

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Martin VRHOVŠEK

**VPLIV SELENA NA VODNE RASTLINE  
PRERASLOLISTNI DRISTAVEC (*Potamogeton perfoliatus*),  
KLASASTI RMANEC (*Myriophyllum spicatum*)  
IN NAVADNI ROGOLIST (*Ceratophyllum demersum*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF SELENIUM ON MACROPHYTES  
*Potamogeton perfoliatus*,  
*Myriophyllum spicatum*  
AND *Ceratophyllum demersum***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za ekologijo in varstvo okolja Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti.

Študijska komisija Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Matejo Germ.

Komisija za oceno in zagovor diplomske naloge:

Mentorica: doc. dr. Mateja GERM  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: prof. dr. Alenka GABERŠČIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Predsednica: doc. dr. Katarina VOGEL MIKUŠ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Martin Vrhovšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 581.5:635.926:546.23(043.2)=163.6
KG	vodne rastline/vpliv selena/klorofil <i>a</i> /klorofil <i>b</i> /karotenoidi/antociani
AV	VRHOVŠEK, Martin
SA	GERM, Mateja (mentorica)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2013
IN	VPLIV SELENA NA VODNE RASTLINE PRERASLOLISTNI DRISTAVEC ( <i>Potamogeton perfoliatus</i> ), KLASASTI RMANEC ( <i>Myriophyllum spicatum</i> ) IN NAVADNI ROGOLIST ( <i>Ceratophyllum demersum</i> )
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 41 str., 8 pregl., 18 sl., 4 pril., 31 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv selena na tri vrste vodnih rastlin: preraslolistni dristavec ( <i>Potamogeton perfoliatus</i> ), klasasti rmanec ( <i>Myriophyllum spicatum</i> ) in navadni rogolist ( <i>Ceratophyllum demersum</i> ). Vse poskusne rastline smo izpostavili nizki ( $20\mu\text{g Se L}^{-1}$ ) in visoki ( $10\text{ mg Se L}^{-1}$ ) koncentraciji selena v obliki selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Tekom rasti smo spremljali vsebnost fotosinteznih barvil (klorofil <i>a</i> in <i>b</i> , karotenoidi) in antociane, dihalni potencial s pomočjo meritev aktivnosti elektronskega transportnega sistema (ETS) in potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II. Nizka koncentracija selena ni vplivala na izbrane biokemijske in fiziološke lastnosti pri nobeni od vrst. Negativen vpliv na rastline je imela visoka koncentracija selena. Vse tri vrste, ki so bile izpostavljene visoki koncentraciji selena ( $\text{Se}^{2+}$ ), so imele statistično značilno nižjo potencialno fotokemično učinkovitost. Vrsti <i>M. spicatum</i> in <i>P. perfoliatus</i> pa nižji dihalni potencial v primerjavi s kontrolo. Selen ni imel jasnega vpliva na vsebnost klorofila <i>a</i> in <i>b</i> , karotenoidov in antocianov pri nobeni od preučevanih vrst.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd  
DC UDC 581.5:635.926:546.23(043.2)=163.6  
CX aquatic plants/effect of selenium/chlorophyll *a*/chlorophyll *b*/carotenoids/anthocyanins  
AU VRHOVŠEK, Martin  
AA GERM, Mateja (supervisor)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2013  
TI THE EFFECT OF SELENIUM ON MACROPHYTES *Potamogeton perfoliatus*, *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum*  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 41 p., 8 tab., 18 fig., 4 ann., 31 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The effect of selenium on three aquatic plants *Potamogeton perfoliatus*, *Myriophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum* was studied. Plants were exposed to low ( $20\mu\text{g Se L}^{-1}$ ) and high concentration ( $10\text{ mg Se L}^{-1}$ ) of selenium as sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). The amount of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*, carotenoids) and anthocyanins were monitored along with potential via electron transport system activity (ETS) and photochemical efficiency of photosystem II. Lower concentration of selenium did not effect selected biochemical and physiological characteristics any of the plant. Higher concentration of selenium had negative effect on plants. Plants, exposed to higher concentration of selenium, expressed statistically lower photochemical efficiency and respiratory potential in comparing to control. Selenium did not have clear effect on the amount of photosynthetic pigments as well as on anthocyanins in any of plant.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO TABEL .....	VII
KAZALO SLIK .....	VIII
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. NAMEN .....	2
1.2. DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2. PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1. SELEN .....	3
<b>2.1.1. Splošno o selenu .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Vpliv selena na rastline .....</b>	<b>4</b>
2.2. VODNE RASTLINE ALI MAKROFITI .....	5
2.3 REMEDIACIJE .....	5
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>6</b>
3.1. RASTLINSKE VRSTE .....	6
3.2. POSKUS .....	7
3.3. METODE .....	12
<b>3.3.1. Fotosintezna barvila .....</b>	<b>12</b>
<b>3.3.2. Meritve potencialne fotokemične učinkovitosti .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.3. Aktivnost elektronskega transportnega sistema (ETS) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.4. Merjenje temperature vode in višina vode v kadeh s poskusnimi rastlinami .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.5. Statistična obdelava pridobljenih rezultatov .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.6. Dnevi vzorčenja .....</b>	<b>17</b>
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>18</b>
4.1. AKTIVNOST ELEKTRONSKEGA TRANSPORTNEGA SISTEMA (ETS) .....	18

4.2. POTENCIALNA FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST (Fv/Fm).....	21
4.3. FOTOSINTEZNA BARVILA .....	24
4.4. ANTOCIANI.....	24
4.5. UČINKI PRESAJANJA RASTLIN, GOJENIH V Se <sup>2</sup> , V VODO BREZ DODANEGA Se IN NAZAJ V VODO Se <sup>2</sup> .....	25
4.5.1. Aktivnost elektronskega transportnega sistema (ETS).....	25
4.5.2. Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv/Fm) .....	27
4.5.3. Klorofil <i>a</i> in klorofil <i>b</i> , karotenoidi in antociani.....	29
<b>5. DISKUSIJA</b> .....	31
5.1. USPEVANJE RASTLIN PRI RAZLIČNIH OBRAVNAVANJIH S Se.....	31
5.2. VPLIV Se NA DIHALNI POTENCIAL.....	31
5.3. VPLIV Se NA FOTOKEMIČNO UČINKOVITOST FS II.....	32
5.4. BIOKEMIJSKE LASTNOSTI .....	33
5.5. SPREMEMBA KONCENTRACIJ Se V MEDIJU .....	34
<b>6. POVZETEK</b> .....	36
<b>7. SKLEPI</b> .....	37
<b>8. LITERATURA</b> .....	38
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Izvajane meritve na gojenih rastlinah. ....	17
Tabela 2: Klorofil <i>a</i> in <i>b</i> , izmerjeni najprej pri rastlinah, ki so uspevale v vodi z visoko koncentracijo selena, nato po presajanju v čisto vodo, in v vodi z visoko koncentracijo selena. ....	29
Tabela 3: Karotenoidi in antociani, izmerjeni najprej pri rastlinah, ki so uspevale v vodi z visoko koncentracijo selena, nato po presajanju v čisto vodo, in v vodi z visoko koncentracijo selena. ....	30
Tabela 4: Temperature vode [°C], merjene v kadeh, kjer so bile rastline nasajene. ....	44
Tabela 5: Vsebnost klorofila <i>a</i> [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov. ....	45
Tabela 6: Vsebnost klorofila <i>b</i> [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov. ....	46
Tabela 7: Vsebnost karotenoidov [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov. ....	47
Tabela 8: Vsebnost antocianov [mL/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov. ....	48

## KAZALO SLIK

Slika 1: Postavitev poskusa.....	8
Slika 2: Substrat v kadeh .....	8
Slika 3: Levo – poskus z vrsto <i>C. demersum</i> v nizki koncentraciji selena (Se1), desno – poskus z vrsto <i>C. demersum</i> v visoki koncentraciji selena (Se2) .....	9
Slika 4: Levo – poskus z vrsto <i>M. spicatum</i> v nizki koncentraciji selena (Se1), desno – poskus z vrsto <i>M. spicatum</i> v visoki koncentraciji selena (Se2) .....	9
Slika 5: Poskus z vrsto <i>P. perfoliatus</i> v nizki koncentraciji selena (Se1) .....	10
Slika 6: Povprečna temperatura zraka v času trajanja poskusa (vir ARSO) .....	11
Slika 7: Povprečna vlažnost zraka v času trajanja poskusa (vir ARSO).....	11
Slika 8: Količina padavin v času trajanja poskusa (vir ARSO).....	11
Slika 9: Aktivnost ETS pri vrsti <i>P. perfoliatus</i> v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki koncentraciji (Se2) selena v vodi ob različnih vzorčevanjih. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ SD .....	18
Slika 10: Aktivnost ETS pri vrsti <i>M. spicatum</i> v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ SD .....	19
Slika 11: Aktivnost ETS pri vrsti <i>C. demersum</i> v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ SD .....	20
Slika 12: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti <i>P. perfoliatus</i> v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ SD .....	21



- Slika 13: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti *M. spicatum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD ..... 22
- Slika 14: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti *C. demersum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD ..... 23
- Slika 15: Aktivnost ETS pri vrsti *M. spicatum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. Se2 pred – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. Se2 po – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena ..... 25
- Slika 16: Aktivnost ETS pri vrsti *C. demersum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. Se2 pred – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. Se2 po – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena ..... 26
- Slika 17: Potencialna fotokemična učinkovitost FS II pri vrsti *M. spicatum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. Se2 pred – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. Se2 po – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena. 27
- Slika 18: Potencialna fotokemična učinkovitost FS II pri vrsti *C. demersum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. Se2 pred – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. Se2 po – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena. 28

## KAZALO PRILOG

Priloga 1 .....	44
Priloga 2 .....	45
Priloga 3 .....	47
Priloga 4 .....	48

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ETS	elektronski transportni sistem
$F_0$	minimalna fluorescenca klorofila <i>a</i> v FS II temno adaptiranega lista
$F_m$	maksimalna fluorescenca klorofila <i>a</i> v FS II temno adaptiranega lista
$F_v$	variabilna fluorescenca temotno adaptiranega lista ( $F_v = F_m - F_0$ )
SD	standardna deviacija
Se	selen
Se1	nizka koncentracija selena
Se2	visoka koncentracija selena
HCl	klorovodikova kislina
FS II	fotosistem II
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

## 1. UVOD

Selen je element v sledovih, ki je v nizkih koncentracijah nujno potreben za živali in ljudi, pri visokih koncentracijah pa je lahko strupen (Reid in sod., 2004). Njegova vloga pri rastlinah še ni popolnoma razjasnjena, znani pa so pozitivni vplivi selena na nekatere gojene rastline. Pospešuje antioksidacijsko aktivnost, zavira procese, povezane s staranjem in omili stres zaradi močne svetlobe in suše (Xue in sod., 2001). V višjih koncentracijah vpliva selen na rastline negativno, sprva zavre njihovo rast, z višanjem koncentracije pa rastlina propade. Selen se lahko v organizmih tudi bioakumulira. Bioakumulacija je možna zaradi kemične podobnosti selena in žvepla. Oblika selena, ki jo večina rastlin najhitreje vgradi v svojo biomaso, je selenometionin (Terry in sod., 2000). Vode ob kmetijskih površinah in živalskih farmah lahko vsebujejo povišane koncentracije selena, saj se le-ta dodaja v krmo za živali in tudi gnojila. Ob padavinah se selen spira v tla. Selen lahko doseže podtalnico, kar predstavlja grožnjo virom pitne vode na določenih območjih. Pri odstranjevanju selena iz vode bi lahko uporabili določene vrste makrofitov, ki so zelo uspešne pri akumulaciji selena. Makrofiti so rastline, ki rastejo popolnoma ali delno potopljene v vodi, in so vidne s prostim očesom. Na njihovo razširjenost vplivajo kemijski, fizikalni in hidromorfološki dejavniki.

## 1.1. NAMEN

Namen naloge je:

- Ugotoviti vpliv selena na izbrane biokemijske in fiziološke lastnosti preučevanih makrofitov.
- Ugotoviti, ali nizka in visoka koncentracija selena različno vplivata na preučevane makrofite.
- Ugotoviti odziv vrst (*Myriophyllum spicatum* in *Ceratophyllum demersum*) na presajanje iz visoke koncentracije selena v vodo brez dodanega selena ter nazaj v medij z visoko koncentracijo selena.

## 1.2. DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da bo selen vplival na fiziološke in biokemijske lastnosti izbranih makrofitov (preraslolistni dristavec - *Potamogeton perfoliatus*, klasasti rmanec - *Myriophyllum spicatum* in navadni rogolist - *Ceratophyllum demersum*).
- Pričakujemo različen odziv preučevanih vrst na dodan selen.
- Pričakovane vrste se bodo različno odzvale na nizko in na visoko koncentracijo dodanega selena.
- Rastline se bodo odzvale na spremembo v koncentraciji selena v okolnem mediju.

## 2. PREGLED OBJAV

### 2.1. SELEN

#### 2.1.1. Splošno o selenu

Selen je leta 1817 odkril švedski kemik Jons Jacob Berzelius, ko je pri procesu pridobivanja žveplene kisline analiziral rdečo usedlino. Selen ima podobne značilnosti kot žveplo in obstaja v večih alotropskih oblikah. Bistvena razlika med žveplom in selenom pa je ta, da se selen pogosto nahaja v štirivalentni reducirani obliki, medtem ko žveplo v štirivalentni oksidirani obliki. Še pogosteje se omenjena elementa v naravi pojavljata v ionski obliki (Haavisto in sod., 1996).

Najpomembnejši viri selena za ljudi so meso, drobovina, morski sadeži in žita. Zaradi pomanjkanja selena na določenih območjih, so leta 1984 pričeli na Finskem dodajati selen mineralnim gnojilom in s tem posledično povečali vsebnost selena v živilih (Haavisto in sod., 1996).

