

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

Tadej HARTL

**LEDVICE IN ROGOVJE SRNJADI
(*Capreolus capreolus* L.) KOT BIOINDIKATORJA
ONESNAŽENOSTI OKOLJA NA KOZJANSKEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA GOZDARSTVO IN OBNOVLJIVE GOZDNE VIRE

Tadej HARTL

**LEDVICE IN ROGOVJE SRNJADI (*Capreolus capreolus* L.) KOT
BIOINDIKATORJA ONESNAŽENOSTI OKOLJA NA KOZJANSKEM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ROE DEER (*Capreolus capreolus* L.) KIDNEYS AND ANTLERS AS
BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL POLLUTION IN
THE KOZJANSKO REGION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija gozdarstva. Opravljeno je bilo na Oddelku za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire BF je dne 13. 6. 2007 sprejela temo in za mentorja imenovala doc. dr. Klemna Jerino, za somentorja doc. dr. Boštjana Pokornega in za recenzenta prof. dr. Franca Batiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tadej Hartl

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	GDK 11/16:131+134(163.4 Kozjansko)(043.2)=163.6
KG	srnjad/težke kovine/bioindikacija/ledvice/rogovje/nihajoča asimetrija/Kozjansko/ onesnaženost okolja
KK	
AV	HARTL, Tadej
SA	JERINA, Klemen (mentor) / POKORNY, Boštjan (somentor)
KT	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire
LI	2011
IN	LEDVICE IN ROGOVJE SRNJADI (<i>Capreolus capreolus</i> L.) KOT BIOINDIKATORJA ONESNAŽENOSTI OKOLJA NA KOZJANSKEM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	VIII, 64 str., 12 pregl., 13 sl., 59 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AL	Srnjad je ena najprimernejših živalskih vrst za bioindikacijo onesnaženosti okolja. V pričujoči raziskavi so določili: (i) vsebnosti kovin v ledvicah 14 osebkov srnjadi, uplenjenih v letu 2005 na Kozjanskem; (ii) vsebnosti kovin v ledvicah 35 osebkov srnjadi, uplenjenih v istem letu v Šaleški dolini; (iii) nihajočo asimetrijo 4 merskih znakov rogovja 163 srnjakov, uplenjenih v obdobju 1975–2005 na Kozjanskem. Vsebnosti Pb, Hg in As so bile v Šaleški dolini večje kot na Kozjanskem. Nasprotno se povprečne vsebnosti Cd v ledvicah mladičev srnjadi niso razlikovale, pri čemer so bile na Kozjanskem največje izmerjene vrednosti celo večje kot v Šaleški dolini in so v dveh vzorcih presegale zakonsko dopustne vrednosti. Kot reakcijsko bioindikacijo so uporabili merjenje nihajoče asimetrije (FA) rogovja. V retrospektivni študiji so ugotovili spreminjanje nihajoče asimetrije v obdobju 1975–2005, z viškom konec osemdesetih in na začetku devetdesetih let ter s kasnejšim upadom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Gth

DC $FDC\ 11/16:131+134(163.4\ Kozjansko)(043.2)=163.6$

CX roe deer/heavy metals/bioindication/kidney/antlers/fluctuating asymmetry/Kozjansko region/environmental pollution

CC

AU HARTL, Tadej

AA JERINA, Klemen (supervisor) / POKORNY, Boštjan (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 83

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of forestry and renewable forest resources

PY 2011

TI ROE DEER (*Capreolus capreolus* L.) KIDNEYS AND ANTLERS AS BIOINDICATORS OF ENVIRONMENTAL POLLUTION IN THE KOZJANSKO REGION

