK	AsOK	CdOK
Udaljenost	0,085	<b>-0,994**</b>	-0,194	<b>-0,986*</b>	-0,214

\* - Korelacija je značajna na nivou 0,05 (dvostrani test); \*\* - Korelacija je značajna na nivou 0,01 (dvostrani test)

MS – mlečika  
OK – kopriva  
Z – zemljište

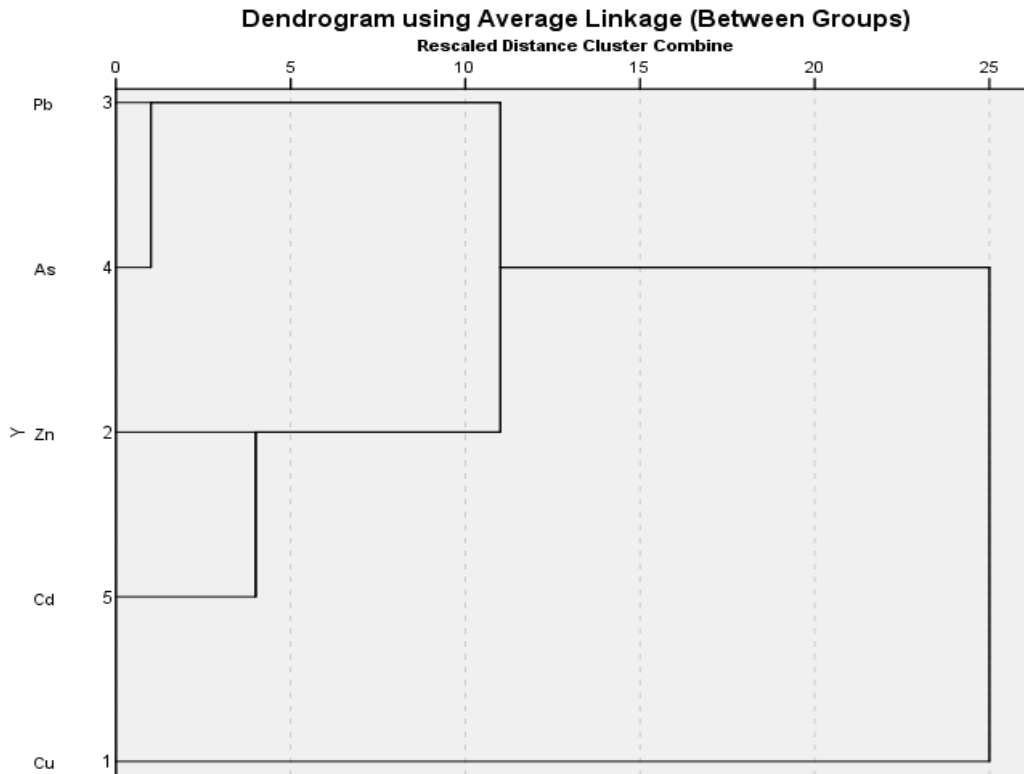
Iz Tabele 13. takođe je moguće uočiti da su koeficijenti za sve teške metale u MS imali pozitivan predznak, prilično visoke vrednosti, pa čak i da su neke od njih bile i na statistički značajnom nivou. Po mnogim autorima, ovakav trend (isti predznak, solidne, tj., srednje do visokih vrednosti koeficijenata, njihova statistička značajnost u dobrom broju slučajeva), ukazuje na zajedničko poreklo metala u ispitivanom matriksu (Alagić i sar. 2015a, 2019; Tošić 2016). U ovom, konkretnom slučaju, uočena situacija sugerira slično poreklo skoro svih ispitivanih metal(oid)a u MS (tj. ili zemljište/sediment, ili atmosfera), a naročito u slučajevima parova meta(oid)la kao što su: Zn-Pb, Zn-Cd i As-Cd.

Ovakva situacija, bila je prisutna i kod OK, ali izražena u mnogo manjoj meri (čak je odnos Cu i As bio sa negativnim predznakom) (Tabela 13.), tako da se u ovom slučaju svakako ne može sa sigurnošću tvrditi da svi teški metali imaju zajedničko poreklo (tj. ili zemljište/sediment, ili atmosfera). Kod OK, po vrednostima Pearson-ovih koeficijenata, moglo bi se reći da su, po poreklu, najbliži bili parovi metal(oid)a Zn-As, a zatim Pb-Cd.

Situacija sa teškim metalima u zemljištu/sedimentu bila je raznolika, mada ipak i sa izvesnim pravilnostima (Tabela 14.). Pošto je činjenica da su uzorci MS imali više mernih mesta (5), od OK (4), to su koncentracije u uzorcima sa svih 5 mernih mesta bile uzete u razmatranje prilikom izračunavanja odgovarajućih Pearson-ovih koeficijenata. Svi izračunati Pearson-ovi koeficijenti za Cu u zemljištu imali su negativan predznak u odnosima sa ostalim metalima (u zemljištu/sedimentu) i takođe su imali niske vrednosti kao što sledi: za odnos Cu-Zn, vrednost  $p$  je bila  $p = -0,329$ , za Cu-Pb,  $p = -0,266$ , za Cu-As,  $p = -0,221$  i za Cu-Cd,  $p = -0,330$ . Ovaj generalni trend, iako sa niskim vrednostima  $p$ , može da predstavlja jedan slab signal da je poreklo Cu u zemljištu/sedimentu drugačije od ostalih metala. Kada je u pitanju Zn, on je sa svim ostalim metalima (osim Cu, naravno) bio u pozitivnim, ponekad čak i visokim korelacijama: Zn-Pb,  $p = 0,166$ , Zn-As,  $p = 0,260$  i Zn-Cd,  $p = 0,829$ , što bi moglo da ukaže na njihovo zajedničko poreklo. Korelacije za ostale teške metale u zemljištu takođe su bile pozitivnog predznaka i sa visokim vrednostima: za Pb-As,  $p = 0,987**$ , na nivou 0,01, za Pb-Cd,  $p = 0,685$  i za As-Cd,  $p = 0,751$ , što ukazuje, sa priličnom sigurnošću, da su ovi metal(oid)i bili najbližijeg porekla, a naročito u slučaju para Pb-As.

Da su prethodno izneta zapažanja o zajedničkom, ili različitom poreklu teških metala u ispitivanim matriksima (tj. u zemljištu/sedimentu, izdanku MS i izdanku OK) logična, može se

videti i iz hijerarhijskih dendrograma (Slike 38-40., respektivno) dobijenih primenom metode povezivanja srednjih vrednosti između grupa sa Pearson-ovom korelacijom kao mernim intervalom (Alagić i sar. 2015a, 2019). Metoda je primenjena na varijable kao što su udaljenosti samih mesta uzorkovanja od rudarsko-metalurškog kompleksa, tj. topionice u Boru, kao najvećeg izvora zagađenja teškim metalima u celom regionu i detektovanih koncentracija u zemljištu i to posmatrajući svih 5 mesta uzorkovanja.