Ker spada Slovenija med države s srednjo stopnjo pomanjkanja selena (Stibilj in sod., 2004), bi bila ena izmed rešitev za povečanje selena v živilih uporaba selenovih prehranskih dodatkov. Vendar se zaradi premajhne informiranosti in nepazljivosti uporabnikov ter pretiravanja pri odmerjanju poraja realna skrb. Dokler vloga in prenos selena v biosferi nista preučena, je primerno povečevati vsebnost selena v gojenih rastlinah v okviru kmetovanja z gnojenjem ali namakanjem semen (Stibilj in sod., 2004).

Selen se lahko rastlinam dodaja na različne načine, ki jih razvijajo po celem svetu:

- namakanje semen,
- foliarno škropljenje,
- aeroponsko gnojenje,
- hidroponsko gnojenje,
- dodajanje selena v tla.

### 2.1.2. Vpliv selena na rastline

Nekatere rastline so selen sposobne asimilirati in kopičiti v različnih rastlinskih organih. Privzem je odvisen od koncentracije selena in njegove kemijske oblike, med drugim pa na privzem vpliva še pH prsti, slanost, vsebnost kalcijevega karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ) (Germ in sod., 2007). Pri nizkem pH je privzem selena visok. Poznamo primarne in sekundarne akumulatorje selena. Primarni lahko privzamejo več kot 1000 mg/kg selena, medtem ko sekundarni akumulatorji iz tal privzamejo od nekaj 100 do 1000 mg/kg selena (Terry in sod., 2000).

Raziskovalci so proučevali vpliv trdote vode, temperature, pH in drugih parametrov na strupenost selena za rastline. Posebno vpliv sulfata na privzem selena v vodnem okolju je zelo raziskan (Sappington, 2002).

Ugotovili so, da selen deluje kot antioksidant, saj inhibira peroksidacijo lipidov pri ljujki (*Lolium perenne*), obravnavane s koncentracijo med 0,1 in 1 mg Se/L (Xue in sod., 2001). Povečan pridelek se je pokazal pri gojenju buč (*Cucurbita pepo*) na prostem, obravnavanih s koncentracijo selena 1,5 mg/L (Germ in sod., 2005). Pri koncentracijah, višjih od 10 mg Se/L, pa so se pokazali negativni učinki pri gojenju ljujke (*Lolium perenne*) in solate (*Lactuca sativa*), saj je prišlo do zmanjšanja biomase (Xue in sod., 2001). Dokazano je, da selen pospešuje rast rastlin, ki so izpostavljene oksidativnemu stresu kot posledica UV-sevanja in zavira proces staranja zaradi povečane antioksidacije, ki je povezana s povečano aktivnostjo glutathion peroksidaze (GPx) (Xue in sod., 2001).

Študij o vplivih selena na fiziološke in biokemijske parametre makrofitov je zelo malo (Mechora in sod., 2011; Mechora in sod., v tisku). Ugotovili so, da sta vrsti *C. demersum* in *M. spicatum* privzeli velike količine selena. V koncentraciji selena 10 mg/L je vrsta *M. spicatum* preživela od 8 do 13 dni; dlje časa (31 dni) je preživela vrsta *C. demersum*. Selen je negativno vplival na fotokemično učinkovitost FS II, vendar na vsebnost klorifila *a* in *b* ni imel vpliva.

## 2.2. VODNE RASTLINE ALI MAKROFITI

Med makrofite oziroma vodne rastline, ki jih v vodi vidimo s prostim očesom, spadajo rastline, ki so prilagojene življenju v celinskih vodah. V to skupino spadajo cvetnice, praprotnice in mahovi ter nekatere makroskopske alge.

Vodne vaskularne rastline izhajajo iz kopenskih prednikov. Na to kažejo tanka kutikula, odsotnost listnih rež in slabo lignificirano prevodno tkivo (Hutchinson, 1975).

Glede na rastno obliko, način pritrditve in razmere, v katerih uspevajo, jih delimo na več različnih skupin (Allan, 1995). Nekaterih vrst zaradi svoje specifičnosti (različne oblike) ne moremo uvrstiti samo v eno skupino (Gaberščik in Martinčič, 1992), to so rastline, ki imajo amfibijski značaj, saj uspevajo tako na kopnem kot tudi v vodi oziroma na prehodu med vodo in kopnim (Sand Jensen in Jacobsen, 2002).

Med najpomembnejše dejavnike, ki vplivajo na rast vodnih rastlin, uvrščamo svetlobo, kemizem vode (vir kalcija, ogljika, dušika, fosforja, magnezija, natrija), vodni tok, substrat, temperaturo in kompeticijo (Carr in sod., 1997).

Vodne rastline so ključni sestavni del vodnih ekosistemov. Prispevajo k izboljšanju stanja voda, zmanjšujejo koncentracijo hranil in delcev v vodnem stolpcu (Egertson in sod., 2004). V vodo oddajajo kisik, kar ima prav tako vlogo pri samočistilnem procesu v rekah.

Poleg tega, da zagotavljajo hrano za vodne organizme, tvorijo mikrohabitate za perifiton in vodne živali (Lampert in Sommer, 2007).

## 2.3 REMEDIACIJE

Fitoremediacija je ena izmed oblik bioremediacije, pri kateri uporabljamo rastline za odstranjevanje kovin, organskih kemikalij (bencina, nafte, pesticidov, mazil, topil) oziroma splošno onesnažil iz prsti in vode. Za fitoremediacijske namene uporabljamo rastline, ki hitro pridobivajo na svoji biomasi, imajo sposobnosti velike absorpcije, presnove strupenih molekul v manj škodljive, in imajo sposobnost zmanjšanja števila sintetičnih organskih spojin, ter take, ki so odporne na visoke koncentracije onesnažil (Vrhovšek in Korže, 2007).



Rastlino ali rastline, primerne za fitoremedacijo, izbiramo glede na njene lastnosti, tip tal, rastne razmere in vrsto onesnažila (Korže, 2009).

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1. RASTLINSKE VRSTE**

V poskusu smo gojili 3 vrste makrofitov – preraslolistni dristavec (*Potamogeton perfoliatus* L.), klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum* L.) in navadni rogolist (*Ceratophyllum demersum* L.).

Preraslolistni dristavec iz družine Potamogetonaceae je ukoreninjena in potopljena vrsta. Listi, ki skoraj popolnoma obkrožajo steblo, so dolgi do 6 centimetrov s srčastim dnom. V prerezu je steblo okroglo, brez utorov. Rastlino najdemo tako v rekah, kot tudi jezerih. Pojavi se na začetku rastne sezone in izgine, ko razmere za rast niso več primerne (Martinčič in sod., 2007). Rastline za gojenje smo nabrali v potoku Ižica v bližini naselja Ig na obrobju Ljubljanskega barja.

Klasasti rmanec iz družine Haloragaceae je ukoreninjena in potopljena vrsta. Zraste do višine 2 metrov in je razvejana rastlina. Listi so nameščeni v vretencih, deljeni in rdečkasto obarvani ter tako dolgi ali krajši kot cvetovi (Martinčič in sod., 2007). Cvetovi so v socvetjih, pojavijo se nad gladino vode v mesecih od junija do septembra in so rdečkasto obarvani. Raste v stoječih, počasi tekočih ali celo brakičnih vodah (Martinčič in sod., 2007). Iz vode jemlje hranila in jih vgrajuje v svojo biomaso, hkrati pa izloča toksične polifenole (pirogalično, galično in elagično kislino ter katehin), ki imajo alelopatski učinek na alge, tj. zavira njihovo rast (Wikipedia). Rastline za gojenje smo nabrali v Bohinjskem jezeru.

Navadni rogolist iz družine Ceratophyllaceae je plavajoča vrsta.

Listi so trdi, krhki, ena- do dvakrat vilasto deljeni (imajo 2-4 ščetinaste roglje) in vretenčasto nameščeni vzdolž stebela, ki lahko zraste v dolžino od 30 cm do enega metra. Rastlina prosto plava oziroma se občasno pritrjuje na dno. Raste v stoječih in počasi tekočih vodah (Martinčič in sod., 2007). Rastline za gojenje smo nabrali v Botaničnem vrtu v Ljubljani.

### 3.2. POSKUS

Primerke vrst *P. perfoliatus*, *M. spicatum* in *C. demersum* smo ločeno nasadili v 3 plastične kadi, dimenzij 120 cm x 52 cm x 54 cm, ki držijo 160 litrov vode (**slika 1**). Na dno kadi smo dodali približno 3 centimetre prsti (**slika 2**) ter nanjo posuli 5 centimetrov peska, granulacije 4-8 mm, da smo preprečili dvigovanje prsti. Prst je bila za posajene rastline vir hranil.

Po dveh tednih aklimatizacije rastlin smo v vodo dodali selen v obliki natrijevega selenita ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ). V prvi kadi je bila koncentracija  $20 \mu\text{g Se L}^{-1}$  (nizka koncentracija - Se1), v drugi pa  $10 \text{mg Se L}^{-1}$  (visoka koncentracija - Se2). V tretji kadi smo gojili rastline, kjer je bila voda brez dodanega selena, ki nam je služila kot kontrola. Iz te kadi smo tudi dosajali gojene rastline v kad z visoko koncentracijo selena, kjer so rastline po določenem številu dni propadle.

V četrti kadi je bila voda brez dodanega Se (vsebnost Se je bila pod mejo detekcije).

Koncentracija  $20 \mu\text{g Se L}^{-1}$  je 10 krat višja kot vsebnost selena, katero najdemo v vodotokih, ki tečejo skozi podeželjska področja v Sloveniji, za koncentracijo  $10 \text{mg Se L}^{-1}$  pa smo predvidevali, da bo imela toksični vpliv na poskusne rastline.

Celotna postavitve poskusa je prikazana na **sliki 1**, gojenje rastlin v kadeh pri različnih koncentracijah dodanega Se pa na **slikah 3, 4 in 5**.



Slika 1: Postavitev poskusa



Slika 2: Substrat v kadeh





Slika 3: Levo – poskus z vrsto *C. demersum* v nizki koncentraciji selena (Se1), desno – poskus z vrsto *C. demersum* v visoki koncentraciji selena (Se2)



Slika 4: Levo – poskus z vrsto *M. spicatum* v nizki koncentraciji selena (Se1), desno – poskus z vrsto *M. spicatum* v visoki koncentraciji selena (Se2)



Slika 5: Poskus z vrsto *P. perfoliatus* v nizki koncentraciji selena (Se1)

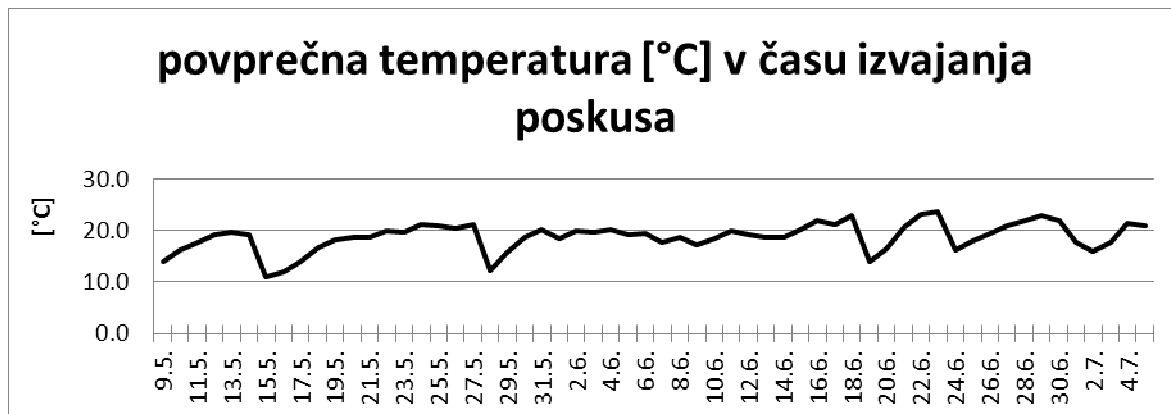
Rastline, ki smo jih gojili v raztopini selena z visoko koncentracijo, smo tik pred propadom pobrali in jih shranili za kasnejše analize vsebnosti selena. Nato smo na novo nasadili rastline iz kadi, napolnjene z vodo brez dodanega selena (kontrola), saj so bile že aklimatizirane in dobro ukoreninjene (razen vrste *C. demersum*) in zabeležili datum.

Rastline, ki smo jih gojili v vodi brez dodanega selena (kontrola) in v raztopini selena z nizko koncentracijo, so zelo dobro uspevale, zato jih ni bilo potrebno dosajati.

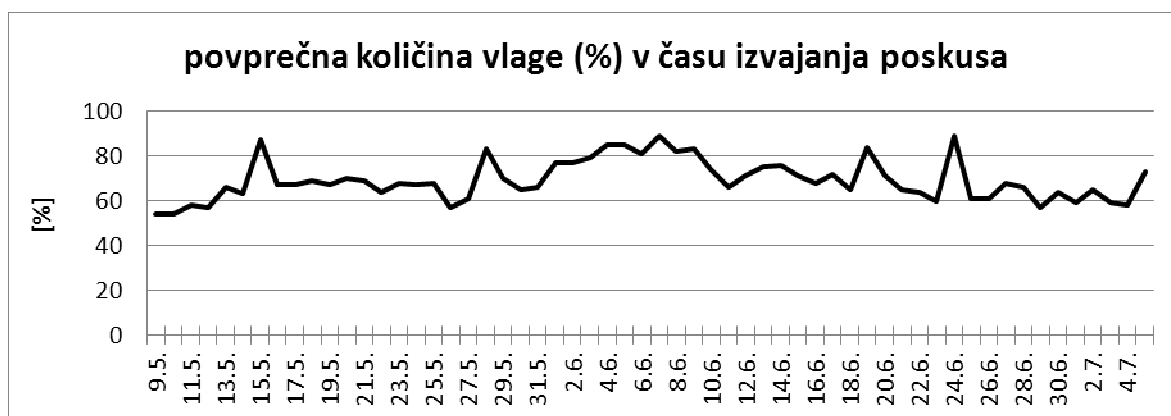
Fiziološke in biokemijske analize na rastlinah, izpostavljenih nizki in visoki koncentraciji selena ter vodi brez dodanega selena (kontrola), smo večinoma opravljali v laboratoriju. Meritve potencialne fotokemične učinkovitosti ( $F_v/F_m$ ) in meritve temperature vode smo opravljali »in situ«.