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VIII, 64 p., 12 tab., 13 fig., 59 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Roe deer is one of the most suitable animal species for the bioindication of environmental pollution. The following aims were emphasised: (i) determination of heavy metals in the kidneys of 14 roe deer, shot in 2005 in Kozjansko region; (ii) the determination of heavy metals in the kidneys of 35 roe deer, shot in the same year in the Šalek Valley; (iii) the measurement of fluctuating asymmetry (FA) of 4 antlers traits of 163 roe deer, shot in the period from 1975 to 2005 in Kozjansko region. Levels of Pb, Hg and As were higher in Šalek Valley than in Kozjansko region, but the average levels of Cd in roe deer offspring kidneys were not significantly different. The maximum measured levels in Kozjansko region were even higher than in Šalek Valley and two samples were exceeding legal allowable measurement levels. For testing a reactive bioindication we used a method of measuring the fluctuating asymmetry (FA) of roe deer antlers. In temporal comparison of the period 1975 to 2005 we have discovered a change of the oscillating asymmetry, with its maximum in the late 80's and in the beginning of the 90's and its posterior downturn.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED DOSEDANJIH RAZISKAV	3
2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH KOVIN	3
2.2 ZNAČILNOSTI SRNJADI	7
2.2.1 Prostorske značilnosti vrste	7
2.2.2 Prehranjevanje srnjadi	9
2.2.3 Razmnoževanje in populacijski razvoj	10
2.2.4 Značilnosti in razvoj rogovja.....	11
2.3 ROGOVJE KOT REAKCIJSKI BIOINDIKATOR OKOLJSKEGA STRESA	13
2.4 LEDVICE KOT INDIKATOR ONESNAŽENOSTI OKOLJA	17
3 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE RAZISKAVE.....	20
4 MATERIAL IN METODE DE LA	23
4.1 OBMOČJE RAZISKAVE.....	23
4.2 DELO Z VZORCI	27
4.2.1 LEDVICE.....	27
4.2.2 ROGOVJE.....	29
4.3 STATISTIČNE METODE	31
4.3.1 LEDVICE.....	31
4.3.2 ROGOVJE.....	32
5 REZULTATI.....	35
5.1 LEDVICE	35
5.2 ROGOVJE.....	38
5.2.1 Napaka meritev znakov rogovja srnjakov	38
5.2.2 Obstoj asimetrije znakov rogovja srnjakov	39
5.2.3 Prisotnost DA in normalnost porazdelitve L-D razlik	40
5.2.4 Odvisnost FA od velikosti znaka	42

5.2.5	Spreminjanje FA rogovja srnjakov v obdobju 1975–2005	42
6	RAZPRAVA	44
6.1	LEDVICE	44
6.2	ROGOVJE	47
6.2.1	Napaka meritev znakov rogovja srnjakov	47
6.2.2	Obstoj asimetrije znakov rogovja srnjakov	48
6.2.3	Prisotnost DA in normalnost porazdelitve L-D razlik	48
6.2.4	Odvisnost FA od velikosti znaka	50
6.2.5	Spreminjanje FA rogovja srnjakov v obdobju 1975–2005	50
7	ZAKLJUČEK	53
8	POVZETEK	55
9	VIRI	57