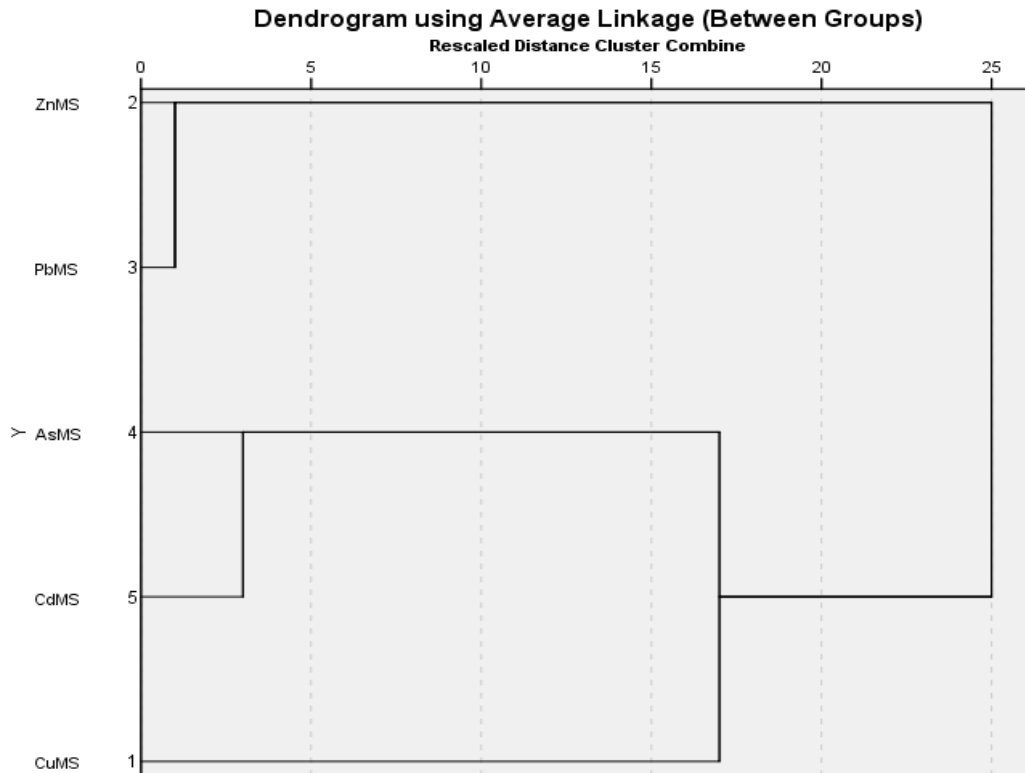


**Slika 38.** Hijerarhijski dendrogram za teške metale u zemljištu/sedimentu

S obzirom da su ovde Pearson-ove korelacije, kao merni intervali, ukazale na izrazito uočljive razlike, tj. udaljenosti, između zemljišnog Cu i ostalih teških metala u ovom ispitivanom matriksu (Slika 38.), onda je jasna i pojava jednog izolovanog glavnog klastera za Cu i drugog glavnog klastera za ostale metal(oid)e u grupisanju kao što sledi: prvi podklaster Zn-Cd i drugi podklaster Pb-As, što sve podržava prethodno razmatranje i pretpostavku o različitom poreklu Cu u odnosu na druge ispitivane metale. Na osnovu udaljenosti tj. mernih intervala na samom dendrogramu, kao i na osnovu rezultata Pearson-ove studije za odnose između udaljenosti samih mesta uzorkovanja od rudarsko-metalurškog kompleksa, tj. topionice u Boru i detektovanih koncentracija u zemljištu (Tabela 15.), moglo bi se pretpostaviti da se poreklo Cu u ispitivanim uzorcima zemljišta/sedimenta, najmanje može pripisati zagađenju koje dolazi iz atmosfere, tj. topionice, a najviše samoj geologiji i delimično, eventualnom antropogenom zagađenju koje potiče od povremenih izlivanja zagađenih vodotokova/površina, dok su ostali metali predominantno antropogenog porekla (pre svega atmosferskog, iz topionice, a tek zatim i poreklom od izlivanja zagađenih voda), ali i jednim manjim delom prirodnog, tj. geološkog porekla. Vrednosti Pearson-ovih koeficijenata iz Tabele 15. ukazuju da je jedino zemljišni Cu bio u (slabijoj) pozitivnoj korelaciji sa udaljenošću od rudarsko-metalurškog kompleksa ( $p = 0,373$ , Tabela 15.), dok su svi ostali metal(oid)i bili srednje do visoko negativno korelisani sa ovim parametrom, što praktično znači da se glavni izvor zagađenja u Boru i okolini ne može smatrati i glavnim izvorom Cu prisutnog u ispitivanim uzorcima zemljišta/sedimenta, dok su ostali teški metali u značajnoj meri poticali upravo iz ovog izvora a naročito Cd, jer je odgovarajuća  $p$  vrednost u ovom slučaju bila i na

statistički značajnom nivou,  $p = -0,987^{**}$  (na nivou 0,01, Tabela 15.); praktično, sa udaljenošću od topionice, smanjivao se i sadržaj Zn, Pb, As i Cd u zemljištu.

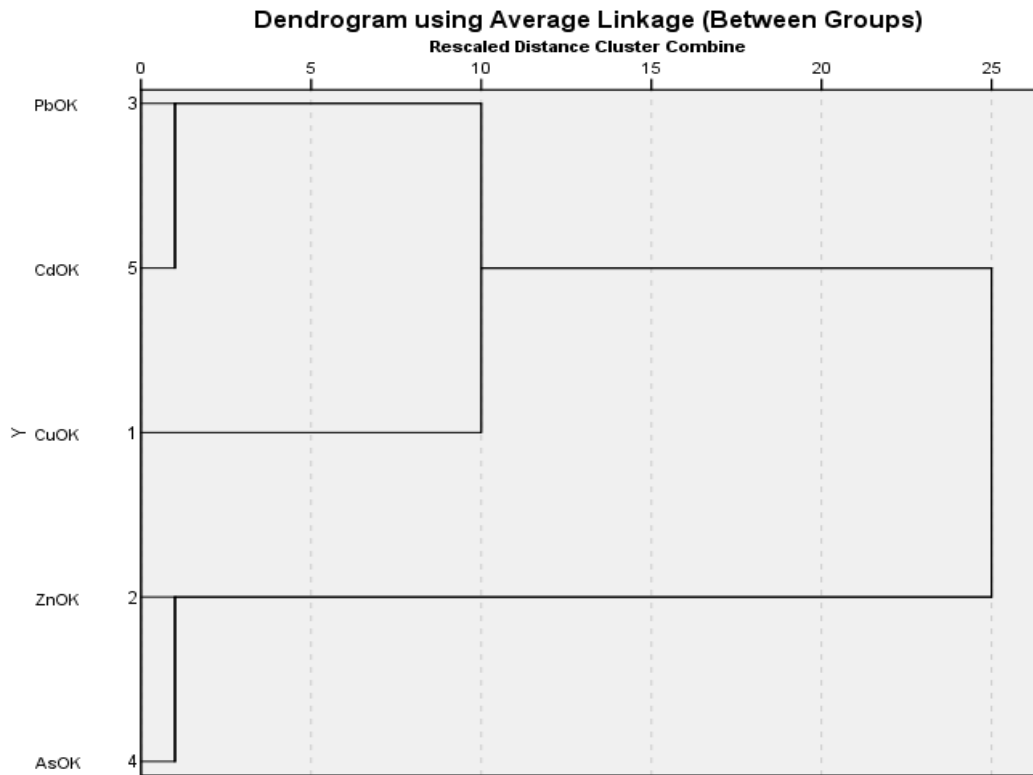
Analogni pristup za teške metale u mlečiki, MS, kao i odgovarajući hijerarhijski dendrogram (Slika 39.) ukazuju da je ova biljka usvajala metal(oid)e pre svega iz atmosfere (tj. preko listova). Svi Pearson-ovi koeficijenti za MS iz Tabele 15. bili su sa negativnim predznakom (opet sa značenjem - sa udaljenošću od topionice, smanjivao se i sadržaj navedenih elemenata). Iako ove korelacije nisu bile na statistički značajnom nivou, ipak, ovaj generalni trend negativnih korelacija, sugerše da je poreklo teških metala u izdancima MS, bilo najviše u vezi sa otpadnim gasovima emitovanim iz topionice, pri čemu su prednjačili: Cu, As i Cd (sa najvećim negativnim p vrednostima i činioci prvog glavnog klastera na Slici 39.). Ovde se mora napraviti izuzetak za slučajeve efikasnog usvajanja Cu iz kisele podloge, tj. zemljišta/sedimenta.



**Slika 39.** Hijerarhijski dendrogram za teške metale u mlečiki, MS

Interesantno je da je hijerarhijski dendrogram za teške metale u koprivi, OK (Slika 40.), pokazao drugačije grupisanje, na osnovu kojeg se može pretpostaviti da je ova biljka iz atmosfere, odnosno iz otpadnih gasova iz topionice, usvajala pre svega Zn i As (koji su imali najveće negativne vrednosti Pearson-ovih koeficijenata i to na statistički značajnom nivou,  $p = -0,994^{**}$ , na nivou 0,01 i  $p = -0,986^{**}$ , na nivou 0,01, respektivno i koji su takođe bili činioci prvog glavnog klastera na odgovarajućem dendrogramu, na Slici 40.), dok su metali Cd i Pb imali veoma niske negativne korelacije, a Cu je čak bio u blagoj pozitivnoj korelaciji sa udaljenošću (Tabela 15.). Ovo ukazuje da je najveći deo Cu u OK sa izabranih mesta u Borskom regionu bio pre svega poreklom iz podloge na kojoj su biljke rasle, a najmanje poreklom iz atmosfere. U skladu sa ovim razmatranjem, Cd i Pb činili su jedan, a Cu drugi podklaster u drugom glavnom klasteru na Slici 40. Za Cd i Pb se može smatrati da su najverovatnije poticali iz oba izvora, tj. i iz zemljišta/sedimenta i iz atmosfere i to u prilično ujednačenoj meri.





**Slika 40.** Hijerarhijski dendrogram za teške metale u koprivi, OK

## 5.1 Rezultati za mlečiku i koprivu iz Oštrelja sa kraćom diskusijom

Konačno, kao što je već naglašeno, na kraju ove disertacije, prikazani su i rezultati detektovanih koncentracija i izračunatih MR vrednosti za biljke MS i OK iz Oštrelja (Tabela 17.) (Petrović i sar. 2019). Kao i kod svih drugih ispitivanih lokacija, pokazalo se da je i u ovom slučaju, najobilniji element u svim matricama bio Cu. Zemljišne koncentracije ovog metala su i u slučaju Oštrelja bile iznad prosečnih vrednosti u svetu, kao i iznad LV- i RV-vrednosti definisanih srpskim i evropskim zakonodavstvima (Sl. glasnik RS, 30/2018; European Communities Council, 1986), a takođe su bile i u okviru fitotoksičnih opsega (Tabela 17.). Što se ostalih teških metala tiče, svi su imali povišene vrednosti koncentracija u odnosu na prosečne vrednosti u svetu, ali niže od onih graničnih vrednosti koje su propisane zakonskim regulativama (Sl. glasnik RS, 30/2018; European Communities Council, 1986); one su takođe bile niže i od datih fitotoksičnih opsega (Tabela 17.).