Koncentracija selena v vodi je bila merjena vsak teden. Nivo vode smo spremljali vsak teden, še posebej po večjem deževju ali sušnem obdobju.

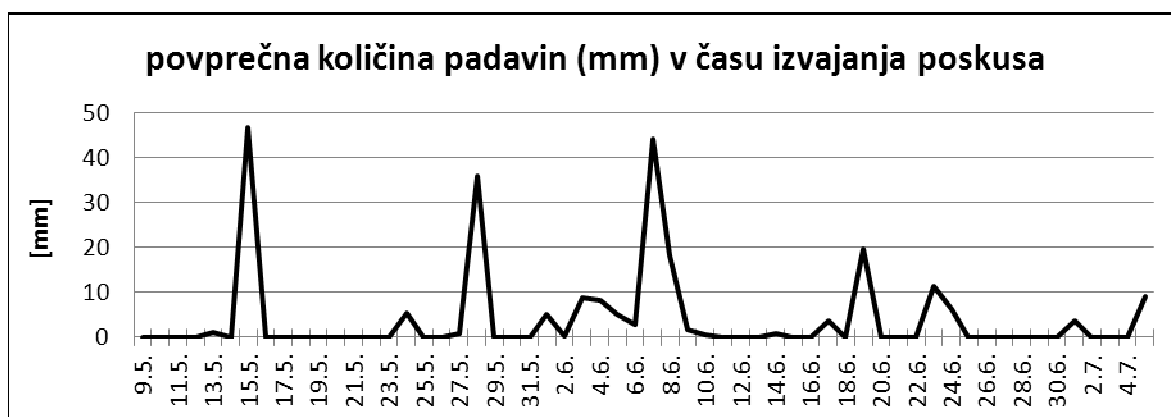
V nadaljevanju so prikazane razmere med trajanjem poskusa. Na spodnjih slikah (**slika 6 in 7**) je prikazana povprečna temperatura za vse dneve (od 9. 5. 2011 do 5. 7. 2011), povprečna vlažnost in količina padavin.



Slika 6: Povprečna temperatura zraka v času trajanja poskusa (vir ARSO)



Slika 7: Povprečna vlažnost zraka v času trajanja poskusa (vir ARSO)



Slika 8: Količina padavin v času trajanja poskusa (vir ARSO)

### 3.3. METODE

Makrofite smo izpostavili različnim koncentracijam selena v vodi. V četrto kad, kjer je bila voda brez dodanega Se (vsebnost Se je bila pod mejo detekcije) smo presajali rastline iz Se2, jih pustili rasti 10 dni, kasneje pa jih ponovno presadili nazaj v Se2. Tako smo spremljali, kako se bodo rastline odzvale na spremembo v koncentraciji selena v okolnem mediju.

V časovnih intervalih smo merili vsebnost fotosinteznih barvil (klorofil *a* in *b*, karotenoidi) in antocianov, potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm) FS II in aktivnost elektronskega transportnega sistema (ETS) na poskusnih rastlinah *P. perfoliatus*, *M. spicatum* in *C. demersum*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, ter na rastlinah izpostavljenim nizki in visoki koncentraciji selena.

Vzporedno s poskusom smo vrsti *M. spicatum* in *C. demersum* po štirih dnevih izpostavljenosti visoki koncentraciji selena (Se2) presadili v vodo brez dodanega selena, kjer je bila vsebnost selena pod mejo detekcije. Tam smo jih pustili 10 dni, nato pa ponovno prestavili v vodo z visoko koncentracijo selena. S presajanjem smo želeli ugotoviti, ali si bo rastlina v čisti vodi opomogla in nadaljevala s svojo rastjo.

Izmerili smo vsebnost fotosinteznih barvil (klorofil *a* in *b*, karotenoidi) in antocianov, potencialno fotokemično učinkovitost in aktivnost ETS pri rastlinah izpostavljenim Se2 po presaditvi v vodo brez dodanega selena in ponovno po presaditvi v Se2.

#### 3.3.1. Fotosintezna barvila

##### Merjenje vsebnosti fotosinteznih barvil (klorofil *a* in *b* in karotenoidi)

Pri vseh preučevanih rastlinah smo vsebnost klorofilov in karotenoidov merili po metodi Jeffrey in Humphrey (1975). V terilnici smo vzorec z znano maso ob dodatku 10 mL acetona zmleli, tako da ni bilo videti več grobih delcev. Vsebino smo prelili v centrifugirko in vzorec centrifugirali (2K15, Sigma) 4 minute pri 4 °C in 4000 rpm. Po centrifugiranju smo vsebino zlili v merilni valj in izmerili volumen vsakega vzorca posebej. S pomočjo

spektrofotometra (Lambda 12, Perkin-Elmer) smo pri različnih valovnih dolžinah (470 nm, 644 nm in 662 nm) izmerili ekstinkcijo. Pri vsaki rastlini smo vzeli 4 vzorce za vsako obravnavanje s Se in kontrolo.

**Formula za izračun klorofila *a*:**

$$kl\ a = (11,24 * E_{662}) - (2,04 * E_{644}) \quad (\text{mg/g SM}) \quad \dots\dots(1)$$

**Formula za izračun klorofila *b*:**

$$kl\ b = (20,13 * E_{644}) - (4,19 * E_{662}) \quad (\text{mg/g SM}) \quad \dots\dots(2)$$

kl *a* klorofil *a*

kl *b* klorofil *b*

E ekstinkcija vzorca pri izbrani valovni dolžini

SM suha masa

**Formula za izračun karotenoidov:**

$$kar = ((1000 * E_{470}) - (1,90 * kl\ a) - (63,14 * kl\ b)) / 214 \quad (\text{mg/g SM}) \quad \dots\dots(3)$$

kar karotenoidi

kl *a* klorofil *a*

kl *b* klorofil *b*

E ekstinkcija vzorca pri izbrani valovni dolžini

SM suha masa



## Merjenje vsebnosti antocianov

Vsebnost antocianov smo določali po metodi Drumm in Mohr (1978). Vzorec z znano maso smo v terilnici ob dodatku 10 mL ekstrakcijskega medija (metanol : HCl = 99 : 1) zmleli. Vsebino smo prefiltrirali skozi filter papir v merilni valj in odčitali volumen ekstrakta. Vzorec smo shranili v hladilnik za 24 ur in naslednji dan izmerili s pomočjo spektrofotometra (Lambda 12, Perkin-Elmer) ekstinkcijo pri 530 nm. Pri vsaki rastlini smo vzeli 4 vzorce, za vsako obravnavanje s Se in kontrolo.

### Izračun antocianinov po formuli:

$$Ant = E_{530} * V * SM^{-1};$$

ali

$$E_{530} * V * P^{-1} \quad (\text{mL/g SM}) \quad \dots\dots(4)$$

Ant	antociani
E	ekstinkcija vzorca pri izbrani valovni dolžini
V	prostornina ekstrakta (mL)
sm	suha masa vzorca (g)
P	površina vzorca (cm <sup>-2</sup> )

### 3.3.2. Meritve potencialne fotokemične učinkovitosti

Fotokemično učinkovitost vseh treh preučevanih rastlin smo merili s pomočjo fluorescence klorofila *a* v FS II (fotosistem II). Fluorescenca je izražena kot količnik variabilne (Fv) in maksimalne (Fm) fluorescence temotno adaptiranega vzorca (Fv/Fm), kjer variabilna fluorescenca predstavlja razliko med maksimalno in minimalno fluorescenco temotno adaptiranega vzorca (Fv = Fm - Fo). Razmerje Fv/Fm je merilo potencialne fotokemične učinkovitosti FS II in je sorazmerno neto fotosintezi (Krause in Weis, 1991). Razmerje Fv/Fm dosega optimalne vrednosti okrog 0,83. Nižje vrednosti nakazujejo na izpostavljenost rastline stresu, ki se odraža v fotoinhibiciji (Maxwell in Johnson, 2000).

Meritve so potekale s pomočjo modulacijskega fluorometra (PAM 2100). Pred merjenjem potencialne fotokemične učinkovitosti smo na list pritrdili ščipalke za temotno adaptacijo. Po 10 minutah adaptacije smo list osvetlili s saturacijskim pulzom bele svetlobe ( $8000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 0.8 s).

### 3.3.3. Aktivnost elektronskega transportnega sistema (ETS)

Aktivnost ETS smo merili po metodi, ki jo je razvil Packard (1971).

Vzorec z znano maso smo v terilnici homogenizirali ob dodatku 4 mL homogenizacijskega pufru (fosfatni pufer +  $\text{MgSO}_4$  + polivinil pirolidon – PVP + triton x-100). Homogenat smo prelili v epruvete, hlajene na ledu. S pomočjo ultrazvočnega homogenizatorja smo 20 sekund homogenizirali vsak vzorec. Vsebino smo prelili v centrifugirke in homogenat centrifugirali 4 minute pri  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  na 10.000 obratih. Supernatant smo prelili v stekleno epruveto. Iz te epruvete smo po 0,5 mL odpipetirali v tri epruvete (aliquote). Vsaki epruveti smo nato dodali še 1,5 mL substrata (fosfatni pufer + NADH + NADPH + triton x-100), tudi v slepi vzorec, ter 0,5 mL INT (jodonitrotetrazolijevega klorid) tudi v slepi vzorec. Vse skupaj smo premešali in inkubirali 40 minut pri  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  v temnem prostoru. Po koncu inkubacije smo dodali še 0,5 mL stop raztopine ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  :  $\text{HCHO}$  = 1:1) v vse štiri epruvete, tudi v slepi vzorec, v katerega smo na koncu dodali 0,5 mL prvotnega supernatanta, ki je ostal po centrifugiranju.

S spektrofotometrom (Lambda 12, Perkin-Elmer) smo izmerili absorpcijo pri 490 nm.

$$\text{aktivnost ETS} = \frac{\text{Abs}^{490 \text{ nm}} * V_r * V_h * 60}{V_a * S * t * 1,42 * 1000} \quad (\mu\text{L}(\text{O}_2)\text{mg}^{-1}(\text{SM})\text{h}^{-1}) \quad \dots\dots(5)$$

Abs490nm	absorpcija vzorca
V <sub>r</sub>	končni volumen reakcijske zmesi (3 ml)
V <sub>h</sub>	volumen osnovnega homogenata (4 ml)
V <sub>a</sub>	volumen inkubiranega homogenata (0,5 ml)
S	velikost vzorca (g suhe mase)
t	čas inkubacije (40 min)
1,42	faktor pretvorbe v volumen O <sub>2</sub> (Kenner in Ahmed, 1975)

### 3.3.4. Merjenje temperature vode in višina vode v kadeh s poskusnimi rastlinami

Redno smo spremljali temperaturo vode pri vsaki vrsti posebej, s pomočjo metra pa tudi višino, da smo ob potrebi dodali vodo (zaradi izhlapevanja) ali jo odvzeli (deževje). Koncentracija Se v vsaki posodi posebej je bila merjena, kot je opisano v Mechora et al. (2012).

### 3.3.5. Statistična obdelava pridobljenih rezultatov

S pomočjo programa Statgraphic Plus 4.0 smo primerjali značilnost vplivov Se na merjene parametre znotraj posamezne vrste.

Značilne razlike smo iskali z enosmerno in multifaktorsko ANOVO. Grafično predstavljeni rezultati, ki so označeni z enakimi črkami, se med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Razlike smo določili s pomočjo *Multiple Range* testov v programu Statgraphics Plus 4.0.

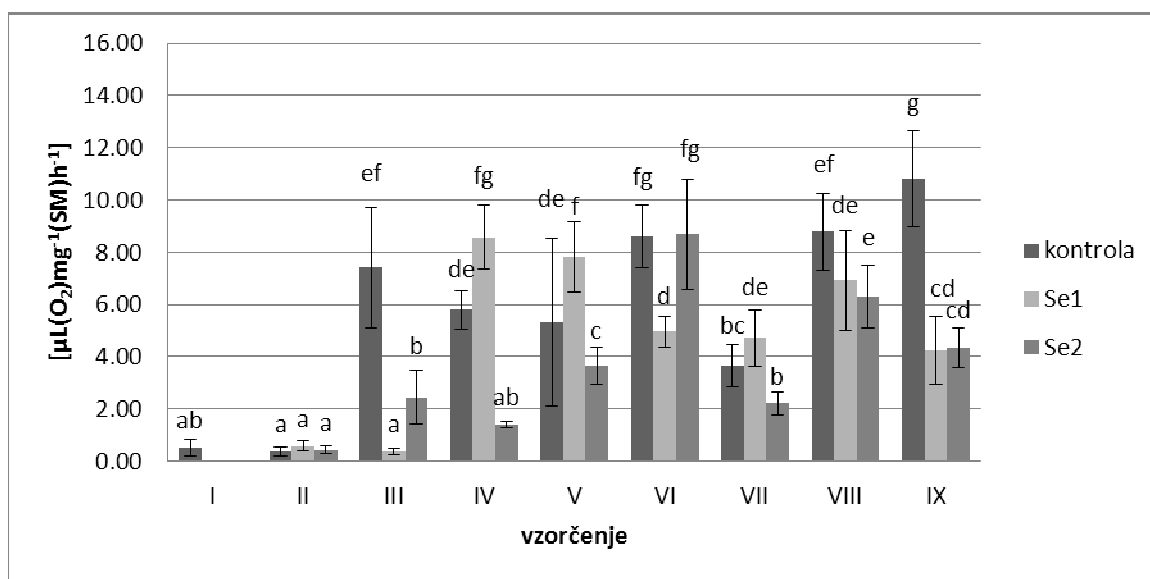
### 3.3.6. Dnevi vzorčenja

Tabela 1: Izvajane meritve na gojenih rastlinah.