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Antropogeni izvor težkih kovin v okolju (Ross, 1994).....	6
Preglednica 2: Število vzorcev rogovij, razdeljenih po obdobjih uplenitve	29
Preglednica 3: Dovoljene vsebnosti Pb, Cd, Hg in As v ledvicah srnjadi, določene z Ur. l. SFRJ 59/1983, 79/1987 (a); Ur. l. RS 69/2003 (b); EC 1881/2006 (c).....	35
Preglednica 4: Vsebnosti Cd, Pb, Hg, As v ledvicah mladičev srnjadi na Kozjanskem v letu 2005 (v mg/kg svežega vzorca).....	35
Preglednica 5: Vsebnosti Cd, Pb, Hg, As v ledvicah srnjadi na Kozjanskem in v Šaleški dolini v letu 2005 (v mg/kg svežega vzorca).....	36
Preglednica 6: Parametri linearne regresije med ocenjeno starostjo mladičev v dnevih in vsebnostjo kovin v njihovih ledvicah (Kozjansko, n=14).....	36
Preglednica 7: Preizkus zanesljivosti meritev morfoloških znakov rogovja srnjakov (2-ANOVA s ponovitvami meritev)	38
Preglednica 8: Test virov variabilnosti znakov rogovja srnjakov (2-ANOVA: osebek x stran; n=12)	39
Preglednica 9: Preizkus obstoja asimetrije za znake rogovja srnjakov	39
Preglednica 10: Preizkus prisotnosti DA (značilnosti razlik med levo in desno vejo rogovja srnjakov).....	40
Preglednica 11: Preizkus normalnosti porazdelitve »L-D razlik«	41
Preglednica 12: Parametri linearne regresije med velikostjo (večjo vrednostjo) znaka in absolutno razliko L-D.....	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Srnjad je zelo primerna vrsta za bioindikacijo onesnaženosti okolja (Vir: Živalski ..., 2005).....	7
Slika 2: Zemljevid razširjenosti (areala) evropske srne (<i>Capreolus capreolus</i> L.) in sibirske srne (<i>Capreolus pyragus</i> Pall.) (Vir: Simonič, 1976)	8
Slika 3: Tipično za srnjaka je rogovje šesteraka (Foto: Hartl T., 2009)	12
Slika 4: Dobro datirane zbirke so velika prednost pri analizah nihajoče asimetrije rogovja (Foto: Hartl T., 2009)	13
Slika 5: Orientacijska karta Kozjanskega (Vir: Tretja razvojna..., 2008)	23
Slika 6: Pogled na kozjansko pokrajino (Vir: Kozjansko, 2008).....	25
Slika 7: Območja lovišč, s katerimi upravljajo lovske družine (LD) Kozje, Podčetrtek in Podsreda (rdeče obkrožena) oz. primerjalno Oljka, Šmartno ob Paki (zeleno obkrožena) (Vir: Letni ..., 2009)	27
Slika 8: Zaradi mehanskih poškodb poškodovanega rogovja nismo vključil v raziskavo (Foto: Hartl T., 2009).....	29
Slika 9: Merjeni parametri rogovja (dolžina veje nad rožo (DV), dolžina prednjega parožka (DPP), dolžina zadnjega parožka (DZP), premer veje tik nad rožo (PV)).....	30
Slika 10: Cd v ledvicah mladičev srnjadi v odvisnosti od ocenjene starosti (Kozjansko, n = 14).....	37
Slika 11: Soodvisnost med vejama v velikosti nekaterih znakov (DV, DPP, DZP) srnjakov, uplenjenih v obdobju 1975–2005 na Kozjanskem.....	41
Slika 12: Časovno spreminjanje FA rogovja srnjakov (znak SDV), uplenjenih v obdobju 1975–2005.....	42
Slika 13: Časovno spreminjanje FA rogovja srnjakov (znak DZP), uplenjenih v obdobju 1975–2005.....	43

1 UVOD

Z vse večjim industrijskim onesnaževanjem, razvojem prometa, energetike, industrializacijo kmetijstva in splošno urbanizacijo okolja so se v zadnjem stoletju pojavile spremembe v okolju. Človeka in druga živa bitja marsikje ogrožajo onesnažena voda, tla in zrak.

Spremljanje onesnaževanja zgolj s kemijskimi meritvami onesnažil je težavno zaradi velikega števila potencialno nevarnih substanc, težkega ugotavljanja njihovih sinergističnih učinkov, velike prostorske in časovne različnosti v pojavljanju onesnaževanja, visoke cene merilnih naprav ter majhne gostote meritev, z izključno instrumentalnim pristopom (Erico ..., 2011).

Zaradi zmeraj večje okoljske ozaveščenosti in vedno strožjih okoljevarstvenih predpisov postajajo vedno pomembnejše metode, ki omogočajo spremljanje trendov v onesnaženosti okolja.

Onesnaženost okolja lahko ugotavljamo s pomočjo bioindikatorjev (biomonitorjev) – organizmov, ki s svojimi življenjskimi funkcijami, razširjenostjo, kemično sestavo, fiziološkimi odzivi in morfološko-anatomskimi značilnostmi odsevajo razmere v okolju (Batič, 1994, 1997). Biomonitoring pomeni merjenje in spremljanje sprememb v živih organizmih, tkivih, tekočinah, celicah oziroma biokemičnih procesih, ki so nastale zaradi izpostavljenosti neki kemični snovi. Cilj biomonitoringa je pridobiti statistično pomembne količine podatkov, ki naj pokažejo dejanske obremenitve življenjskega okolja in organizmov z določenimi onesnažili. Služijo nam lahko kot zgodnje opozorilo za potencialno izpostavljenost ljudi. Podatki, pridobljeni z monitoringom, odražajo celotno izpostavljenost določenim onesnaževalom iz lokalnih točkovnih ali razpršenih virov ter tudi iz njihovega prenosa na dolge razdalje (Kononenko, 2009).