Kada su u pitanju biljne koncentracije, situacija sa Cu se ponovila, jer je to bio najobilniji metal u izdancima obe biljne vrste i takođe su njegove koncentracije prevazišle normalne vrednosti u biljkama, kao i odgovarajuće fitotoksične nivoe (Tabela 17.). Ostali metal(oidi) bili su prisutni u izdancima na relativno sličan način kao i kod izdanaka sa ostalih lokacija, tj. bili su prisutni u normalnim količinama, osim u pojedinim slučajevima, među kojima se naročito isticao As. Ovaj metaloid bio je prisutan u biljkama u povišenim koncentracijama, koje su ponekad bile i u rangu fitotoksičnih (Tabela 17.).

Ono što je najvažnije je da su vrednosti izračunatih MR za sve teške metale, osim za Cu u MS, u biljkama iz Oštrelja, bile veoma niske, što je sve takođe, u najvećem broju slučajeva, bilo veoma slično sa biljkama sakupljenim na ostalim lokacijama (Tabela 17.). Vrednost MR za Cu u MS iz Oštrelja je čak bila najveća izračunata u ovom radu, što još jednom ukazuje na poseban afinitet MS prema ovom metalu.

**Tabela 17.** Koncentracije teških metala u zemljišnim i biljnim uzorcima (mg/kg) iz Oštrelja\* sa odgovarajućim MR vrednostima (Petrović i sar. 2019)

Mesto O / Metal(oid)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Pb (mg/kg)	As (mg/kg)	Cd (mg/kg)
<b>Zemljište</b>					
	297,65 ± 0,44	76,32 ± 1,72	34,36 ± 1,90	18,31 ± 0,51	0,50 ± 0,09
<b>Mlečika</b>					
	790,30 ± 0,11	48,32 ± 1,42	11,34 ± 1,81	2,90 ± 0,19	0,23 ± 0,06
<b>MR</b>	2,65	0,63	0,33	0,16	0,46
<b>Kopriva</b>					
	98,42 ± 0,83	21,59 ± 1,24	3,93 ± 1,50	0,87 ± 0,09	0,05 ± 0,01
<b>MR</b>	0,33	0,28	0,11	0,05	0,1

\* – Podaci za koncentracije metala prezentovani su kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD) za merenja u triplikatu

## 6. Zaključak

Literaturni podaci prezentovani u ovom radu pokazali su da je, tokom poslednjih decenija, nova, takozvana "zelena" tehnologija, poznata kao fitoremedijacija, uvedena u praksu kao relativno jednostavna, jeftina i ekološka metoda. Ona se može primeniti kako na zagađenu vodu i vazduh, tako i na zemljište, kao jedan veoma važan, ali i praktično neobnovljivi prirodni resurs. Kada je zemljište u pitanju, fitoremedijacija, iako dugotrajni proces, može potpuno da ukloni, ili bar da imobilizuje teške metale na velikim kontaminiranim površinama i to na vrlo efikasan i bezbedan način, popravljajući istovremeno fizičke, hemijske i biološke karakteristike tretirane podloge. Pri tome, najzastupljenije metode fitoremedijacije zemljišta su fitoekstrakcija i fitostabilizacija. Kada je u pitanju biomonitoring, biljke se pre svega primenjuju u smislu praćenja zagađenja vazduha, a u mnogo manjem stepenu i za zagađenje zemljišta. Da bi se fitoremedijacione i biomonitoring procedure ispravno i tačno planirale, a pre svega da bi se ispitali biljni potencijali u odnosu na obe pomenute metode, u pregledu literature je takođe istaknuto da je neophodno primeniti kvalitetne i precizne instrumentalne tehnike hemijske analize, kojima će se koncentracije teških metala u biljnom, ili zemljišnom materijalu što tačnije odrediti, a zatim i obraditi odgovarajućim statističkim metodama. U ove svrhe, najčešće se koristi takozvani hemometrijski pristup koji predstavlja primenu matematike i statistike na poljima hemije, biohemije, ali i drugih nauka. Vrlo je važno naglasiti da je, pri izboru adekvatne statističke metode neophodno tačno prepoznavanje tipova podataka, jer ono dalje diktira odgovarajući tip statističke analize i testova koje treba primeniti, tako da je veoma značajno da istraživač bude dobro upućen u samu metodologiju rada sa različitim statističkim metodama, a zatim da dobro odredi ciljeve svoje studije i da onda pravilno primeni odgovarajuće metode. Posmatrano sa aspekta fitoremedijacije i biomonitoringa, najčešće primenjivane metode hemijske analize su neke od spektroskopskih metoda kao što su ICP-OES i ICP-MS, dok su statističke metode obično: Pearson-ova korelaciona studija, One-Way- (ili Two-way-) ANOVA, HCA i PCA.

Na generalnom nivou, hemometrijski pristup primenjen u konkretnoj disertaciji, u kombinaciji sa izračunavanjem odgovarajućih faktora bioakumulacije, otkrio je brojne zanimljive i važne detalje o autentičnim biomonitoring i fitoekstrakcionim potencijalima obe ispitivane biljne vrste, tj. MS i OK, pružajući veoma korisne informacije o nivou prisustva teških metala u svim vrstama analiziranih uzoraka iz odabranog dela životne sredine i ujedno pružajući još jedan dokaz da se generalno, ovakav pristup zaista može preporučiti za ovakvu i svaku drugu, sličnu vrstu istraživanja.

Konkretno, navažniji rezultati ove doktorske disertacije su sledeći:

- 1) Na prvom mestu, kao rezultat ove disertacije, pronađena je i ispitana biljka, tj. mlečika suncogled, MS, za koju ranije nisu postojali literaturni podaci vezano za njene praktične fitoremedijacione i biomonitoring potencijale.
- 2) Kada su u pitanju uzorci zemljišta/sedimenta, koji su bili ispitivani u ovoj disertaciji, rezultati statističke metode One-way ANOVA, obezbedili su dokaze da su koncentracije svakog pojedinog zemljišnog metal(oid)a značajno varirale, osim u slučaju Cd, gde su koncentracije samo minimalno varirale. Rezultati ove disertacije su takođe obezbedili i dokaze o izuzetno visokim koncentracijama Cu u svim uzorcima zemljišta/sedimenta prikupljenim u Boru i njegovoj najbližoj okolini; što je najvažnije, ove koncentracije bile su mnogo veće od odgovarajućih LV- i RV-vrednosti i takođe su bile u opsegu fitotoksičnih (zemljišnih) koncentracija. Fitotoksične koncentracije su takođe bile dostignute u slučaju zemljišnog As na mestima R i B (u UI zoni); i ovom slučaju, odgovarajući LV i RV, su takođe bili prevaziđeni i to u velikoj meri. Na istim UI lokacijama, odgovarajući LV i RV za Zn (lokacija R), Pb (lokacija B) i Cd (oba mesta) su takođe bili prevaziđeni. Sve ostale

koncentracije (u zemljištu/sedimentu) nisu bile na nivoima koji bi se mogli smatrati povišenim, ili alarmantnim.

3) Ovi rezultati su dalje sugerisali da, generalno, najveća opasnost za sve žive organizme, a posebno za prisutnu vegetaciju, može doći od zemljišnog Cu (na svim istraživanim lokalitetima), a zatim i As (na lokalitetima iz UI zone). Uprkos ovoj činjenici, obe ispitivane biljke su uspešno rasle na svojim prirodnim staništima, bez ispoljavanja ikakvih vidljivih simptoma toksičnosti Cu, ili As, što ih preporučuje kao perspektivne kandidate u obnavljanju vegetacije na problematičnim lokacijama. Štaviše, obe biljne vrste bile su u stanju da tolerišu izuzetno visoke koncentracije Cu u svojim izdancima; praktično, u izdancima, ovaj element je bio najzastupljeniji i sve detektovane koncentracije bile su na nivou fitotoksičnosti. Fitotoksične koncentracije su takođe bile otkrivene u nekoliko slučajeva za As i u većini slučajeva za Pb. Sve ostale koncentracije metala u izdancima, bile su na normalnim nivoima, a redosled obilnosti bio je sledeći  $Cu > Zn > Pb > As > Cd$  (za svaku biljnu vrstu, na svakoj lokaciji). One-way ANOVA je dodatno pokazala veliki broj statistički značajnih razlika između detektovanih koncentracija pojedinih metal(oid)a u obe biljke. Najmanje statistički značajnih razlika (kod obe biljke) nađeno je u slučaju Cd i naročito As.