<b>VZORČENJE</b>	<b>DAN VZORČENJA</b>
I	9. 5. 2011
II	17. 5. in 20. 5. 2011
III	27. 5. in 30. 5. 2011
IV	3. 6. in 6. 6. 2011
V	10. 6. in 13. 6. 2011
VI	17. 6. in 20. 6. 2011
VII	21. 6. in 23. 6. 2011
VIII	27. 6. in 28. 6. 2011
IX	4. 7. in 5. 7. 2011

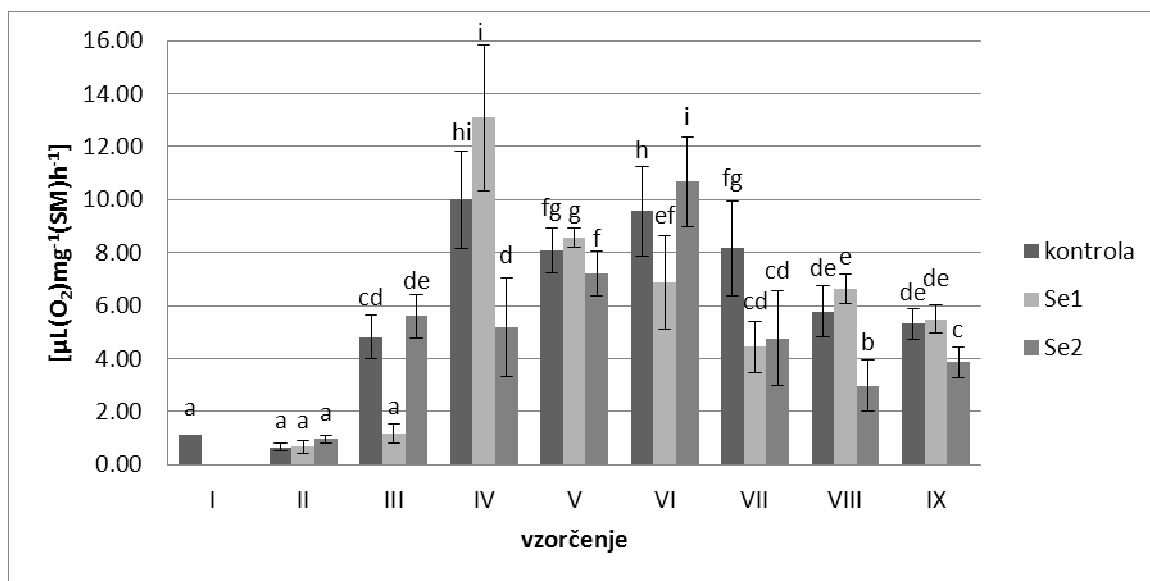
## 4. REZULTATI

### 4.1. AKTIVNOST ELEKTRONSKEGA TRANSPORTNEGA SISTEMA (ETS)



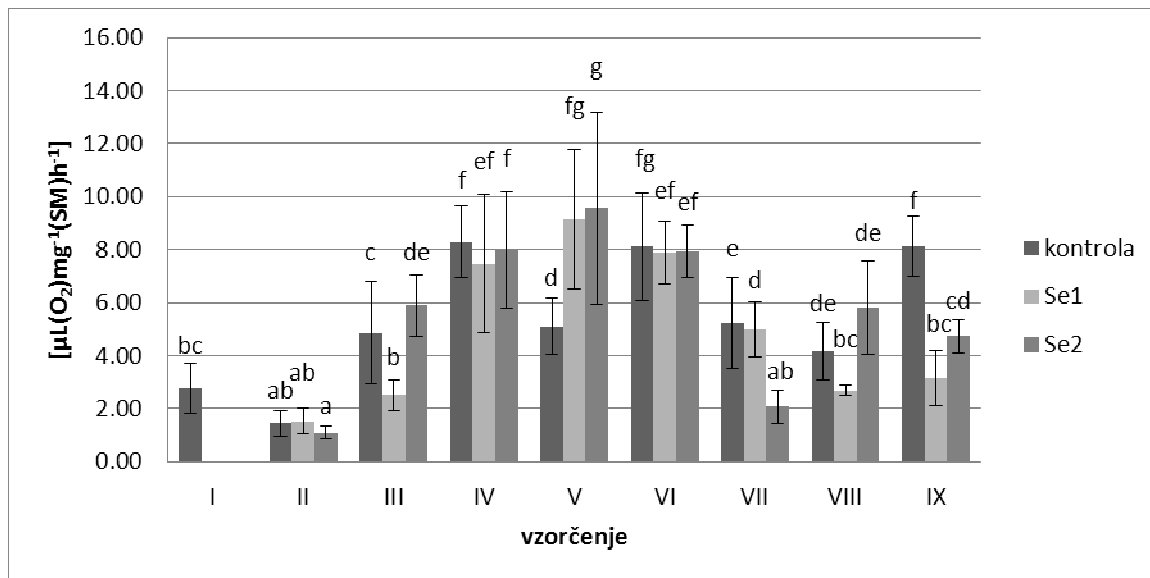
Slika 9: Aktivnost ETS pri vrsti *P. perfoliatus* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki koncentraciji (Se2) selena v vodi ob različnih vzorčevanjih. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

Primerjava aktivnosti ETS rastlin vrste *P. perfoliatus*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, je pokazala statistično značilne razlike v III., IV., V., VI., VII. in IX. vzorčenju (slika 9). Primerjava aktivnosti ETS z rastlinami v kontrolnih razmerah in rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike v III., IV., V. in IX. vzorčenju. Primerjava aktivnosti ETS rastlin, izpostavljenih Se1, in rastlin, izpostavljenih Se2, je pokazala, da so bile statistično značilne razlike prisotne v III., IV., V., VI. in VII. vzorčenju. V primerjalno analizo nista bili vključeni I. in II. vzorčenje.



Slika 10: Aktivnost ETS pri vrsti *M. spicatum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

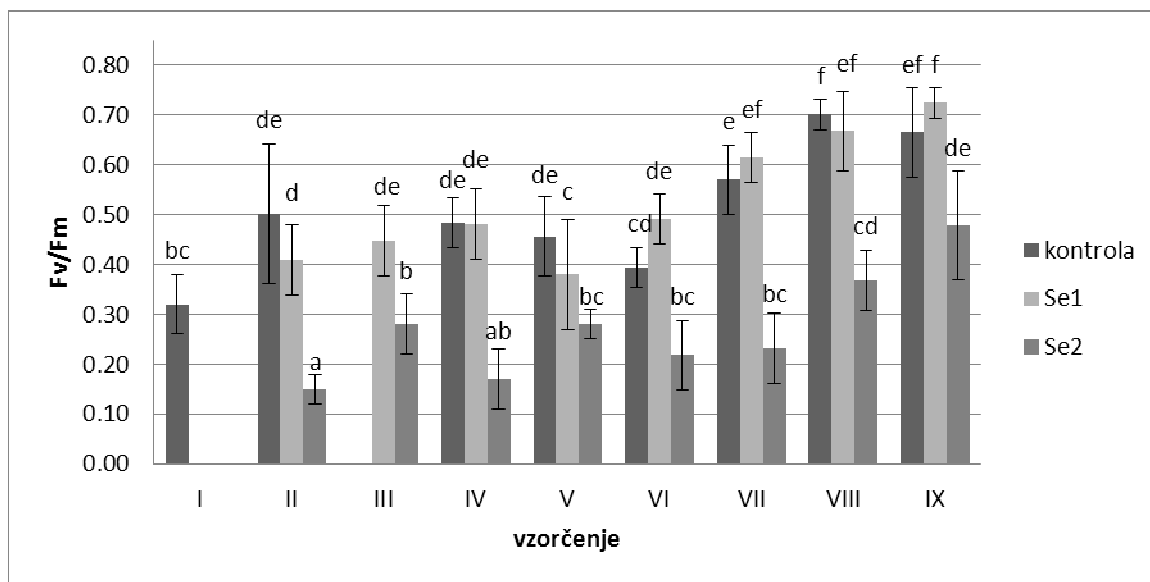
Primerjava aktivnosti ETS rastlin vrste *M. spicatum*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, je pokazala statistično značilne razlike v III., VI. in VII. vzorčenju (slika 10). Primerjava aktivnosti ETS z rastlinami v kontrolnih razmerah in rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike, prisotne v IV., VI., VII., VIII., in IX. vzorčenju. Primerjava aktivnosti ETS rastlin, izpostavljenih Se1, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala, da so bile statistično značilne razlike v III., IV., V., VI. in VIII. vzorčenju. V primerjalno analizo nista bili vključeni I. in II. vzorčenje.



Slika 11: Aktivnost ETS pri vrsti *C. demersum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

Primerjava aktivnosti ETS rastlin vrste *C. demersum*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, je pokazala statistično značilne razlike v III., V., VII., VIII. in IX. vzorčenju (slika 11). Primerjava aktivnosti ETS z rastlinami v kontrolnih razmerah in rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike prisotne v III., V., VII. in IX. vzorčenju. Primerjava aktivnosti ETS rastlin, izpostavljenih Se1, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike v III. VII. in VIII. vzorčenju.

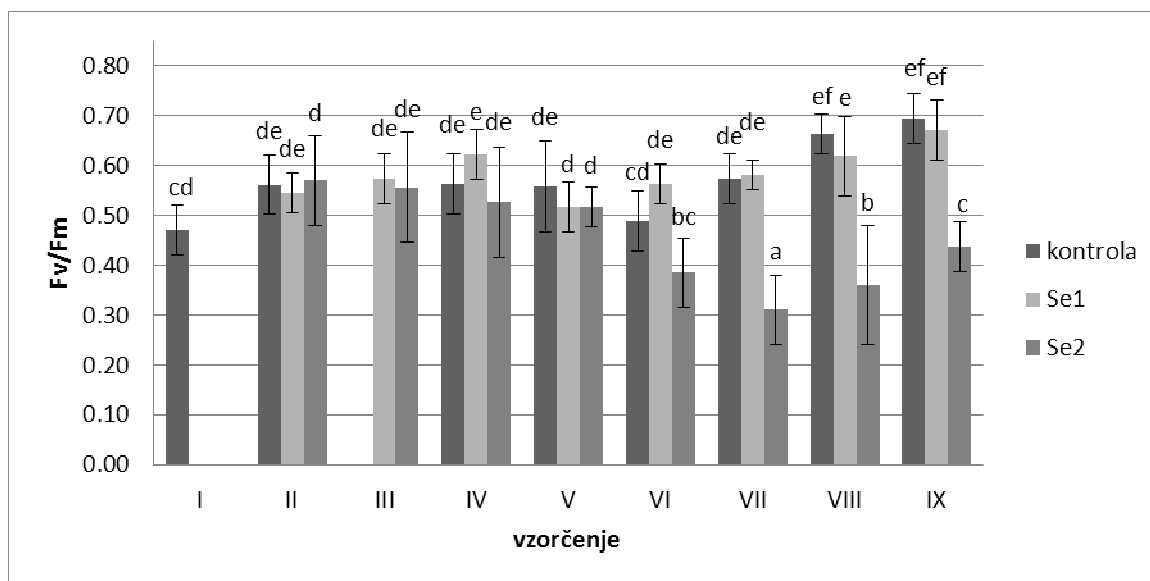
## 4.2. POTENCIALNA FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST (Fv/Fm)



Slika 12: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti *P. perfoliatus* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

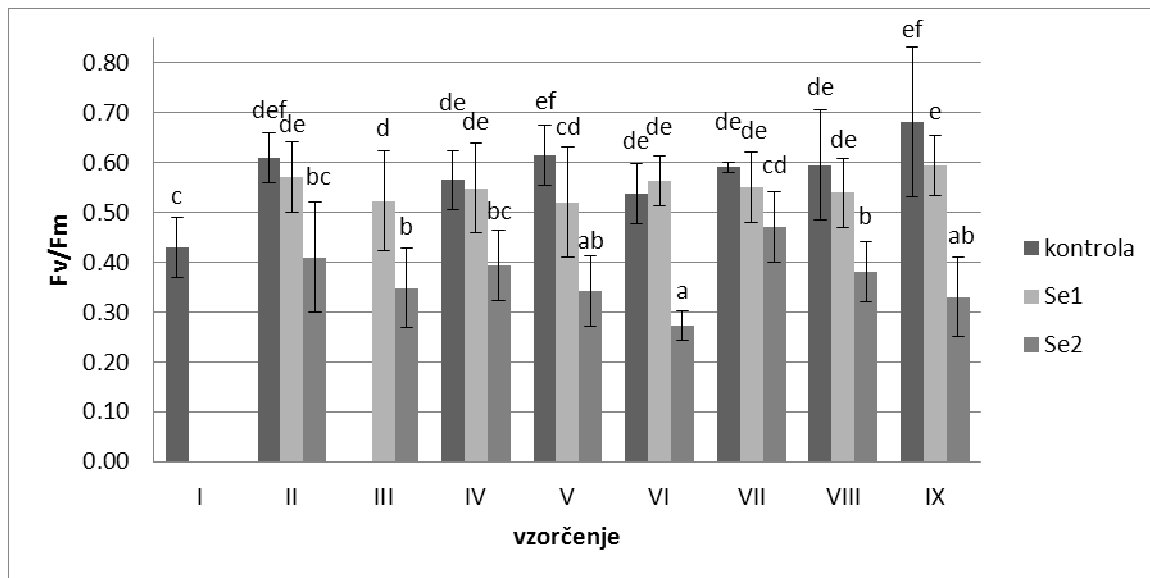
Primerjava rastlin vrste *P. perfoliatus*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, je pokazala statistično značilne razlike v potencialni fotokemični učinkovitosti le v V. vzorčenju (slika 12), ko pa smo primerjali rastline iz kontrole z rastlinami, izpostavljenimi Se2, so bile statistično značilne razlike prisotne v II., IV., V., VII. in VIII. vzorčenju. Primerjava rastlin, izpostavljenih Se1, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike v II., III., IV., VI., VII., VIII. in IX. vzorčenju. Fotokemična učinkovitost pri tej vrsti je bila značilno nižja pri rastlinah, izpostavljenih Se2, v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, in rastlinami, izpostavljenimi Se1.