Bioindikatorji so lahko »odzivni« oz. »reakcijski« in »zbiralni« oz. »akumulacijski«. Glavna razlika med obema skupinama je v tem, da sklepamo pri prvih na stopnjo onesnaženosti okolja na podlagi določenega odziva (reakcije), pri drugih pa na osnovi vsebnosti strupenih snovi, ki jih akumulacijski indikatorji brez večje škode kopičijo v svojih tkivih (Batič, 1994).

Prednost akumulacijskih bioindikatorjev je v relativni enostavnosti meritev, večji natančnosti in specifičnosti podatkov ter lažji interpretaciji rezultatov; nasprotno lahko uporaba odzivnih bioindikatorjev opozarja na pojav stresnih razmer že pri izpostavljenosti relativno majhnim količinam stresorja, kar je izjemnega pomena za pravočasno izvedbo ukrepov za zmanjšanje ogroženosti populacij, vrst in njihovih združb (Pokorny, 2003).

Srnjad (*Capreolus capreolus* L.) je ena ključnih vrst kopenskih ekosistemov Evrope, kjer je zaradi svojih ekoloških in sociobioloških značilnosti morda najprimernejša vrsta sesalcev za bioindikacijo onesnaženosti okolja. Najpomembnejše značilnosti vrste, ki opredeljujejo njeno veliko primernost za bioindikacijo kakovosti habitatov, so: velika sposobnost kopičenja strupenih snovi – posledica prehrane z rastlinskimi vrstami, ki so znane kot zelo dobri bioindikatorji; pozitivna povezava med vnosom strupenih snovi v ekosisteme in akumulacijo v tkivih srnjadi; standardizirane vzorčevalne in analitske metode lahko preprosto razvijemo; vrsta ni ogrožena in ima ekološki optimum skoraj povsod po Evropi; teritorialen način življenja z arealom aktivnosti, ki je praviloma bistveno manjši kot 100 ha; ekološke in fiziološke značilnosti vrste so dobro poznane; relativno dolga življenjska doba in etično sprejemljivo vzorčenje v sklopu rednega odstrela živali (Pokorny, 2010).

2 PREGLED DOSEDANJIH RAZISKAV

2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI PROUČEVANIH KOVIN

Težke kovine so tiste kovine, katerih specifična teža je večja od 5 g cm^{-3} , atomsko število pa večje od 20. To je največja skupina potencialno nevarnih anorganskih snovi v okolju. Težke kovine sestavljajo manj kot 1 % zemeljske skorje, zato jih imenujemo tudi elementi v sledovih oziroma sledne prvine. Njihova koncentracija v zemeljski skorji navadno ne presega 100 mg kg^{-1} (Istenič, 2005).

Težke kovine v majhnih koncentracijah niso nevarne za organizme, nekatere so celo nujno potrebne (esencialne) za rast in razvoj organizmov in jih imenujemo mikrohranila. O onesnaženosti okolja s težkimi kovinami govorimo, kadar se koncentracija teh elementov na nekem območju poveča preko določene meje, pri čemer ni pomembno, ali je določen element mikrohranilo ali ne; velike koncentracije so vedno toksične. Najbolj pogosto najdemo v naravi povečane koncentracije Cd, Pb, Zn in Cu, na določenih območjih tudi Be, Cr in Hg (Istenič, 2005).

Na koncentracijo kovin v tleh, kjer njihova prisotnost ni odvisna od človekovih dejavnosti, v največji meri vpliva vsebnost kovin v matični podlagi – kamnini. Mnogokrat pa se vsebnost kovin v okolju poveča zaradi človekovih dejavnosti. Glavni antropogeni izvori le-teh so: emisije – aerosoli, suspendirani delci, izpušni delci, sredstva za varstvo rastlin, mineralna gnojila, blata čistilnih naprav in namakalne vode (Ross, 1994). Onesnaženje je lahko razpršeno (posledica emisij, požarov itn.), točkovno (deponije in odlagališča, izlivi ob nesrečah itn.) ali pa linijsko, ki ga zaznamo ob prometnih povezavah (Istenič, 2005).