4) Najčešće, najveća koncentracija svakog pojedinog metal(oid)a u ispitivanim izdancima, bila je pronađena u slučaju MS (na svakoj lokaciji), što je ukazalo da generalno, ova biljna vrsta može razviti efikasnije mehanizme za usvajanje i akumulaciju metala (preko lista, ili putem korena) od OK, a posebno u pogledu Cu. Međutim, generalno posmatrano, sposobnosti obe ispitivane biljke za usvajanje preko korena, tj. iz zemljišta/sedimenta nisu bile na nekim značajnijim nivoima, jer su vrednosti većine izračunatih MR bile mnogo niže od 1. Najefektniji rezultati uočeni su u slučaju Cu u MS sa UI lokacija, R i B, gde su detektovane koncentracije u izdancima bile iznad nivoa odgovarajućih koncentracija u zemljištu ( $MRs > 1$ ); one su takođe bile iznad nivoa koji je karakterističan za biljke hiperakumulatore, što je posebno interesantno za fitoremedijaciju, praktično, fitoekstrakciju. S obzirom da su obe UI lokacije bile okarakterisane i niskim vrednostima pH zemljišta, bilo je jasno da je MS bila najefikasnija u ekstrakciji Cu u okolnostima kiselog zemljišta, što je dodatno bilo potvrđeno i rezultatima izvedene Pearson-ove korelacione studije, dok je OK bila najefikasnija na lokacijama sa najvećim vrednostima EC (situacija sa ostalim metalima nije bila tako uniformna i jednostavna). Takođe, bilo je jasno da su koncentracije skoro svih ispitivanih metal(oid)a u izdancima bile u negativnoj korelaciji sa pH zemljišta, a u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem OM, dok je situacija sa EC zemljišta, kao i sa zemljišnim P i N bila komplikovanija; kao zanimljiv detalj - zemljišni N je bio u pozitivnim korelacijama sa detektovanim koncentracijama svih metal(oid)a u izdancima OK i u negativnim korelacijama sa koncentracijama metal(oid)a u izdancima MS; ipak, poslednje pomenute korelacije nisu bile na statistički značajnim nivoima. Rezultati iste statističke metode takođe su potvrdili da koncentracije metal(oid)a u izdancima nisu uvek bile u pozitivnim korelacijama sa odgovarajućim koncentracijama u zemljištu (osim u slučaju As u MS, gde je otkrivena jaka pozitivna korelacija sa zemljišnim As), ali su zato bile u značajnim pozitivnim korelacijama sa nekim drugim zemljišnim metal(oid)ima: As-Pb, As-Cd i Cd-Pb kod MS i Zn-Cd kod OK, što sve ukazuje da, u većini slučajeva, koncentracije metal(oid)a u izdancima nisu bile u nekoj značajnijoj meri zavisne od odgovarajućih zemljišnih koncentracija, kao i da su neki metali bili u kompeticiji pri usvajanju preko korena (korelacije sa negativnim predznakom), a neki ne (korelacije sa pozitivnim predznakom). Ovo u konačnom sugerise da su obe biljne vrste usvajale metal(oid)e pre svega u skladu sa svojim individualnim potrebama i takođe, sve ovo ide u prilog opšte poznate činjenice da biljke usvajaju metal(oid)e ne samo preko korena, već i preko lista.

5) Isti nalazi dalje predstavljaju indicaciju da su obe biljne vrste, u slučajevima izuzetno visokih (praktično - opasnih) zemljišnih koncentracija, za većinu metal(oid)a, usvojile strategiju njihovog ograničenog usvajanja (preko korena). U suštini i pored svih razlika u usvajanju i akumulaciji teških metala između dve različite ispitivane biljne vrste (koje su se uočile kroz primenjene metode), na osnovu veoma niskih vrednosti MR ( $< 1$ ), može se reći da su se, u odnosu na većinu teških metala, obe biljne vrste, ponašale kao tolerantne, ali nehiperakumulatorske vrste, a moguće čak i kao ekskluderi.

6) Dobijeni rezultati, uključujući i rezultate HCA uz primenu Ward-ove metode, koji se odnose na klasifikaciju lokacija po zagađenosti, takođe su potvrdili da izdanci obe ispitivane biljke ne mogu tačno da odraze postojeće stanje u zemljištu, što ih dalje ne može preporučiti kao precizno sredstvo u biomonitoringu zagađenja zemljišta.

7) Međutim, u slučaju zagađenja atmosferskog porekla, obe vrste mogu biti od koristi, jer su rezultati HCA sa primenjenom metodom povezivanja srednjih vrednosti između grupa, pokazali da obe biljne vrste imaju veoma dobar potencijal da odraze poreklo teških metala u svojim izdancima (tj., predominantno iz - zemljišta/sedimenta, ili pak - atmosfere), pa su tako pružile i jednu adekvatnu ilustraciju opšteg stepena zagađenosti u konkretnoj oblasti, u konkretno vreme (uzorkovanja), što znači da one mogu poslužiti kao pouzdano sredstvo u skriningu zagađenja jednog sezonskog i pre svega atmosferskog karaktera, praktično tokom kompletnog vegetacionog perioda i u osnovi, za procenu generalnog kvaliteta životne sredine. Ova poslednja metoda je takođe pružila uvid i u moguće izvore metala u ispitivanoj oblasti, tako da je kombinacija ove poslednje pomenute vrste HCA i izračunavanja Pearson-ovih koeficijenata, uspešno ukazala:

- da je poreklo Cu u uzorcima zemljišta/sedimenta, najrazličitije u odnosu na ostale ispitivane teške metale, kao i da se najmanje može pripisati zagađenju koje dolazi iz atmosfere, a pre svega iz topionice kao glavnog izvora ove vrste zagađenja u regionu Bora; poreklo Cu u zemljištu/sedimentu je predominantno prirodno, tj. geološko, ali svakako manjim delom potiče i od povremenih izlivanja zagađenih voda iz neposredne blizine; ostali teški metali su takođe različitog porekla – i geološkog i antropogenog, ali pre svega atmosferskog, pa tek zatim i poreklom od izlivanja zagađenih voda,

- da je poreklo teških metala u izdancima MS bilo najviše u vezi sa otpadnim gasovima emitovanim iz topionice, pri čemu su prednjačili metali kao što su: Cu, As i Cd, što praktično znači da je MS usvajala metal(oid)e pre svega iz atmosfere (tj. preko listova), a manjim delom iz podloge (osim u slučaju kiselog zemljišta za Cu) i

- da su izdanci OK, iz atmosfere usvajali pre svega Zn i As (najvećim delom), dok su metali Cd i Pb verovatno poticali iz oba izvora, tj. i iz podloge i iz atmosfere (i to prilično ujednačeno); najveći deo Cu u OK sa izabranih mesta u Borskom regionu bio je poreklom iz podloge na kojoj su biljke OK rasle.

## Literatura

Alagić, S.Č., Šerbula, S.S., Tošić, S.B., Pavlović, A.N., Petrović, J.V. 2013. Bioaccumulation of Arsenic and Cadmium in Birch and Lime from the Bor Region. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 65(4):671-682.

Alagić, S.Č. 2014. Strategije biljaka u borbi protiv fitotoksičnih koncentracija metala kao ključni preduslov uspješne fitoremedijacije: Ćelijski mehanizmi. deo I / Plants strategies against metal phytotoxicity as a key prerequisite for an effective phytoremediation: Cellular mechanisms. part I. *Zaštita materijala/Materials protection* 55(3):313-322.

Alagić, S.Č., Nujkić, M.M., Dimitrijević, D.M. 2014. Strategije biljaka u borbi protiv fitotoksičnih koncentracija metala kao ključni preduslov uspješne fitoremedijacije: Ekskluderi i hiperakumulatori, deo II / Plants strategies against metal phytotoxicity as a key prerequisite for an effective phytoremediation: Excluders and hyperaccumulators, part II. *Zaštita materijala/Materials protection* 55(4):435-440.

Alagić, S.Č., Tošić, S.B., Dimitrijević, M.D., Antonijević, M.M., Nujkić, M.M. 2015a. Assessment of the quality of polluted areas based on the content of heavy metals in different organs of the grapevine (*Vitis vinifera*) cv Tamjanika. *Environmental Science and Pollution Research* 22(9):7155-7175.

Alagić, S.Č., Maluckov, B.S., Radojičić, V.B. 2015b. How can plants manage polycyclic aromatic hydrocarbons? May these effects represent a useful tool for an effective soil remediation? A review. *Clean Technologies and Environmental Policy* 17(3):597-614.