Slika 13: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti *M. spicatum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

Primerjava rastlin vrste *M. spicatum*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, ni pokazala statistično značilne razlike v potencialni fotokemični učinkovitosti v nobenem od vzorčenj (slika 13). Primerjava rastlin, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, je pokazala statistično značilne razlike v VII., VIII. in IX. vzorčenju. Ko pa smo primerjali rastline, izpostavljene Se1, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, so bile statistično značilne razlike prisotne v VI., VII., VIII. in IX. vzorčenju.



Slika 14: Potencialna fotokemična učinkovitost pri vrsti *C. demersum* v kontrolnih razmerah in pri nizki (Se1) ter visoki (Se2) koncentraciji selena v vodi. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$ SD

Primerjava rastlin vrste *C. demersum*, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se1, je pokazala statistično značilne razlike v potencialni fotokemični učinkovitosti le v V. vzorčenju (slika 14). Ko pa smo primerjali rastline, ki so uspevale v kontrolnih razmerah, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, so bile statistično značilne razlike prisotne v II., IV., V., VI., VIII. in IX. vzorčenju. Podobno je bilo tudi v primeru, ko smo primerjali rastline, izpostavljene Se1, z rastlinami, izpostavljenimi Se2, saj so bile statistično značilne razlike v II., III., IV., V., VI., VIII., IX. vzorčenju.

Pri vseh treh rastlinah se kaže težnja po dvigovanju  $F_v/F_m$  v zadnjih 4 merjenjih pri rastlinah, ki so uspevale v kontroli in pri vrstah *P. perfoliatus* ter *M. spicatum* tudi pri primerkih, ki so bili izpostavljeni Se1.

### 4.3. FOTOSINTEZNA BARVILA

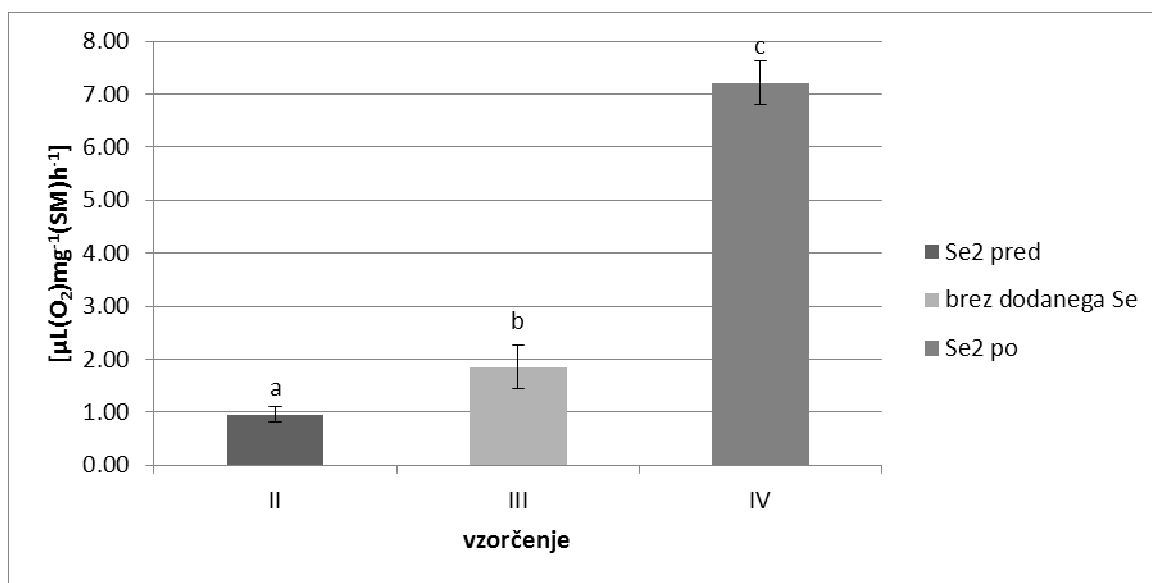
Vpliv selena na fotosintezna barvila je bil minimalen. Pri vrsti *M. spicatum* dodani selen ni imel jasnega vpliva na vsebnost klorofila *a* in *b*. Pri vrsti *C. demersum* je vrednost klorofila *a* in *b* v večini primerov višja pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Pri rastlinah, izpostavljenih Se2, ni bilo jasnega vzorca upadanja ali naraščanja vsebnosti klorofila *a* in *b* v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Pri vrsti *P. perfoliatus* je vrednost klorofila *a* podobna vrednosti pri rastlinah, ki so uspevale v kontrolnih razmerah in rastlinah, izpostavljenih Se1 in Se2. Vsebnost klorofila *b* je pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v večini primerov višja v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah (priloga 1, priloga 2). Vsebnost karotenoidov je bila v večini primerov višja pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah pri vrsti *P. perfoliatus*. Pri ostalih vrstah selen ni imel bistvenega vpliva na vsebnost karotenoidov (priloga 3).

### 4.4. ANTOCIANI

Rastline, izpostavljene Se2 pri vrsti *P. perfoliatus*, so imele v večini primerov višjo vsebnost antocianov kot rastline, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Selen ni imel bistvenega vpliva na vsebnost antocianov pri vrstah *M. spicatum* in *C. demersum* (priloga 4).

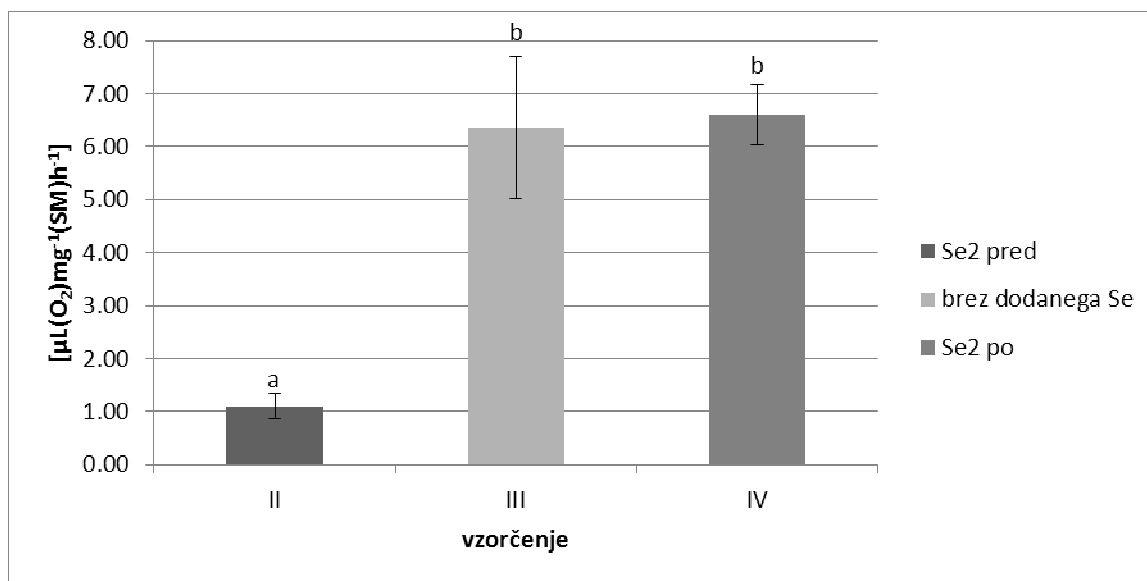
## 4.5. UČINKI PRESAJANJA RASTLIN, GOJENIH V Se<sub>2</sub>, V VODO BREZ DODANEGA Se IN NAZAJ V VODO Se<sub>2</sub>

### 4.5.1. Aktivnost elektronskega transportnega sistema (ETS)



Slika 15: Aktivnost ETS pri vrsti *M. spicatum* v raztopini Se<sub>2</sub>, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se<sub>2</sub>. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. **Se<sub>2</sub> pred** – rastline, gojene v raztopini Se<sub>2</sub>, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se<sub>2</sub> po** – rastline, gojene v raztopini Se<sub>2</sub>, po presajanju iz vode brez dodanega selena

Pri vrsti *M. spicatum* je prišlo do statistično različnih rezultatov pri meritvah aktivnosti ETS. Ko je bila rastlina izpostavljena Se<sub>2</sub>, je imela dihalni potencial nizek. Po izpostavitvi v vodi brez dodanega selena in ponovni presaditvi v Se<sub>2</sub> si je rastlina v tem času nabrala dovolj zaloge in energije, da se je na stresne razmere odzvala s povečanim dihalnim potencialom (slika 15).

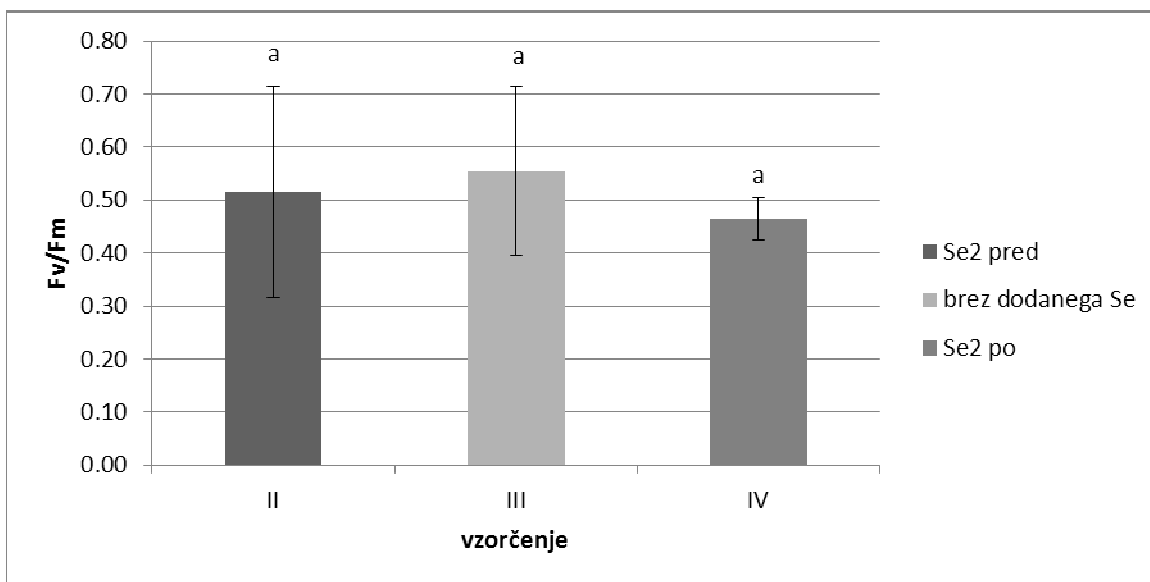


Slika 16: Aktivnost ETS pri vrsti *C. demersum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. **Se2 pred** – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se2 po** – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena

Primerjava rastlin vrste *C. demersum*, ki so rasle v različnih razmerah, je pokazala statistično značilne razlike v aktivnosti ETS med rastlinami, gojenimi v Se2, in rastlinami po prenosu v vodo brez dodanega selena, ter po ponovnem prenosu v Se2.

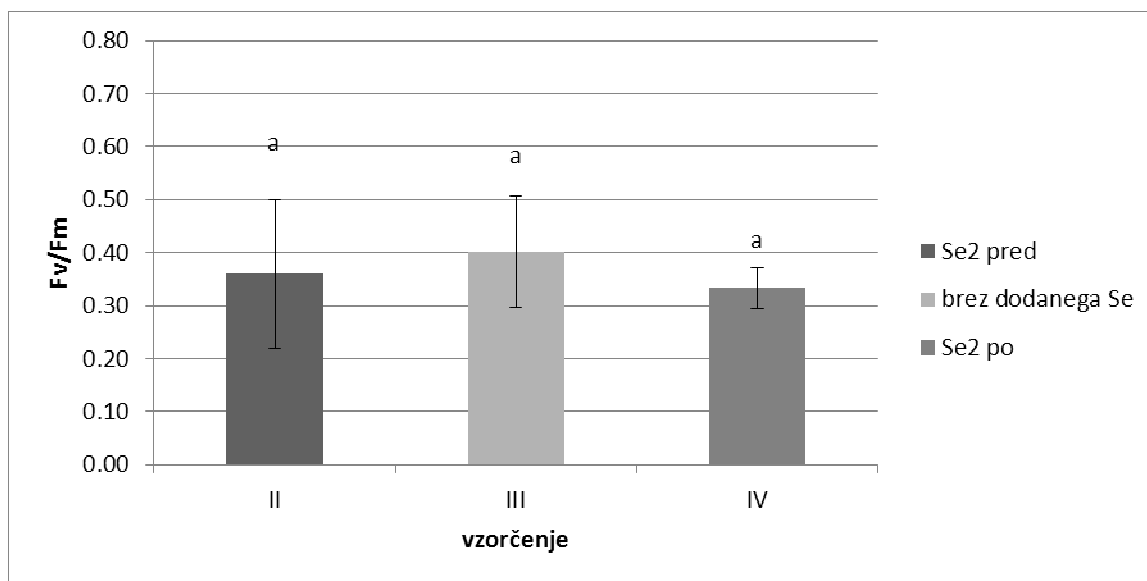
Na začetku je bila rastlina zelo pod stresom, posledično je bil njen dihalni potencial nizek, po presaditvi pa si je opomogla in tako povečala svoj dihalni potencial. Kljub temu, da smo jo presadili nazaj v Se2, je ohranila dovolj energije in posledično visoko metabolno aktivnost.