Značilnosti težkih kovin so bile že večkrat izčrpno predstavljene (npr. Romih N. in sod., 2010), zato povzemam le nekatera pomembna dejstva.

Pb – je neesencialna težka kovina. Največji antropogeni viri onesnaževanja so promet, rudarstvo, topilnice, fosilna goriva, industrija in uporaba pesticidov. Prvi višek onesnaževanja s Pb je bil v antiki, drugi pa po industrijski revoluciji. Po letu 1965 opazamo izrazit upad.

Biodostopnost večajo anaerobne razmere ter nizek pH, zmanjšajo pa organska snov in fosfati. Vnos v rastline je pasiven, transport iz korenin v ostale dele rastlin je zelo majhen. Vnos v živali poteka preko hrane, dihanja, pitja. Sesalci absorbirajo 10–50 % inhaliranega in 2–20 % zaužitega Pb. Mlade živali ga absorbirajo več kot odrasle, večina pa se ga izloči z iztrebki in z urinom. Najpomembnejše motnje so poškodbe srca, ledvic in ožilja, vpliv na centralni živčni sistem, ledvica in jetra, ki so tudi najbolj primerni organi za bioindikacijo. Retencijski čas v mehkih tkivih je do 40 dni, v kosteh pa se obdrži od 10 do 30 let.

Cd – je neesencialna težka kovina. Največji onesnaževalci okolja s Cd so topilnice, barvna metalurgija, industrija (baterije, plastika), fosilna goriva, promet, uporaba pesticidov, mineralnih gnojil, sežigalnice ... Največje naraščanje onesnaževanja je bilo po drugi svetovni vojni, po letu 1970 pa je opaziti znaten upad. Biodostopnost s Cd je velika, če je pH manjši od 6, in majhna, če je pH večji od 7. Največja je na sedimentnih kamninah. Cd je zelo mobilna v rastlinah. V živali se ga največ vnese s hrano (absorbira se manj kot 5 % zaužitega Cd) in pitjem ter do 50-krat manj z inhalacijo. Večina ekskrecije, ki je majhna, poteka z urinom in zelo malo z iztrebki. Motnje, ki jih dobimo zaradi Cd, vplivajo na poškodbo ledvic, zmanjšano rast, anemijo ... Ledvice so najpomembnejši akumulacijski organ (primerjava z jetri cca. 10 : 1), s tem pa tudi organ, ki je najbolj primeren za bioindikacijo. Retencijski čas v mehkih tkivih sesalcev je več let.

Hg – je neesencialni element. Največje onesnaževanje okolja povzročajo rudarstvo, mineralna gnojila in pesticidi, industrija (papirna, cementna, kozmetična), odlaganje odpadkov, topilnice in fosilna goriva. V sedemdesetih letih so bile desetkrat večje emisije kot v sedanjem času. Največji vnos v rastline je iz zraka, iz tal pa privzem omejujejo mikorizne povezave. Vnos v živali poteka preko hrane, z dihanjem in s pitjem. Količina Hg, ki ga živali dobijo v telo z dihanjem, predstavlja le 0,2 % količine, ki jo dobijo s hrano. Osemdeset odstotkov ekskrecije poteka preko žolča in z iztrebki. Metil-Hg, ki se najlažje vnaša v rastline in živali, je 200-krat bolj strupen od anorganskega Hg. Vpliva lahko na poškodbe ledvic, na možgansko tkivo, na delovanje srca in manjša sintezo hormonov. Anorganski Hg (retencijski čas do 4 dni) najbolj akumulirajo ledvice, metil-Hg (retencijski čas 60–70 dni; več let v možganih) pa možgani, oba pa sta najbolj primerna organa za bioindikacijo.