Alagić, S.Č., Tošić, S.B., Dimitrijević, M.D., Petrović, J.V., Medić, D.V. 2016. The characterization of heavy metals in the grapevine (*Vitis vinifera*) cultivar Rkatsiteli and wild blackberry (*Rubus fruticosus*) from East Serbia by ICP-OES, and BAFs. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47(17):2034-2045.

Alagić, S.Č., Tošić, S.B., Dimitrijević, M.D., Petrović, J.V., Medić, D.V. 2017. Chemometric evaluation of trace metals in *Prunus persica* L. Batech and *Malus domestica* from Minićevo (Serbia). *Food Chemistry* 217:568-575.

Alagić, S.Č., Stević, Z.M., Jovanić, P.B., Morić, I., Jeremić, S., Popara, Lj.B. 2018a. The characterization of the selected trees damaged during severe weather episode on the mountain Avala (Serbia) using IR thermography, ICP-OES, and microbiological analysis. *International Journal of Environmental Research* 12(2):135-146.

Alagić, S.Č., Tošić, S.B., Dimitrijević, M.D., Nujkić, M.M., Papludis, A.D., Fogl, V.Z. 2018b. The content of the potentially toxic elements. iron and manganese in the grapevine cv Tamjanika growing near the biggest copper mining/metallurgical complex on the Balkan peninsula: Phytoremediation, biomonitoring, and some toxicological aspects. *Environmental Science and Pollution Research* 25(34):34139-34154.

Alagić, S.Č., Nujkić, M.M., Tošić, S.B., Milić, S.M., Dimitrijević, M.D. 2019. Heavy Metal Pollution in the Region of Bor (Serbia) Resulting from the Long-Term Copper Mining and Metallurgical Activities: The Evidence Recorded in Plant Organs and Implications for Biomonitoring and Phytoremediation as Two Prospective Environmentally-Friendly Methods of Pollution Control. in Serbia: Current Issues and Challenges in the Areas of Natural Resources. Agriculture and Environment. Ed. Janev, I., New York. Nova Science Publishers US. pp. 301-356.

Alagić, S.Č. 2022. Prisustvo potencijalno toksičnih metala u regionu Bora (istočna Srbija): Biljni zapis. Urednik: dr Milan Trumić; Tehnički fakultet u Boru. Univerziteta u Beogradu.

Al-Khashman, O.A., and Shawabkeh R.A. 2006. Metals distribution in soils around the cement factory in southern Jordan. *Environmental Pollution* 140: 387–394.

Alloway, B.J. 2013. Heavy Metals in Soils. Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. Environmental Pollution (22), third edition. Springer New York. doi: 10.1007/978-94-007-4470-7

Antonijević, M.M., Dimitrijević, M.D., Milic, S.M., Nujkić, M.M. 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* 14:866-877.

Araujo, G.C.L., Gonzalez, M.H., Ferreira, A.G., Nogueira, A.R.A., Nobrega, J.A. 2002. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B* 57:2121–2132.

ASŽS Bor, 2006. Analiza stanja životne sredine od šteta nastalih kao posledica prethodnog rada RTB Bor. - Finalni izveštaj. Fideco d.o.o.. ERM's Milan Office. Dostupno na: [http://www.digitalnizavicaj.org.rs/pdf/texts/170/Analiza\\_stanja\\_zivotne\\_sredine\\_Borpdf.pdf](http://www.digitalnizavicaj.org.rs/pdf/texts/170/Analiza_stanja_zivotne_sredine_Borpdf.pdf).

Bačeva, K., Stafilov, T., Šajin, R., Tănăselia, C., Makreski, P. 2014. Distribution of chemical elements in soils and stream sediments in the area of abandoned Sb–As–Tl Allchar mine. Republic of Macedonia. *Environmental Research* 133:77–89.

Barbosa, J.T.P., Santos, C.M.M., Peralva, V.N., Flores, E.M.M., Korn, M., Nobrega, J.A., Korn, M.G.A. 2015. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. *Food Chemistry* 175:212–217.

Bhaduri, A.M., and Fulekar, M.H. 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 11:55–69.

Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S. 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. Review. *Journal of Environmental Management* 105:103-120.

Boyd, R.S. 2007. The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil* 293:153-176.

Calzoni, G.L., Antognoni, F., Pari, E., Fonti, P., Gnes, A., Speranza, A. 2007. Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants. *Environmental Pollution*, 149: 239-245.

“Chemometrics.” *Merriam-Webster.com Dictionary*. Merriam-Webster. Dostupno na <https://www.merriam-webster.com/dictionary/chemometrics>

- Cvijović, M.R. 2013. Ispitivanje reakcija hidrolize i kompleksiranja u rastvorima aluminijum(III)-jona i nekih fluorohinolona metodom elektrosprej-tandem masene spektrometrije. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet. Doktorska disertacija
- Cunningham, S.D., and Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715–19.
- Dermience, M., Li, X.W., Mathieu, F., Claus, W., De Maertelaer, V., Yangzom, D., Lognay, G. 2014. Minerals and trace elements in traditional foods of rural areas of Lhasa Prefecture. Tibet Autonomous Region (P.R. China). *Journal of Food Composition and Analysis* 35:67–74.
- Dimitrijević, M., Kostov, A., Tasić, V., Milosević, N. 2009. Influence of pyrometallurgical copper production on the environment. *Journal of Hazardous Materials* 164: 892-899.
- Dimitrijevic, M., Nujkic, M., Alagic, S., Milic, S., Tosic, S. 2016. Heavy metal contamination of topsoil and parts of peach-tree growing at different distances from a smelting complex. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13:615–630.
- Dmuchowski, W., and Bytnerowicz, A. 2009. Long-term (1992–2004) record of lead, cadmium, and zinc air contamination in Warsaw. Poland: Determination by chemical analysis of moss bags and leaves of Crimean lime. *Environmental Pollution* 157:3413-3421.
- DONICI, A., BUNEA, C.I., CĂLUGĂR, A., HARSAN, E., BORA, F.D. 2019. Investigation of the Copper Content in Vineyard Soil, Grape, Must, and Wine in the Main Vineyards of Romania: a Preliminary Study. *Bulletin UASVM Horticulture* 76(1):31-46.
- Du, P., Xie, Y., Wang, S., Zhao, H., Zhang, Z., Wu, B., Li, F. 2015. Potential sources of and ecological risks from heavy metals in agricultural soils, Daye City, China. *Environmental Science and Pollution Research* 22:3498–3507.
- Dučić, T., and Polle, A. 2005. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1):103-112.
- Đorđievski, S., Ishiyama, D., Ogawa, Y., Stevanović, Z. 2018. Mobility and natural attenuation of metals and arsenic in acidic waters of the drainage system of Timok River from Bor copper mines (Serbia) to Danube River. *Environmental Science and Pollution Research* 25:25005–25019.
- EIA Study (2010). Environmental Impact Assessment. New Smelter and Sulphuric Acid Plant. Vol. 1 – Main Report. Project #338158. September 2010. University of Belgrade. Faculty of Metallurgy. SNC Lavalin.
- E-cube, 2015-2020. - "Research on the Integration System of Spatial Environment Analyses and Advanced Metal Recovery to Ensure Sustainable Resource Development" belonging to SATREPS program (Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development), supported by the Japan International Cooperation Agency (JICA) and Japan Science and Technology (JST).
- Elshamy, M.M., Heikal, Y.M., Bonanomi, G. 2019. Phytoremediation efficiency of *Portulaca oleracea* L. naturally growing in some industrial sites, Dakahlia District, Egypt. *Chemosphere*. 225:678-687.



- Esen, C., and Balci, A. 2008. Application of Microwave-Assisted Digestion to Trace Heavy Metal Determination in Sea Sediment Sample. *HACETTEPE JOURNAL OF BIOLOGY AND CHEMISTRY* 36(2):123-128.
- European Communities Council (1986). Directive (86/278/EEC) on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Off. J. Eur. Comm. L181/6 (1986). Dostupno na: <http://eu-r-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0278&from=EN>.
- Fantozzi, F., Monaci, F., Blanusa, T., Bargagli, R. 2013. Holm Oak (*Quercus ilex* L.) canopy as interceptor of airborne trace elements and their accumulation in the litter and topsoil. *Environmental Pollution* 183:89-95.
- Fernandez, R., Bertrand, A., Casares, A., Garcia, R., Gonzalez, A., Tames, R.S. 2008. Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution* 152:522–529.
- Flora, S.J.S., Mittal, M., Mehta, A. 2008. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research* 128:501–523.
- Gad, H.A., El-Ahmady, S.H., Abou-Shoer, M.I., Al-Azizi, M.M. 2013. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. *Phytochemical Analysis* 24:1–24.
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83:33-46.
- Gee, W., and Bauder, J.W. 1986. Particle-size analysis. in *Methods of soil analysis. Part1. Physical and mineralogical methods. Agronomy Monograph No.9.* Ed. Klute, A., Madison. Wisconsin. USA. pp. 383-409.
- Guarino, C., Zuzolo, D., Marziano, M., Baiamonte, G., Morra, L., Benotti, D., Gresia, D., Robortella Stacul, E., Cicchella, D., Sciarrillo, R. 2019. Identification of native-metal tolerant plant species in situ: Environmental implications and functional traits. *Science of the Total Environment* 650:156–3167.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53(366):1-11.
- Ho, R. 2006. HANDBOOK OF UNIVARIATE AND MULTIVARIATE DATA ANALYSIS AND INTERPRETATION WITH SPM. Taylor & Francis Group. LLC
- Hofman, J., Stokkaer, I., Snauwaert, L., Samson, R. 2013. Spatial distribution assessment of particulate matter in an urban street canyon using biomagnetic leaf monitoring of tree crown deposited particles. *Environmental Pollution* 183:123-132.
- Hussain, Z.S., and Maqbool, K. 2014. GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal of Current Science* 13:E116-126.
- ISO 13878. 1998. International standard. ISO 13878:1998 (Last reviewed and confirmed in 2015). Soil quality - Determination of total nitrogen content by dry combustion ("Elemental analysis"). Dostupno na: <https://www.iso.org/standard/23117.html>