#### 4.5.2. Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv/Fm)



Slika 17: Potencialna fotokemična učinkovitost FS II pri vrsti *M. spicatum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. **Se2 pred** – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se2 po** – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena

Pri rastlinski vrsti *M. spicatum* ni prišlo do statistično značilnih razlik v potencialni fotokemični učinkovitosti med obravnavanjem. Zaradi povečanega dihalnega potenciala je rastlina med presajanju ohranjala ves čas isti nivo fotokemične učinkovitosti.



Slika 18: Potencialna fotokemična učinkovitost FS II pri vrsti *C. demersum* v raztopini Se2, nato po prenosu v vodo brez dodanega selena in ponovno v raztopino Se2. Stolpci, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj. Rezultati so podani kot srednja vrednost  $\pm$ SD. **Se2 pred** – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se2 po** – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena

Pri rastlinski vrsti *C. demersum* ni prišlo do statistično značilnih razlik v potencialni fotokemični učinkovitosti med obravnavanjem. Podobno kot pri prejšnji vrsti, je rastlina ohranjala fotokemično učinkovitost.

#### 4.5.3. Klorofil *a* in klorofil *b*, karotenoidi in antociani

Tabela 2: Klorofil *a* in *b*, izmerjeni najprej pri rastlinah, ki so uspevale v vodi z visoko koncentracijo selena, nato po presajanju v čisto vodo, in v vodi z visoko koncentracijo selena.

	enote	klorofil <i>a</i>			klorofil <i>b</i>		
		[mg/g SM]			[mg/g SM]		
vrsta	vzorčenje	II	III	IV	II	III	IV
<i>M. spicatum</i>	Se2 pred	0,52 ± 0,26 <sup>a</sup>			0,83 ± 0,45 <sup>a</sup>		
	brez dodanega Se		1,12 ± 0,13 <sup>b</sup>			0,54 ± 0,08 <sup>a</sup>	
	Se2 po			0,81 ± 0,17 <sup>ab</sup>			0,33 ± 0,10 <sup>a</sup>
<i>C. demersum</i>	Se2 pred	0,82 ± 0,12 <sup>a</sup>			0,59 ± 0,12 <sup>a</sup>		
	brez dodanega Se		0,44 ± 0,13 <sup>a</sup>			0,27 ± 0,11 <sup>a</sup>	
	Se2 po			0,84 ± 0,22 <sup>a</sup>			0,64 ± 0,40 <sup>a</sup>

**Se2 pred** – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se2 po** – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena. Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, podani z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj.



Tabela 3: Karotenoidi in antociani, izmerjeni najprej pri rastlinah, ki so uspevale v vodi z visoko koncentracijo selena, nato po presajanju v čisto vodo, in v vodi z visoko koncentracijo selena.

vrsta	vzorčenje	karotenoidi			antociani		
		[mg/g SM]			[mL/g SM]		
	enote	II	III	IV	II	III	IV
<i>M. spicatum</i>	Se2 pred	0,90 ± 0,21 <sup>b</sup>			160 ± 10 <sup>b</sup>		
	brez dodanega Se		0,37 ± 0,06 <sup>a</sup>			59 ± 36 <sup>a</sup>	
	Se2 po			0,38 ± 0,03 <sup>a</sup>			130 ± 71 <sup>b</sup>
<i>C. demersum</i>	Se2 pred	0,44 ± 0,05 <sup>a</sup>			-		
	brez dodanega Se		0,20 ± 0,07 <sup>a</sup>			37 ± 15 <sup>a</sup>	
	Se2 po			0,33 ± 0,04 <sup>a</sup>			220 ± 45 <sup>b</sup>

**Se2 pred** – rastline, gojene v raztopini Se2, pred presajanjem v vodo brez dodanega selena. **Se2 po** – rastline, gojene v raztopini Se2, po presajanju iz vode brez dodanega selena. Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, podani z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med seboj.

Pri rastlinski vrsti *C. demersum* presajanje iz Se2 v vodo brez dodanega selena ter nazaj v Se2 ni imelo vpliva na vsebnost fotosinteznih barvil. Vsebnost antocianov je bila statistično značilno višja pri rastlinah, ki so bile ponovno presajene v Se2 (tabela 2).

Rastline, ki so uspevale v Se2 pred presajanjem, so imele statistično značilno nižjo vsebnost klorofila *a* pri vrsti *M. spicatum*, kot rastline, gojene v vodi brez dodanega Se. Na klorofil *b* presajanje iz Se2 v vodo brez dodanega Se in nazaj v Se2 ni imelo vpliva (tabela 2).

Vsebnost karotenoidov pri vrsti *M. spicatum* je bila nižja pri rastlinah, gojenih v Se2 pred presaditvijo v vodo brez dodanega selena v primerjavi z rastlinami, gojenimi v vodi brez

dodanega selena in ponovno presajenimi v Se2 (tabela 2). Razlike so bile statistično značilne. Vsebnost antocijanov pri isti vrsti je bila najnižja pri rastlinah, ki so uspevale v vodi brez dodanega selena. Razlike so bile statistično značilne (tabela 2).

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. USPEVANJE RASTLIN PRI RAZLIČNIH OBRAVNAVANJIH S Se

Rastline, ki so uspevale v kadeh brez dodanega Se (kontrola), in rastline, ki so bile izpostavljene Se1, so uspešno rasle od začetka do konca poskusa.

Pri Se2 tretmaju so se negativni učinki najhitreje pokazali pri vrsti *P. perfoliatus*, znaki propadanja so se pokazali že po štirih oziroma šestih dnevih izpostavljenosti. Nekoliko dlje časa je preživela vrsta *C. demersum*, saj se je njeno propadanje pokazalo med petimi in enajstimi dnevi izpostavljenosti. Najdlje je v vodi s Se2 preživela vrsta *M. spicatum* (16 dni).

To je v skladu s dosedanjimi raziskavami, ki kažejo, da so rastline s celimi listi so bolj občutljive na selenit v primerjavi z rastlinami, ki imajo razcepljene liste (Mechora in sod., 2012).

### 5.2. VPLIV Se NA DIHALNI POTENCIAL

Raziskav vpliva selena na dihalni potencial pri vodnih rastlinah še ni bilo objavljenih, saj so večino raziskav izvedli na gojenih terestričnih rastlinah, npr. na: zelju (Radešček, 2011), stročnicah (Celan Gabor, 2008) in tatarski ajdi (Štrekelj, 2009). Radešček s sod. (2011) so ugotovili, da dodani selen (za zeleno zelje 20 mg Se L<sup>-1</sup> in za rdeče zelje 0,5 mg Se L<sup>-1</sup>) ni bistveno vplival na dihalni potencial rastlin.

V našem poskusu se je največ statistično značilnih razlik v dihalnem potencialu med rastlinami, izpostavljenimi kontrolnim razmeram in Se2, pokazalo pri rastlinskih vrstah *P.*

*perfoliatus* in *M. spicatum*; v večini primerov je bil dihalni potencial statistično višji pri rastlinah, ki so uspevale v kontroli, v primerjavi z rastlinami, ki so bile izpostavljene Se<sub>2</sub>. Dodani selen ni imel jasnega vpliva na dihalni potencial pri vrsti *C. demersum*.

Razlog za nižanje dihalnega potenciala pri rastlinah, obravnavanih s Se<sub>2</sub>, je verjetno v strupenosti selena, kar je povzročilo moten prehod elektronov v dihalni verigi (Stibilj in sod., 2004). Predvidevamo, da so bili vplivi na rastlino preveliki, da bi jih rastlina lahko ublažila. Nizek dihalni potencial kaže, da rastlina verjetno ni imela dovolj razpoložljive energije (Gaberščik, 2003). Nižja aktivnost ETS oziroma nižji dihalni potencial pri preučevanih rastlinah, obravnavanih s Se<sub>2</sub>, je lahko posledica znižane dihalne encimatske zmogljivosti (Smrkolj in sod., 2006). Selen zaradi svoje kemijske podobnosti z žveplom lahko vstopi v rastlinsko celico in se veže na mesto žvepla v aminokislini (Met, Cys) ter tvori analogne spojine, selenoaminokislino (SeMet, SeCys). Nastale selenoaminokislino spremenijo obliko proteinov in njihovo katalitično aktivnost (Terry in sod., 2000). Nižjo aktivnost ETS sta Mechora in Germ (2010) opazili tudi pri stročnici *Glycine max*, obravnavani s selenom.

### 5.3. VPLIV Se NA FOTOKEMIČNO UČINKOVITOST FS II

V primerjavi z vrstama *M. spicatum* in *C. demersum* so bile najnižje izmerjene vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti FS II izmerjene pri vrsti *P. perfoliatus*. Predvidevamo, da so vrste, ki nimajo deljenih listov, do dodatka selena v vodi manj strpne od tistih, ki imajo liste deljene. Pri vitalnih rastlinah, ki rastejo v ugodnih razmerah in niso izpostavljene stresu, je razmerje  $F_v/F_m$  0,8–0,83, kar je teoretični maksimum pri kopenskih rastlinah (Schreiber in sod., 1995). Rastline, ki so bile izpostavljene visoki koncentraciji selena, so imele statistično značilno najnižjo fotokemično učinkovitost FS II. Selen je imel torej negativen vpliv na potencialno fotokemično učinkovitost pri vseh vrstah.

Težnja upadanja potencialne fotokemične učinkovitosti ob dodajanju selena v vodo pri vrstah *M. spicatum* in *C. demersum* je že bila dokazana (Mechora in sod., 2011). Naši rezultati kažejo, da so bile rastline, izpostavljene Se, pod stresom. Germ in sod. (2005) so merili vpliv UV-B sevanja in selena na potencialno fotokemično učinkovitost, dihalni

potencial in pridelek buč (*Cucurbita pepo*). Dodatek selena ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) je ublažil negativen učinek UV-B sevanja na višino pridelka.

#### 5.4. BIOKEMIJSKE LASTNOSTI

Vpliv selena na fotosintezna barvila je bil minimalen. Pri vrsti *M. spicatum* dodani selen ni kazal jasnega vpliva na vsebnost klorofila *a* in *b*. Pri vrsti *C. demersum* je vrednost klorofila *a* in *b* v večini primerov višja pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Pri rastlinah, izpostavljenih Se2, ni bilo jasnega vzorca upadanja ali naraščanja vsebnosti klorofila *a* in *b* v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Pri vrsti *P. perfoliatus* je vrednost klorofila *a* podobna vrednosti pri rastlinah, ki so uspevale v kontrolnih razmerah in rastlinah, izpostavljenih Se1 in Se2. Vsebnost klorofila *b* je pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v večini primerov višji v primerjavi z rastlinami, ki so uspevale v kontrolnih razmerah.

Naši rezultati se skladajo z rezultati Mechore in sod. (2011). V raziskavi so *M. spicatum* in *C. demersum* izpostavili dvema koncentracijama selenata. Ugotovili so, da dodani selen ni imel vpliva na vsebnost fotosinteznih barvil.

Večji vpliv selena na fotosintezna barvila je bil ugotovljen pri obravnavanju s kovinami (Delamil in sod. 2011; Mishra in sod., 2009; Sivaci in sod., 2004). Vsebnost karotenoidov je bila v večini primerov višja pri rastlinah, izpostavljenih Se1, v primerjavi s kontrolo pri vrsti *P. perfoliatus*. Pri ostalih vrstah selen ni imel bistvenega vpliva na vsebnost karotenoidov. Prav tako so rahlo zvišanje vsebnosti karotenoidov opazili Delmail in sod. (2011) pri vrsti *Myriophyllum alterniflorum*. Porast karotenoidov lahko pripišemo zaščitni vlogi, saj karotenoidi pri rastlinah, izpostavljenih stresu, varujejo klorofil pred poškodbami (Lichtenthaler in Buschmann, 2001a in 2001b).

Rastline, izpostavljene Se2 pri vrsti *P. perfoliatus*, so imele v večini primerov višjo vsebnost antocianov kot rastline, ki so uspevale v kontrolnih razmerah. Selen ni imel bistvenega vpliva na vsebnost antocianov pri vrstah *M. spicatum* in *C. demersum*. Visoke vsebnosti antocianov bi lahko bile znak, da je rastlina pod stresom (Winkel-Shirley, 2002).

Pri vrstah *P. perfoliatus* in *C. demersum* smo opazili tudi številne nekroze na listih, kar pomeni da sta vrsti bolj občutljivi na visoko koncentracijo selena kot vrsta *M. spicatum*. Na občutljivost vrste *P. perfoliatus* so pokazali tudi rezultati meritev fotokemične učinkovitosti Fv/Fm in najnižja vsebnost klorofilov *a* in *b* ter karotenoidov.

## 5.5. SPREMEMBA KONCENTRACIJ Se V MEDIJU

V literaturi ni podatkov o tem, kako se vodne rastline odzovejo na visoko koncentracijo selena v mediju (Se<sub>2</sub>) ter na presaditev v medij brez dodanega selena in kasneje nazaj v medij z visoko koncentracijo selena. Zanimalo nas je, ali se rastline po tem, ko jih presadimo v vodo brez dodanega selena opomorejo od stresa, ki ga je povzročil selen in kako se bodo rastline odzvale na ponovno izpostavitev Se<sub>2</sub>. Vsaka sprememba v okoljskih parametrih zahteva prilagoditev metabolizma pri rastlinah (Larcher, 2003).