As – je esencialna polkovina. Največji antropogeni viri onesnaževanja so barvna metalurgija, rudarstvo, topilnice, kemična industrija, fosilna goriva, uporaba pesticidov itn. Zaradi opuščanja arzenovih zaščitnih pripravkov so danes emisije bistveno manjše kot v preteklosti. Biodostopnost je največja v nevtralnih in rahlo bazičnih tleh, zmanjšuje pa jo predvsem organska snov. Vnos v rastline je pasiven, večina ga poteka v obliki Al in Fe oksidov. Največ As v rastlini je v koreninah in v starih listih. Absorbcija pri živalih je od 40 do 100 %, vnos pa poteka s hrano in pitjem in ne z dihanjem. Izločanje v 75 % primerov poteka z urinom. Negativni učinki As se vidijo pri motnjah centralnega živčnega sistema, bruhanju, diareji, obolenju kože, poškodbah jeter, dostikrat pa pride tudi do smrti. Akumulacijski organi so možgani, mišičnina, ledvice, jetra, vranica. Najbolj primeren organ za bioindikacijo so ledvice in pa včasih tudi dlaka. Retencijski čas je kratek, saj se anorganske (80–90 % v dveh dneh) in organske oblike izločijo zelo hitro.

Preglednica 1: Antropogeni izvor težkih kovin v okolju (Ross, 1994)

1. Rudarjenje in taljenje rude

Jalovina in žlindra (preperevanje in vetrna erozija): As, Cd, Hg, Pb

Rečni sedimenti in poplave: As, Cd, Hg, Pb

Izgube pri transportu rude in njenih separatov: As, Cd, Hg, Pb

Taljenje rude (vetrno prenašanje prahu in aerosolov): As, Cd, Hg, Pb, Sb, Se

Železarne in jeklarne: Cu, Ni, Pb

Brušenje kovin: Zn, Cu, Ni, Cr, Cd

2. Industrija

Plastike: Co, Cr, Cd, Hg

Tekstilna: Zn, Al, Ti, Sn

Mikroelektronika: Cu, Ni, Cd, Zn, Sb

Zaščita lesa: Cu, Cr, As

Rafinerija: Pb, Ni, Cr

3. Atmosferski depozit

Urbana in industrijska središča skupaj s sežigalnicami: Cd, Cu, Pb, Sn, Hg, V

Metalurška industrija: As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Ti, Zn

Avtomobilski izpusti: Mo, Pb, V

Izgorevanje fosilnih goriv in termoelektrarne: As, Pb, Sb, Se, U, V, Zn, Cd

4. Kmetijstvo

Mineralna gnojila: As, Cd, Mn, U, V, Zn

Organska gnojila: As, Cu, Mn, Zn

Apno: As, Pb

Fitofarmacevtska sredstva: Cu, Mn, Zn, As, Pb

Vode za namakanje: Cd, Pb, Se

5. Odlaganje odpadkov

Blata čistilnih naprav: Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn

Vode, ki odtekajo iz deponij: As, Cd, Fe, Pb

Odlagališča kovin: Cd, Cr, Cu, Pb, Zn

Požari in pepel: Cu, Pb

2.2 ZNAČILNOSTI SRNJADI

Z vidika naloge je zelo pomembno dejstvo, da je srnjad ena najbolj proučenih živalskih vrst.



Slika 1: Srnjad je zelo primerna vrsta za bioindikacijo onesnaženosti okolja (Vir: Živalski ..., 2005)

2.2.1 Prostorske značilnosti vrste

Rod srnjadi je razširjen v vsej zahodni Evropi in zahodni prednji Aziji, zahodni in južni polovici evropskega dela nekdanje Sovjetske zveze, v južni Sibiriji in na Daljnem vzhodu, v Kazahstanu, v pogorju Tienšan, v Mongoliji ter severovzhodnih, vzhodnih in jugovzhodnih predelih Kitajske, vse do Sečuana (Krže, 2000). Izven naravnega areala je bila uspešno naseljena tudi v Teksas.



Slika 2: Zemljevid razširjenosti (areala) evropske srne (*Capreolus capreolus* L.) in sibirske srne (*Capreolus pyragus* Pall.) (Vir: Simonič, 1976)

Srnjad živi od nižinskega sveta pa do visokogorja, pokriva skoraj vse habitatne tipe, razen sveta nad gozdno mejo, odprtih step ter vodnih in urbanih ekosistemov.

Značilna za srnjad je tesna navezanost na površinsko razmeroma majhno življenjsko okolje, je torej teritorialno živeča vrsta. Velikost areala aktivnosti je odvisna od habitatnega tipa, letnega časa, klimatskih razmer, količine razpoložljive hrane, energetskih potreb in gostote srnjadi.