- Jabłońska-Czapla, M., Zerzucha, P., Grygoyć, K. 2020. Impact of River Water and Bottom Sediment Pollution on Accumulation of Metal(loid)s and Arsenic Species in the Coastal Plants *Stuckenia pectinata* L., *Galium aparine* L., and *Urtica dioica* L.: A Chemometric and Environmental Study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 79:60–79.
- Jolivet, C., Arrouays, D., Bernoux, M. 1998. Comparison between analytical methods for organic carbon and organic matter determination in sandy Spodosols of France. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 29(15-16): 2227-2233.
- Kabata-Pendias, A., and Pendias, H. 2001. Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press LLC. Boca Raton. Florida. USA.
- Kabata-Pendias, A. 2011. Trace elements in soils and plants. Fourth Edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. LLC. Boca Raton. London. New York.
- Kadukova, J., Manousaki, E., Kalogerakis, N. 2008. Pb and Cd accumulation and phyto-excretion by salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *International Journal of Phytoremediation* 10:31–46.
- Kalinovic. T.S., Serbula. S.M., Radojevic. A.A., Kalinovic. J.V., Steharnik. M.M., and Petrovic. J.V. 2016. Elder, linden and pine biomonitoring ability of pollution emitted from the copper smelter and the tailings ponds. *Geoderma* 262.
- Kalinovic, J.V., Serbula, S.M., Radojevic, A.A., Milosavljevic, J.S., Kalinovic, T.S., Steharnik, M.M. 2019. Assessment of As, Cd, Cu, Fe, Pb, and Zn concentrations in soil and parts of *Rosa* spp. sampled in extremely polluted environment *Environmental Monitoring and Assessment* 191:15.
- Khanoranga, S.K. 2019. Phytomonitoring of air pollution around brick kilns in Balochistan province Pakistan through air pollution index and metal accumulation index. *Journal of Cleaner Production* 229:727-738.
- Kirkham, M.B. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137:19–32
- Kramer, R. 1998. Chemometric techniques for quantitative analysis. Marcel Dekker. Inc.. New York. ISBN – 0-8247-0198-4
- Kuang, Y.W., Zhou, G.Y., Wen, D.Z., Liu, S.Z. 2007. Heavy Metals in Bark of *Pinus massoniana* (Lamb.) as an Indicator of Atmospheric Deposition Near a Smeltery at Qujiang, China. *Environmental Science and Pollution Research* 14(4):270–275.
- Kvesitadze, G., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T., Ramsden, J.J. 2006. Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants. Basis of phytoremediation. Berlin. New York. Springer. 256
- LEAP, 2003. Local Environmental Action Plan, municipality Bor., 2003. Citizens' Forum Technical-Expert Team LEAP Office, edited by Toplica Marjanović, Milan Trumić, Ljiljana Marković. Citizens' Forum–Chairmen: Dragoslav Nikolić, Bor. Dostupno na: <http://www.rtb.rs/media/dokumenti/nt/TSD2.pdf>
- Ličina, V., Fotirić Akšić, M., Tomić, Z., Trajković, I., Antić Mladenović, S., Marjanović, M., Rinklebe, J. 2017. Bioassessment of heavy metals in the surface soil layer of an opencast mine aimed for its rehabilitation. *Journal of Environmental Management* 186: 240-252.

- Lin, Y.-F., and Aarts, M.G.M. 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69:3187–3206.
- Liu, L., Li, W., Song, W., Guo, M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. *Science of the Total Environment* 633:206–219.
- Lodenijs, M. 2013. Use of plants for biomonitoring of airborne mercury in contaminated areas. *Environmental Research*. 125:113-123.
- 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., Wappelhorst, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U., Friese, K., Breulmann, G. 1999. The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 240(2):425-429.
- Marques, A.P.G.C., Rangel, A.O.S.S., Castro, P.M.L. 2009. Remediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Phytoremediation as a Potentially Promising Clean-Up Technology. *Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology* 39:622–654.
- Masson, P., Dalix, T., Bussière, S. 2010. Determination of Major and Trace Elements in Plant Samples by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 41(3):231-243.
- Mertens, J., Luy Maert, S., Verheyen, K. 2005. Use and abuse of trace metal concentrations in plant tissue for biomonitoring and phytoextraction. *Environmental Pollution* 138:1-4.
- Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi M. 2010. Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(4):476–494.
- Miller, J.N., and Miller, J.C. 2005. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education Limited. London.
- Mingorance, M.D., Valdés, B., Oliva R.S. 2007. Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. *Environment International* 33:514–520.
- Montgomery, R.R., and Benkstein, J.E. 2014. NIST SP 260-176. Standard Reference Materials® Catalog. Dostupno na [www.nist.gov/srm](http://www.nist.gov/srm)
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. 2010. Heavy metals. occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8:199–216.
- Nikolić, J. 2018. Optimizacija postupaka pripreme uzoraka zemljišta za kvantitativnu analizu policikličnih aromatičnih ugljovodonika primenom metode gasna hromatografija-masena spektrometrija. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu. Prirodno matematički fakultet. Niš
- Nujkić, M., Dimitrijević, M., Alagić, S., Tošić, S., Petrović, J. 2016. Impact of metallurgical activities on the content of trace elements in the spatial soil and plant parts of *Rubus fruticosus* L. *Environmental Science: Processes & Impacts* 18:350-360.

- Oliva, S.R., and Mingorance, M.D. 2006. Assessment of airborne heavy metal pollution by aboveground plant parts. *Chemosphere* 65:177–82.
- Pallant, J. 2009. SPM priručnik za preživljavanje. Postupni vodič kroz analizu podataka pomoću SPSS-a za Windows (verzija 15). Prevod 3. Izdanje: Mikro knjiga. Beograd.
- Palmer, C.M., and Guerinot, M.L. 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nature Chemical Biology* 5(5):333-340.
- Papludis, A.D., Alagić, S.Č., Milić, S.M. 2018. Mangan u sistemu zemljište-biljka: Aspekti fitoremedijacije / Manganese in the system soil/plant: Phytoremediation aspects. *Zaštita materijala/Materials protection* 59(3):385-393.
- Pavoni, E., Petranich, E., Adami, G., Baracchini, E., Crosera, M., Emili, A., Lenaz, D., Higuera, P., Covelli, S. 2017. Bioaccumulation of thallium and other trace metals in *Biscutella laevigata* nearby a decommissioned zinc-lead mine (Northeastern Italian Alps). *Journal of Environmental Management* 186:214-224.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J. 2009. The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41:1665–1677.
- Perčić, S.-C. 2013. Encyclopedia of medicinal plants of eastern Serbia [Enciklopedija lekovitog bilja istočne Srbije]. 3<sup>rd</sup> edition. Društvo za lekovito bilje Nana. Bor.
- Perlatti, F., Ferreira, T.O., Espíndola Romero, R., Gomes Costa, M.C., Otero, X.L. 2015. Copper accumulation and changes in soil physical–chemical properties promoted by native plants in an abandoned mine site in northeastern Brazil: Implications for restoration of mine sites. *Ecological Engineering* 82:103–111.
- Petrović, J.V., Alagić, S.Č., Milić, S.M., Tošić, S.B., Bugarin, M.M. 2021. Chemometric characterization of heavy metals in soils and shoots of the two pioneer species sampled near the polluted water bodies in the close vicinity of the copper mining and metallurgical complex in Bor (Serbia): Phytoextraction and biomonitoring contexts. *Chemosphere* 262: article number 127808
- Petrović, J.V., Alagić, S.Č., Tošić, S.B., Šteharinik, M.M., Bugarin, M.M., Stevanović, Z.O. 2019. Sadržaj teških metala u nadzemnim delovima koprive i mlečike iz Oštrelja (opština Bor): prilog ispitivanjima biljnih biomonitoring i fitoremedijacionih potencijala / THE CONTENT OF HEAVY METALS IN THE AERIAL PARTS OF THE COMMON NETTLE AND SUN SPURGE FROM OŠTRELJ (MUNICIPALITY OF BOR): A CONTRIBUTION TO THE EXAMINATIONS OF PLANT BIOMONITORING AND PHYTOREMEDIATION POTENTIALS. *Zaštita materijala/Materials protection*, 60(1):105-111.
- Prupp, A.H. 2013. Statistics in Food Science and Nutrition. Editor-in-Chief Richard W. Hartel, Associate Editors, J. Peter Clark, David Rodriguez-Lazaro, David Topping. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. ISBN 978-1-4614-5009-2 ISBN 978-1-4614-5010-8 (eBook). DOI 10.1007/978-1-4614-5010-8
- Radojevic, A.A., Serbula, S.M., Kalinovic, T.S., Kalinovic, J.V., Steharnik, M.M., Petrovic, J.V., Milosavljevic, J.S. 2017. Metal/metalloid content in plant parts and soils of *Corylus* spp. influenced