Rastline vrste *M. spicatum*, izpostavljene Se<sub>2</sub>, so bile pod stresom in niso imele dovolj razpoložljive energije, kar je razvidno iz nizkih vrednosti dihalnega potenciala, posledično pa niso bile sposobne vzpostaviti popravljalnih mehanizmov. Po presaditvi rastlin v vodo brez dodanega selena so si rastline opomogle, saj so si s pomočjo povečanega dihalnega potenciala zagotovile energijo. Dihalni potencial se je kasneje po ponovni presaditvi v raztopino Se<sub>2</sub> še povečal, s tem se je povečala razpoložljiva energija, kar je rastlini omogočalo vzpostavitev popravljalnih mehanizmov. Fotokemična učinkovitost se ni bistveno spreminjala pri rastlinah, ki smo jih presajali iz Se<sub>2</sub> v kontrolo in nazaj v Se<sub>2</sub>. Vsebnost klorofila *a* je bila najvišja pri rastlinah, ki so uspevale v vodi brez dodanega selena, medtem ko je bila vsebnost karotenoidov najvišja pri rastlinah, ki so bile prvič izpostavljene Se<sub>2</sub>. Vsebnost antocianov je bila najvišja pri rastlinah, ki so bile dvakrat izpostavljene Se<sub>2</sub>. Antociani predstavljajo za rastline »najbolj poceni« zaščito (Winkel-Shirley, 2002).

Rastline vrste *C. demersum*, izpostavljene Se<sub>2</sub>, so bile verjetno tudi pod stresom, saj so imele nizek dihalni potencial. Po presaditvi v vodo brez dodanega selena so si zelo hitro opomogle. Kasneje, ko smo jih ponovno presadili nazaj v Se<sub>2</sub>, so imele dovolj visok nivo energije za zagotavljanje visoke metabolne aktivnosti. Tudi v primeru vrste *C. demersum*

se fotokemična učinkovitost ni bistveno spreminjala. Vsebnost antocianov pri rastlinah, ki smo jih ponovno izpostavili Se<sub>2</sub>, je skoraj 6-krat večja kot pri rastlinah, ki so uspevale v vodi brez dodanega selena. Podobno kot pri prejšni vrsti lahko zaključimo, da antociani predstavljajo za rastline učinkovito zaščito pred premočnim sevanjem (Winkel-Shirley, 2002).

Menjavanje koncentracij Se v vodi, kjer so uspevale rastline, je povzročilo spremembe v metabolizmu rastlin, kar smo izmerili s pomočjo meritev dihalnega potenciala na osnovi meritev aktivnosti ETS. Rezultati so v skladu s podatki iz literature. Larcher (2003) namreč poroča, da spremembe v okoljskih parametrih zahtevajo prilagoditve v metabolizmu pri rastlinah.

## 6. POVZETEK

Tri vrste vodnih rastlin smo izpostavili različnim koncentracijam selena (voda brez dodanega selena,  $20 \mu\text{g Se L}^{-1}$  – nizka koncentracija Se1 in  $10 \text{mg Se L}^{-1}$  – visoka koncentracija Se2). Obravnavane vrste so bile: *P. perfoliatus*, *M. spicatum* in *C. demersum*. Poskus je potekal od sredine maja do prvega tedna v juliju.

V času trajanja poskusa smo merili aktivnost ETS, potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm) in barvila (klorofil *a* in *b*, karotenoide ter antociane). Zanimal nas je vpliv različnih koncentracij Se na rastline in katera rastlina bo dlje časa preživela v razmerah dodanega selena v različnih koncentracijah. Vrsti *C. demersum* in *M. spicatum* smo presajali iz Se2 v vodo brez dodanega Se in nazaj v Se2, ter preverjali, ali bo vrsta po prenehanju stresa sposobna popraviti škodo, nastalo zaradi dodanega selena.

Vse rastline so uspešno rasle v vodi z nizko koncentracijo selena (Se1), kar se je pokazalo pri meritvah dihalnega potenciala. Negativno je na poskusne rastline vplivala visoka koncentracija selena (Se2). Rastline, ki so uspevale v Se2, so imele najnižjo aktivnost ETS. Povzamemo lahko, da selen, prisoten v majhnih koncentracijah, nima negativnih vplivov na aktivnost obravnavanih rastlin, medtem ko visoke koncentracije selena povzročijo škodo na rastlini. To so potrdile tudi meritve potencialne fotokemične učinkovitosti (Fv/Fm), saj smo pri vseh treh rastlinskih vrstah opazili negativen vpliv visoke koncentracije selena v primerjavi z rastlinami v kontroli.

Dodatek selena na fotosintezna barvila in antociane ni imel bistvenega vpliva.

V poskusu smo želeli preveriti, kako se bosta vrsti *M. spicatum* in *C. demersum* odzvali oziroma kakšne bodo posledice presajanja iz Se2 za 5 dni v vodo brez dodanega selena ter nazaj v Se2. Vrsta *M. spicatum* si je po presaditvi iz Se2 v vodo brez dodanega selena opomogla, kar je razvidno iz dihalnega potenciala. Posledično se je rastlini povečala količina dostopne energije, ki je potrebna za popravljanje napak oziroma zaščito pred stresom, ki ga je povzročil selen. Pri vrsti *C. demersum* je imelo presajanje v vodo brez dodanega selena še večji pozitivni učinek, saj si je takoj po presaditvi v vodo brez dodanega selena opomogla, kar je razvidno iz ravni dihalnega potenciala.

Zato menimo, da je imelo presajanje v vodo brez dodanega selena za obe poskusni vrsti pozitiven učinek.

## 7. SKLEPI

- Visoka koncentracija selena ( $Se_2$ ) je imela negativen vpliv na potencialno fotokemično učinkovitost pri vseh treh vrstah in na dihalni potencial, merjen s pomočjo aktivnosti ETS pri vrstah *M. spicatum* in *P. perfoliatus*. Dodani selen ni bistveno vplival na vsebnost fotosinteznih barvil in antocianov pri nobeni od vrst.
- Rastline so se različno odzvale na dodani selen. Najbolj občutljiva vrsta je bila *P. perfoliatus*.
- Nizka koncentracija dodanega selena je imela manjši vpliv na izbrane fiziološke lastnosti rastlin kot visoka koncentracija dodanega selena.
- Rastline so se odzvale na presajanje iz vode z visoko koncentracijo selena v vodo brez dodanega selena ter ponovno nazaj v vodo z dodanim selenom. Razlike v odzivu so se pokazale predvsem na metabolnem potencialu in v vsebnosti antocianov.



## 8. LITERATURA

Allan J. D., 1995. Stream Ecology. London. Chapman & Hall: 388 str.

Drumm H., Mohr H. 1978. The mode of interaction between blue (UV) light photoreceptor and phytochrome in anthocyanin formation of the Sorghum seedling. Photochemistry and photobiology 27, 241-248

Gaberščik A., Martinčič A. 1992. Spreminjanje lastnosti listov vodne dresni (*Polygonum amphibium* L.) v gradientu kopno/voda. Biološki vestnik, 40, 1:1-11

Gabor S., 2008. Vpliv selena na rast in razvoj stročnic. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za Agronomijo

Germ M., Kreft I., Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo*). Plant Physiology and Biochemistry, 43: 445-448

Germ M., Stibilj V., Kreft I. 2007. Metabolic importance of selenium for plants. The European Journal of Plant Science and Biotechnology, 1(1), 91-97

Germ M., Stibilj V., Osvald J., Kreft I. 2007. Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 795-798

Haavisto A., Hella A., Hurmola O., Tuomi V. 1996. Čudežni svet elementov. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 160 str.

Hutchinson G. E. 1975. A treatise on Limnology. Volume III. Limnological Botany. New York, John Wiley & Sons: 660 str.

Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191-194

Kenner, R.A. and Ahmed, S.I. 1975. Measurements of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 33: 119-127 in Packard, T.T. 1971. The measurement of respiratory electron-transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 29: 235-243

Korže Vovk A., Janškovec K., 2009. Čiščenje prsti s pomočjo rastlin. *Geografski obzornik*. Maribor. letnik 56. številka 1/2

Krause G. H., Weis E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. – *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 42: 313-349

Larcher, W., 2003. *Physiological plant ecology*, 4th ed. Berlin: Springer, 513 str.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. 2001a. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. In: Wrolstad, R.E. et al. (Eds.): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, F.4.2.1–4.2.6.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. 2001b. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterisation by UV-VIS. In: Wrolstad, R.E. et al. (Eds.): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, F.4.2.1–4.2.6.

Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., 2007. *Mala flora Slovenije. Ključ za določevanje praprotnic in semenk*. Ljubljana. Tehniška založba Slovenije: 967 str.

Maxwell K., Johnson G.N. 2002 Chlorophyll fluorescence: A practical guide. – J. exp. Bot. 345: 659-668

Mechora Š., Stibilj V., Germ M., 2012. The uptake and distribution of selenium in three aquatic plants grown in Se (IV). Aquatic toxicology 128-129 (2013) 53-59.

Mechora Š., Cuderman P., Stibilj V., Germ M., 2011. Distribution of Se and its species in *Myrophyllum spicatum* and *Ceratophyllum demersum* growing in water containing se (IV). Chemosphere 84: 1636-1641

Radešček T., 2011. Vpliv selena na rast in fiziološko aktivnost pri dveh genotipih zelja (*Brassica oleracea*). Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Biologijo

Reid M. E., Stratton M. S., Lillico A.J., Fakih M., Natarajam R., Clark L. C., Marshall J. R. 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 69-74

Sand-Jensen K., Pedersen O., 1999. Velocity gradients and turbulence around macrophyte stands in streams. Freshwater Biology, 42: 315-328 str.

Sappington K. G., 2002. Development of aquatic life criteria for selenium: A regulatory perspective on critical issues and research needs. Aquatic Toxicology. 57: 101-113

Stibilj V., Kreft I., Smrkolj P., Osvald J. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. European Food Research and Tehnology, 219: 142-144

Štrekelj P., 2009. Vpliv selena na kalitev in razvoj kalic tatarske ajde. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Program Biologija in Kemija

Terry N., Zayed A. M., de Souza M. P., Tarun A. S. 2000. Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 401-432

Vrhovšek D., Vovk Korže A., 2007. Ekoremediacije. Maribor in Ljubljana. Univerza v Mariboru. Filozofska fakulteta: 128 str.

Wikipedija: [http://sl.wikipedia.org/wiki/Klasasti\\_rmanec](http://sl.wikipedia.org/wiki/Klasasti_rmanec) (20.11.2012)

Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Cur. Opin. Plant Biol. 5, 218-223

Xue T., Hartikainen H., Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. Plant and Soil, 237: 55-61

## ZAHVALA

V prvi vrsti se zahvaljujem Katedri za ekologijo, kjer sem lahko opravljal vse meritve za svojo diplomsko nalogo. Še posebej prof. dr. Alenki Gaberščik, doc. dr. Mateji Germ in Špeli Mechora, da so me ves čas pravilno usmerjale, pregledovale diplomsko nalogo, dajale napotke, kako nadaljevati, in bodrile, da sem sedaj res pri koncu.

Za vso tehnično pomoč v laboratoriju pa bi se rad zahvalil Draganu Abramcu.

Vse zahvale gredo mojim bližnjim, ki niso obupali nad menoj ter izvajali pritiska. Hvaležen sem jim, da so bili ves čas strpni do mene, od prvega vpisa na fakulteto pa vse do samega konca, ki se je malce zavlekel. Hvala tudi za možnost, da sem se lahko zaposlil, četudi še nisem zaključil študija.

Zahvaljujem se moji Evi, ki je bila ob meni od začetka do konca študija, me spraševala, kako mi gre, in mi stala ob strani, ko mi je šlo in tudi takrat, ko mi ni šlo. Upam, da tudi tebi kaj kmalu uspe in boš rešena vseh bremen. Hvala za lektoriranje in popravljene vse moje zgrešene vejice.

Zahvaljujem se tudi vsem mojim sošolcem (Irena, Teja, Mateja, Tjaša, Maja, Sara, ...), s katerimi smo preživeli nepozabne trenutke med predavanji, vajami ter na terenskih dnevih.

## **PRILOGE**

## Priloga 1

### TEMPERATURA VODE

Tabela 4: Temperature vode [°C], merjene v kadeh, kjer so bile rastline nasajene.

Vrsta		19. 5. 2011	10. 6. 2011	14. 6. 2011	17. 6. 2011	20. 6. 2011	21. 6. 2011	23. 6. 2011	27. 6. 2011	5. 7. 2011
		[°C]								
<i>P. perfoliatus</i>	Kontrola	26,6	/	/	25,0	/	29,7	30,8	26,2	28,2
	Se1	24,5	22,3	20,6	24,4	22,8	27,0	30,0	23,0	27,0
	Se2	24,0	22,0	20,6	24,0	22,6	27,4	29,6	23,0	26,5
<i>M. spicatum</i>	Kontrola	26,4	/	/	25,6	/	30,0	31,4	26,4	28,4
	Se1	22,6	23,5	21,2	25,4	24,6	28,8	30,6	25,5	27,2
	Se2	22,7	22,6	20,6	24,0	22,6	27,6	29,4	23,4	26,2
<i>C. demersum</i>	Kontrola	27,2	/	/	24,6	/	29,0	30,2	24,4	28,0
	Se1	23,8	22,7	20,8	24,2	22,6	27,8	29,2	22,8	25,2
	Se2	24,4	22,6	20,6	23,8	22,4	27,8	29,2	23,6	26,0

Se1 = 20 µg/L, Se2 = 10 mg/L

## Priloga 2

### KLOROFIL A in KLOROFIL B

Tabela 5: Vsebnost klorofila *a* [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov.

Vrsta		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
		[mg/g SM]							
<i>P. perfoliatus</i>	Kontrola	1,07±0,24 <sup>cde</sup>	0,64±0,08 <sup>bc</sup>	1,69±0,27 <sup>e</sup>	0,45±0,14 <sup>b</sup>	1,49±0,35 <sup>e</sup>	0,55±0,06 <sup>bc</sup>	0,37±0,19 <sup>a</sup>	0,49±0,12 <sup>bc</sup>
	Se1	0,10±0,02 <sup>a</sup>	0,93±0,12 <sup>cd</sup>	0,65±0,14 <sup>bc</sup>	0,51±0,25 <sup>cd</sup>	0,96±0,21 <sup>cd</sup>	0,56±0,08 <sup>bc</sup>	0,58±0,26 <sup>c</sup>	0,67±0,20 <sup>bc</sup>
	Se2	0,71±0,05 <sup>bc</sup>	0,57±0,10 <sup>bc</sup>	0,81±0,31 <sup>cd</sup>	0,14±0,10 <sup>a</sup>	1,20±0,20 <sup>de</sup>	0,37±0,07 <sup>bc</sup>	0,40±0,08 <sup>a</sup>	/
<i>M. spicatum</i>	Kontrola	0,41±0,13 <sup>a</sup>	1,16±0,22 <sup>bc</sup>	3,34±0,53 <sup>e</sup>	2,42±0,58 <sup>cd</sup>	1,15±0,43 <sup>bc</sup>	1,15±0,07 <sup>bc</sup>	2,14±0,40 <sup>cd</sup>	2,03±0,53 <sup>cd</sup>
	Se1	0,23±0,03 <sup>a</sup>	1,09±0,11 <sup>bc</sup>	1,52±0,25 <sup>c</sup>	1,65±0,26 <sup>cd</sup>	1,79±0,13 <sup>d</sup>	3,49±0,76 <sup>e</sup>	1,78±0,33 <sup>cd</sup>	2,60±0,48 <sup>e</sup>
	Se2	0,52±0,26 <sup>ab</sup>	1,25±0,44 <sup>bc</sup>	1,03±0,24 <sup>bc</sup>	0,78±0,54 <sup>a</sup>	1,75±0,60 <sup>cd</sup>	2,21±0,27 <sup>d</sup>	1,62±0,48 <sup>cd</sup>	0,88±0,27 <sup>b</sup>
<i>C. demersum</i>	Kontrola	0,91±0,54 <sup>a</sup>	0,86±0,14 <sup>a</sup>	2,37±0,53 <sup>cd</sup>	1,55±0,37 <sup>bc</sup>	1,13±0,16 <sup>bc</sup>	1,10±0,15 <sup>b</sup>	1,51±0,04 <sup>cd</sup>	2,30±0,21 <sup>cd</sup>
	Se1	0,35±0,12 <sup>a</sup>	1,15±0,26 <sup>bc</sup>	2,73±0,37 <sup>de</sup>	2,78±0,29 <sup>de</sup>	1,91±0,55 <sup>bc</sup>	2,16±0,50 <sup>d</sup>	1,96±0,15 <sup>cd</sup>	2,24±0,49 <sup>cd</sup>
	Se2	0,82±0,12 <sup>a</sup>	0,76±0,17 <sup>a</sup>	0,78±0,22 <sup>a</sup>	0,82±0,23 <sup>a</sup>	3,31±1,32 <sup>e</sup>	1,82±0,24 <sup>cd</sup>	1,79±0,38 <sup>c</sup>	1,99±0,60 <sup>cd</sup>

Se1 = 20 µg/L, Se2 = 10 mg/L

Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med sabo.



Tabela 6: Vsebnost klorofila *b* [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov.

Vrsta		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
		[mg/g SM]							
<i>P. perfoliatus</i>	Kontrola	0,43±0,12 <sup>a</sup>	0,24±0,04 <sup>a</sup>	1,86±0,15 <sup>d</sup>	0,37±0,14 <sup>a</sup>	1,57±0,50 <sup>d</sup>	0,36±0,11 <sup>a</sup>	0,25±0,13 <sup>a</sup>	0,38±0,16 <sup>a</sup>
	Se1	0,44±0,07 <sup>a</sup>	0,56±0,08 <sup>bc</sup>	0,57±0,21 <sup>a</sup>	0,84±0,03 <sup>bc</sup>	1,27±0,36 <sup>cd</sup>	0,62±0,20 <sup>bc</sup>	0,60±0,19 <sup>bc</sup>	0,82±0,30 <sup>bc</sup>
	Se2	0,56±0,08 <sup>b</sup>	0,37±0,13 <sup>a</sup>	1,31±0,47 <sup>c</sup>	0,27±0,13 <sup>a</sup>	1,61±0,29 <sup>d</sup>	0,38±0,08 <sup>a</sup>	0,41±0,08 <sup>a</sup>	/
<i>M. spicatum</i>	Kontrola	0,74±0,21 <sup>a</sup>	0,58±0,10 <sup>a</sup>	2,77±0,68 <sup>d</sup>	2,10±0,45 <sup>c</sup>	0,73±0,11 <sup>a</sup>	1,03±0,10 <sup>a</sup>	1,40±0,42 <sup>bc</sup>	2,07±0,60 <sup>c</sup>
	Se1	0,35±0,05 <sup>a</sup>	0,52±0,09 <sup>a</sup>	1,12±0,46 <sup>a</sup>	1,09±0,36 <sup>b</sup>	1,61±0,24 <sup>bc</sup>	2,67±0,23 <sup>d</sup>	1,59±0,44 <sup>bc</sup>	2,59±0,65 <sup>cd</sup>
	Se2	0,65±0,33 <sup>a</sup>	0,74±0,35 <sup>a</sup>	0,50±0,25 <sup>a</sup>	1,22±0,60 <sup>a</sup>	2,31±0,92 <sup>cd</sup>	2,22±0,03 <sup>cd</sup>	2,13±0,94 <sup>c</sup>	0,88±0,39 <sup>a</sup>
<i>C. demersum</i>	Kontrola	0,30±0,22 <sup>a</sup>	0,34±0,11 <sup>a</sup>	2,10±0,42 <sup>bc</sup>	1,72±0,53 <sup>bc</sup>	1,73±0,12 <sup>b</sup>	1,13±0,21 <sup>a</sup>	1,77±0,19 <sup>c</sup>	2,66±0,35 <sup>cd</sup>
	Se1	0,72±0,15 <sup>a</sup>	1,13±0,39 <sup>a</sup>	3,06±0,85 <sup>cd</sup>	3,90±0,68 <sup>d</sup>	2,09±0,86 <sup>cd</sup>	2,44±0,88 <sup>cd</sup>	2,47±0,25 <sup>cd</sup>	3,01±0,78 <sup>d</sup>
	Se2	0,59±0,12 <sup>a</sup>	0,40±0,06 <sup>a</sup>	0,70±0,27 <sup>a</sup>	0,86±0,37 <sup>a</sup>	3,41±0,55 <sup>d</sup>	2,36±0,27 <sup>c</sup>	2,68±0,46 <sup>cd</sup>	1,81±0,63 <sup>b</sup>

Se1 = 20 µg/L, Se2 = 10 mg/L

Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med sabo.

### Priloga 3

## KAROTENOIDI

Tabela 7: Vsebnost karotenoidov [mg/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov.

Vrsta		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
		[mg/g SM]							
<i>P. perfoliatus</i>	Kontrola	0,15±0,05 <sup>a</sup>	0,28±0,04 <sup>bc</sup>	0,49±0,10 <sup>cd</sup>	0,05±0,01 <sup>a</sup>	0,16±0,10 <sup>bc</sup>	0,10±0,01 <sup>a</sup>	0,17±0,07 <sup>a</sup>	0,12±0,05 <sup>a</sup>
	Se1	0,38±0,04 <sup>e</sup>	0,32±0,03 <sup>bc</sup>	0,26±0,07 <sup>bc</sup>	0,26±0,04 <sup>bc</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	0,31±0,12 <sup>bc</sup>	0,22±0,05 <sup>b</sup>	/
	Se2	0,34±0,09 <sup>bc</sup>	0,29±0,05 <sup>bc</sup>	0,40±0,03 <sup>cd</sup>	0,11±0,04 <sup>a</sup>	0,27±0,15 <sup>bc</sup>	0,21±0,08 <sup>bc</sup>	0,16±0,02 <sup>a</sup>	/
<i>M. spicatum</i>	Kontrola	1,12±0,28 <sup>cd</sup>	0,33±0,07 <sup>a</sup>	1,08±0,16 <sup>cd</sup>	0,81±0,27 <sup>bc</sup>	0,95±0,29 <sup>bc</sup>	0,37±0,06 <sup>a</sup>	0,68±0,10 <sup>bc</sup>	0,47±0,07 <sup>a</sup>
	Se1	0,69±0,06 <sup>bc</sup>	0,33±0,04 <sup>a</sup>	0,56±0,06 <sup>a</sup>	0,48±0,09 <sup>a</sup>	0,63±0,21 <sup>bc</sup>	0,96±0,27 <sup>cd</sup>	0,59±0,11 <sup>b</sup>	0,69±0,11 <sup>bc</sup>
	Se2	0,90±0,21 <sup>c</sup>	0,47±0,24 <sup>a</sup>	0,44±0,12 <sup>a</sup>	0,36±0,14 <sup>a</sup>	0,59±0,24 <sup>b</sup>	0,69±0,03 <sup>bc</sup>	0,54±0,11 <sup>a</sup>	/
<i>C. demersum</i>	Kontrola	0,21±0,10 <sup>a</sup>	0,26±0,05 <sup>a</sup>	0,77±0,19 <sup>d</sup>	0,44±0,09 <sup>bc</sup>	0,47±0,23 <sup>bc</sup>	0,43±0,02 <sup>bc</sup>	0,56±0,14 <sup>cd</sup>	0,63±0,06 <sup>cd</sup>
	Se1	0,34±0,06 <sup>bc</sup>	0,38±0,08 <sup>bc</sup>	0,77±0,04 <sup>d</sup>	0,59±0,05 <sup>cd</sup>	0,39±0,11 <sup>bc</sup>	0,59±0,15 <sup>cd</sup>	0,60±0,14 <sup>cd</sup>	0,57±0,10 <sup>cd</sup>
	Se2	0,44±0,05 <sup>bc</sup>	0,29±0,07 <sup>a</sup>	0,34±0,08 <sup>b</sup>	0,33±0,05 <sup>b</sup>	0,82±0,15 <sup>cd</sup>	0,51±0,10 <sup>c</sup>	0,53±0,13 <sup>cd</sup>	0,26±0,05 <sup>a</sup>

Se1 = 20 µg/L, Se2 = 10 mg/L

Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med sabo.

## Priloga 4

### ANTOCIANI

Tabela 8: Vsebnost antocianov [mL/g SM] pri preučevanih vrstah makrofitov.

Vrsta		II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
		[mL/g SM]							
<i>P. perfoliatus</i>	Kontrola	80±19 <sup>a</sup>	/	107±8 <sup>b</sup>	182±64 <sup>bc</sup>	127±31 <sup>b</sup>	358±106 <sup>d</sup>	99±8 <sup>a</sup>	62±15 <sup>a</sup>
	Se1	17±2 <sup>a</sup>	43±16 <sup>a</sup>	207±34 <sup>bc</sup>	8±1 <sup>a</sup>	/	63±17 <sup>a</sup>	89±20 <sup>a</sup>	/
	Se2	/	235±43 <sup>c</sup>	74±20 <sup>a</sup>	136±26 <sup>b</sup>	323±137 <sup>cd</sup>	635±35 <sup>d</sup>	229±52 <sup>c</sup>	226±8 <sup>c</sup>
<i>M. spicatum</i>	Kontrola	214±33 <sup>b</sup>	102±11 <sup>a</sup>	244±58 <sup>bc</sup>	276±84 <sup>bc</sup>	138±24 <sup>bc</sup>	322±30 <sup>c</sup>	104±18 <sup>a</sup>	76±30 <sup>a</sup>
	Se1	413±57 <sup>bc</sup>	332±122 <sup>b</sup>	292±69 <sup>b</sup>	157±35 <sup>a</sup>	55±24 <sup>a</sup>	164±23 <sup>a</sup>	179±38 <sup>a</sup>	119±21 <sup>a</sup>
	Se2	160±10 <sup>a</sup>	187±29 <sup>a</sup>	208±49 <sup>a</sup>	227±27 <sup>a</sup>	158±81 <sup>a</sup>	135±65 <sup>a</sup>	95±12 <sup>a</sup>	17±6 <sup>a</sup>
<i>C. demersum</i>	Kontrola	57±23 <sup>a</sup>	/	427±58 <sup>bc</sup>	190±43 <sup>a</sup>	414±140 <sup>cd</sup>	161±55 <sup>cd</sup>	179±28 <sup>a</sup>	36±15 <sup>a</sup>
	Se1	/	137±13 <sup>a</sup>	267±66 <sup>b</sup>	253±55 <sup>bc</sup>	67±24 <sup>a</sup>	271±40 <sup>bc</sup>	144±30 <sup>a</sup>	168±44 <sup>a</sup>
	Se2	/	316±81 <sup>bc</sup>	133±21 <sup>a</sup>	321±68 <sup>bc</sup>	306±23 <sup>bc</sup>	361±123 <sup>bc</sup>	225±40 <sup>b</sup>	126±47 <sup>a</sup>

Se1 = 20 µg/L, Se2 = 10 mg/L

Rezultati so podani kot srednja vrednost ±SD. Rezultati, označeni z različnimi črkami, se statistično značilno razlikujejo med sabo.