- by mining–metallurgical production of copper. *Environmental Science and Pollution Research* 24:10326–10340.
- Randelović, D., Jakovljević, K., Mihailović, N., Jovanović, S. 2018. Metal accumulation in populations of *Calamagrostis epigejos* (L.) Roth from diverse anthropogenically degraded sites (SE Europe, Serbia). *Environmental Monitoring and Assessment* 190:183.
- Rascio, N., and Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180:169–181.
- Reimann, C., Koller, F., Kashulina, G., Niskavaara, H., Englmaier, P. 2001. Influence of extreme pollution on the inorganic chemical composition of some plants. *Environmental Pollution* 115:239–252.
- Reinholds, I., Bartkevics, V., Silvis, I.C.J., van Ruth, S.M., Esslinger, S. 2015. Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* 44:56–72.
- Ristić, M. 2019. Skripta iz Hromatografije i separacionih metoda (Drugi deo: Hromatografija). Fakultet za fizičku hemiju. Beograd
- Rogan Šmuc, N., Dolenc, T., Serafimovski, T., Tasev, G., Dolenc, M., Vrhovnik, P. 2012. Heavy metal characteristics in Kočani Field plant system (Republic of Macedonia). *Environmental Geochemistry and Health* 34:513–526.
- RoRS 337, 2021. Romania Serbia NETwork for assessing and disseminating the impact of copper mining activities on water quality in the cross-border area (RoS-NET2)“ realizovan u okviru „Interreg-IPA Cross-border Cooperation Romania-Serbia Programme”, 2021. Dostupno na: [https://www.elearning-chemistry.ro/rosnet2/3d-flip-book/a5\\_scientific-report\\_state-of-waters/](https://www.elearning-chemistry.ro/rosnet2/3d-flip-book/a5_scientific-report_state-of-waters/)
- Rucandio, M.I., Petit-Domínguez, M.D., Fidalgo-Hijano, C., García-Giménez, R. 2011. Biomonitoring of chemical elements in an urban environment using arboreal and bush plant species. *Environmental Science and Pollution Research* 18:51–63.
- Sarma, H. 2011. Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology. *Journal of Environmental and Science Technology* 4(2):118–138.
- Savic, R., Ondrasek, G., Josimov-Dundjerski, J. 2015. Heavy metals in agricultural landscapes as hazards to human and ecosystem health: a case study on zinc and cadmium in drainage channel sediments. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95:466–470
- Schnoor, J.L., Licht, L.A., Mc Cutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology* 29(7):318A–23A.
- Schreck, E., Viers, J., Blondet, I., Auda, Y., Macouin, M., Zouiten, C., Freydier, R., Dufrechou, G., Chmeleff, J., Darrozes, J. 2020. *Tillandsia usneoides* as biomonitors of trace elements contents in the atmosphere of the mining district of Cartagena-La Union (Spain): New insights for element transfer and pollution source tracing. *Chemosphere* 241: article number 124955.
- Serbula, S.M., Alagic, S.C., Ilic, A.A., Kalinovic, T.S., Strojic, J.V. 2012. Particulate Matter Originated From Mining-Metallurgical Processes. In *Particulate Matter: Sources. Emission Rates*

and *Health Effects* edited by Henrik Knudsen, and Niels Rasmussen. 91-116. Nova Science Publishers US. New York.

Shutchu, M.N., Faucon, M.-P., Kissi, C.K., Colinet, G., Mahy, G., Luhembwe, M.N., Visser, M., Meerts, P. 2015. Three years of phytostabilisation experiment of bare acidic soil extremely contaminated by copper smelting using plant biodiversity of metal-rich soils in tropical Africa (Katanga, DR Congo). *Ecological Engineering* 82:81–90.

da Silva, W.R., da Silva, F.B.V., Araújo, P.R.M., Araújo do Nascimento, C.W. 2017. Assessing human health risks and strategies for phytoremediation in soils contaminated with As, Cd, Pb, and Zn by slag disposal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144:522–530.

Simon, E., Braun, M., Vidic, A., Bogyó, D., Fábián, I., Tóthmérész, B. 2011. Air pollution assessment based on elemental concentration of leaves tissue and foliage dust along an urbanization gradient in Vienna. *Environmental Pollution* 159:1229-1233.

Simon, E., Baranyai, E., Braun, M., Cserhádi, C., Fábián, I., Tóthmérész, B. 2014. Elemental concentrations in deposited dust on leaves along an urbanization gradient. *Science of the Total Environment* 490:514–520.

Sl. glasnik RS 30/2018. Pravilnik o programu monitoringa kvaliteta zemljišta koristeći indikatore za procenu rizika degradacije zemljišta. kao i metodologija za izvođenje programa remedijacije

Spanos, Th., Simeonov, V., Tsakovski, S., Thiokas, D. 2004. Chemometric study of soil analysis data. *Central European Journal of Chemistry* 2:402-416.

Stanković, S. 2016. MIKROBIOLOŠKI DIVERZITET KISELOG JEZERA ROBULE I UTICAJ JEZERSKE VODE NA OKSIDACIJU SULFIDNIH MINERALA. Doktorska disertacija, UNIVERZITET U BEOGRADU, RUDARSKO-GEOLOŠKI FAKULTET

Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J., Macek, T. 2018. Phytoextraction of Heavy Metals: A Promising Tool for Clean-Up of Polluted Environment? *Frontiers in Plant Science* 9: Article 1476

Sutherland, R.A. 2000. Bed sediment-associated trace metals in an urban stream. Oahu, Hawaii. *Environmental Geology* 39:611–27.

Šerbula, S., Stankovic, V., Živkovic, D., Kamberovic, Ž., Gorgievski, M., Kalinovic, T. 2016. Characteristics of Wastewater Streams Within the Bor Copper Mine and Their Influence on Pollution of the Timok River, Serbia. *Mine Water and the Environment* 35(4):480-485.

Tošić, S., Alagić, S., Dimitrijević, M., Pavlović, A., Nujkić, M. 2016. Plant parts of the apple tree (*Malus spp.*) as possible indicators of heavy metal pollution. *AMBIO: a journal of the human environment* 45(4):501-512.

Tózsér, D., Tóthmérész, B., Harangi, S., Baranyai, E., Lakatos, G., Fülöp, Z., Simon, E. 2019. Remediation potential of early successional pioneer species *Chenopodium album* and *Tripleurospermum inodorum*. *Nature Conservation* 36:47–69.

UNEP (2002). Clean-Up of Environmental Hotspots: Assessment of Environmental Monitoring Capacities in Bor - Mission Report. Interagency Mission to Bor. 13-17 May 2002. UNEP/Post-Conflict Assessment Unit, Geneva. September 2002. Dostupno na: <https://postconflict.unep.ch/publications/borcapacityMeMmentseptember2002.pdf>

Unterbrunner, R., Puschenreiter, M., Sommer, P., Wieshammer, G., Tlustos, P., Zupan, M., Wenzel, W.W. 2007. Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. *Environmental Pollution* 148:107-114.

USEPA. 1996. United States Environmental Protection Agency. USEPA Method 3052: "Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices"; Office of Solid Waste and Emergency Response. U.S. Government Printing Office. Washington. DC. Dostupno na: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>

USEPA. 2007. United States Environmental Protection Agency. USEPA Method 3051A (SW-846): "Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils"; Revision 1. Washington. DC. Dostupno na: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf>

Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G. 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters* 8:1-17.

Velimirović, D. 2013. Optimizacija, validacija i primena ICP-OES metoda određivanja sadržaja metala u realnim uzorcima. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu. UDK: 543.42+005.591.1:543.632.495

Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181:759–776.

Viktorova, J., Jandova, Z., Madlenakova, M., Prouzova, P., Bartunek, V., Vrchotova, B., Lovecka, P., Musilova, L., Macek, T. 2016. Native Phytoremediation Potential of *Urtica dioica* for Removal of PCBs and Heavy Metals Can Be Improved by Genetic Manipulations Using Constitutive CaMV 35S Promoter. *PLoS ONE* 11:e0167927.

Walter, M., Oburger, E., Schindlegger, Y., Hann, S., Puschenreiter, M., Kraemer, S.M., Schenkeveld, W.D.C. 2016. Retention of phytosiderophores by the soil solid phase – adsorption and desorption. *Plant and Soil* 404:85–97.

Weber, F., Kowarik, I., Säumel, I. 2014. Herbaceous plants as filters: Immobilization of particulates along urban street corridors. *Environmental Pollution* 186:234-240.

Yoshida, T. Kawai, S., Takagi, S. 2004. Detection of the regions of phytosiderophore release from barley roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 50(7):1111-1114.

<https://onlineherbar.bio.bg.ac.rs/066.html>

<https://www.plantea.com.hr/mljecika-suncogled/>

[https://www.jardineriaon.com/bs/helioskopija-euforbije.html#Propiedades\\_medicinales](https://www.jardineriaon.com/bs/helioskopija-euforbije.html#Propiedades_medicinales)

<https://www.plantea.com.hr/kopriva/>

<https://bor.rs/wp-content/uploads/2015/11/Izvestaj-o-kvalitetu-vazduha-u-Boru-za-maj2017.pdf>





## **Prilozi**

## **Biografija autora**

Jelena V. Petrović, rođena je u Boru 24.01.1973. god. Osnovnu školu "Branko Radičević" i Gimnaziju "Bora Stanković" završila je u Boru. Prirodno-matematički fakultet, odsek hemija završila je u Kragujevcu 2005. god. i stekla zvanje diplomirani hemičar za istraživanje i razvoj, što je izjednačeno sa akademskim nazivom master-hemičar.

Od marta 2006. god. zaposlena je kao volonter u Intitutu za rudarstvo i metalurgiju i za godinu dana volontiranja prošla obuku na svim tehnikama koje se primenjuju u hemijskoj laboratoriji Instituta.

Od 10.04.2007. god. zaposlena je u Hemijskoj Laboratoriji Instituta za rudarstvo i metalurgiju, u zvanju istraživač saradnik. Radila je analize na rentgensko fluorescentnom analizatoru, jon-selektivnoj (fluoridnoj) elektrodi, na razvijanju metoda razaranja teško rastvornih uzoraka u mikrotalasnoj pećnici, analize na termogravimetrijskom analizatoru, analize na optičkom emisionom spektrometru sa varnicom, kao i mnogim drugim tehnikama Laboratorije Instituta.

Od 01.01.2015. god. pa do danas radi na mestu glavnog koordinatora u Hemijskoj Laboratoriji Instituta za rudarstvo i metalurgiju.

## **Istraživačka interesovanja**

Učešće na projektima

1. 2011-2012: Romania-Republic of Serbia IPA Cross-border Cooperation Program financed by the European Union under the Instrument for Pre-accession Assistance (IPA) and co-financed by the partner states in the program ([www.romania-serbia.net](http://www.romania-serbia.net)), MIS Code 464 RoS-NeT. Ekspert za hemijske analize.
2. 2013: Environmental Risk Assessment of The Mining Industry in a Transboundary Region Between Bulgaria and Serbia, IPA Bulgari – Serbia, Bulgaria - Serbia IPA Cross-Border Programme Call for proposals No: 2007CB16IPO006 – 2009 – 1. Saradnik na projektu.
3. 2010-2012: Ministarstvo za mineralne resurse, rudarstva i prostronog planiranja Republike Srbije i Institut za rudarstvo i metalurgiju Bor realizovali su projekat "Management of Mining Waste – Tailing Dump at the Region of Bor" sa Japan International Cooperation Agency (JICA). Partner Institution from Japan was Akita University. Istraživač.
4. 2018-2019 Institut za rudarstvo i metalurgiju Bor u saradnji sa DMT GmbH & Co. KG as kao vodećim partnerom i sedam drugih partnera iz EU realizovali su Projekat "Calcification and Sorting of Radium-Rich Phosphogypsum Tailings (RAPHOSAFE)" kroz program EIT RAW MATERIALS. Ekspert za hemijske analize.
5. 2015-2020: Ministarstvo rudarstva i energetike, Ministarstvo ponjoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije i Institut za rudarstvo i metalurgiju Bor, realizovali su projekat "Introduction of an integrated system of environmental analysis and advanced utilization of metal to secure the sustainable use of mineral resources in the Republic of Serbia (E-Cube)" u saradnji sa Japan International Cooperation Agency (JICA). Odgovorni istraživač.
6. 2011-2020: Ministarstvo nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, TR 33038 Improvement of exploitation and processing technologies of copper ore with monitoring of living and working environment in RTB Bor – Group. Istraživač.

7. 2017-2019: Ministarstvo rudarstva i energetike Republike Srbije podržanih od strane EU delegacije u Srbiji realizovali su Projekat “Cadastre of Mining Waste (CMW)” in Republic of Serbia. Istraživač.

Jelena V. Petrović je autor, ili koautor: 14 radova publikovanih u međunarodnim časopisima iz kategorije M20 (2 rada kategorije M21a, 3 rada kategorije M21, 3 rada kategorije M22, 6 radova kategorije M23), 6 radova publikovanih u časopisima nacionalnog značaja iz kategorije M50 (2 rada iz kategorije M51 i 4 rada iz kategorije M52), 28 saopštenja sa konferencija međunarodnog značaja iz kategorije M30 (23 saopštenja kategorije M33, 6 saopštenja kategorije M34 i 4 rada iz kategorije M63), kao i 2 studije (ekspertize) iz kategorije M103.

Publikovani radovi koji sadrže rezultate doktorske disertacije su:

1) **Jelena V. Petrović**, Slađana Č. Alagić, Snežana M. Milić, Snežana B. Tošić, Mile M. Bugarin, Chemometric characterization of heavy metals in soils and shoots of the two pioneer species sampled near the polluted water bodies in the close vicinity of the copper mining and metallurgical complex in Bor(Serbia): Phytoextraction and biomonitoring contexts, *Chemosphere*, 262 (2021) 127808, **M21**

ISSN: 0045 – 6535,  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127808>,  
IF(2021) = 8,943

2) **Jelena V. Petrović**, Slađana Č. Alagić, Snežana B. Tošić, Mirjana M. Šteharnik, Mile M. Bugarin, Zoran O. Stevanović, Sadržaj teških metala u nadzemnim delovima koprive i mlečike iz Oštrelja (Opština Bor): prilog ispitivanjima biljnih biomonitoring i fitoremedijacionih potencijala, *Zaštita materijala*, 60(1) (2019) str. 105-111, **M51**

ISSN: 0351-9465, E-ISSN: 2466-2585,  
UDC: 631.427.3:504.75.064,  
DOI: 10.5937/zasmat1901105P

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Јелена Петровић

Број индекса: 10/2016

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**ХЕМОМЕТРИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ТЕШКИХ МЕТАЛА У ЗЕМЉИШТУ И ИЗДАНЦИМА ПИОНИРСКИХ  
ВРСТА КОЈЕ РАСТУ У БЛИЗИНИ ЗАГАЂЕНИХ ВОДА У НЕПОСРЕДНОЈ ОКОЛИНИ РУДАРСКО-  
МЕТАЛУРШКОГ КОМПЛЕКСА У БОРУ: АСПЕКТИ ФИТОЕКСТРАКЦИЈЕ И БИОМОНИТОРИНГА**

- 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: Јелена Петровић

Број индекса: 10/2016

Студијски програм: Технолошко инжењерство

Наслов рада: **ХЕМОМЕТРИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ТЕШКИХ МЕТАЛА У ЗЕМЉИШТУ И ИЗДАНЦИМА ПИОНИРСКИХ ВРСТА КОЈЕ РАСТУ У БЛИЗИНИ ЗАГАЂЕНИХ ВОДА У НЕПОСРЕДНОЈ ОКОЛИНИ РУДАРСКО-МЕТАЛУРШКОГ КОМПЛЕКСА У БОРУ: АСПЕКТИ ФИТОЕКСТРАКЦИЈЕ И БИОМОНИТОРИНГА**

Ментор: проф др Слађана Алагић

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:

**ХЕМОМЕТРИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ТЕШКИХ МЕТАЛА У ЗЕМЉИШТУ И ИЗДАНЦИМА ПИОНИРСКИХ ВРСТА КОЈЕ РАСТУ У БЛИЗИНИ ЗАГАЂЕНИХ ВОДА У НЕПОСРЕДНОЈ ОКОЛИНИ РУДАРСКО-МЕТАЛУРШКОГ КОМПЛЕКСА У БОРУ: АСПЕКТИ ФИТОЕКСТРАКЦИЈЕ И БИОМОНИТОРИНГА**

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.