Mysterud (1999) je v svoji raziskavi, ki je potekala v dolini Lier na jugu Norveške, pri majhni gostoti populacije odkril, da imajo srnjaki areal aktivnosti dvakrat večji kot srne in da se je 30 % srn odselilo dlje kot 10 km od mesta poganja. Prišel je tudi do spoznanja, da so bili poletni areali aktivnosti srnjadi večji kot zimski.

V parku Casantinesi v Italiji je Rossi s sod. (2003) prišel do ugotovitve, da so migracijam podvrženi skoraj izključno enoletni samci.

Krže (2000) je zbral podatke, da je bila v enem od švicarskih sredogorskih lovišč povprečna velikost teritorija srnjadi 49 ha (3–180 ha), v enem od gorskih lovišč pa 5 ha (1–15 ha). V času poleganja imajo srne dosti manjši teritorij (v sredogorju 7 ha, v gorskih predelih 2 ha), v času koncentracij in razbitja tropov pa v sredogorju 66 ha in v gorskem habitatu 7 ha.

Z vidika bioindikacije je torej pomembno, da srnjad ni migratorna vrsta in da je njen prostorski način življenja takšen, da v celoti opravičuje njeno uporabo v te namene.

2.2.2 Prehranjevanje srnjadi

Srnjad je prežvekovalec z značilnim načinom prehranjevanja in presnove. Prehranjuje se z mnogimi rastlinskimi vrstami ali njihovimi posameznimi deli. Glede na potrebe in ponudbo v življenjskem okolju popase posamezne izmed razpoložljivih rastlinskih vrst v zelo različnih količinskih razmerjih. V evropskem prostoru je najbolj tipičen visoko specializiran rastlinojedi izbiralec. Srnjad se je zaradi anatomske zgradbe prebavil primorana prehranjevati predvsem z lahko prebavljivo, visoko kakovostno hrano. Zaradi izbora rastlinskih vrst in intenzivnejšega prehranjevanja srnjad zaužije ter kopiči v svojih tkivih bistveno več kovin kot ostali, v srednji Evropi živeči prostoživeči prežvekovalci (Pokorny, 2003).

Srnjad je vrsta z minimalnim spolnim dimorfizmom, kar pomeni, da med spoloma ni večjih razlik v izbiri teritorijev, načinu prehranjevanja in količini zaužite hrane. Za nemoten razvoj ji je potrebna zelo raznolika rastlinska hrana. V svojem življenjskem okolju pase večino dostopnih rastlinskih vrst, čeravno mnoge med njimi tudi v zelo majhni količini. Med vodilne vrste, ki so zastopane v prehrani srnjadi, spadajo poleg nekaterih zelišč, kmetijskih rastlin, skupin trav, drevesnih plodov in gob predvsem lesnate drevesne in grmovne vrste, kot so gorski javor, beli gaber, rdeči bor, veliki jesen, jerebika, jelka, smreka, bodika, brogovita, bršljan, jesenska resa, različne vrste hrastov, topolov, drenov, brez, šipkov, borovnic in robid (zbrano v Simonič, 1976; Krže, 2000). Nič manj od vrste, količine in kakovosti hrane ni pomembno tudi kako, ob katerem času in v kakšnih okoliščinah je hrana srnjadi dosegljiva, in še posebno, kako lahko srnjad zaužito hrano potem s prebavo tudi dejansko izkoristi.

Zelo zanimivo raziskavo je izvedel Tixier s sod. (1997), v kateri so ugotovili, da se je preučevana srnjad zadovoljila z 80–94 % razpoložljive hrane. V odvisnosti od letnega časa pa je srnjad raje izbirala le majhno število rastlinskih vrst: jeseni in pozimi navadni bršljan; poleti dren; spomladi gaber, glog in kimasto nepravo hijacinto.

Zelo je zanimivo prehranjevanje z gobami, ki jih zaradi njihovih hiperakumulacijskih sposobnosti kopičenja težkih kovin uporabljamo kot akumulacijske kazalce onesnaženosti tal s težkimi kovinami (Al Sayegh Petkovšek in sod., 2002). V času intenzivne rasti so pogosto zastopane v prehrani srnjadi (Adamič, 2000), zato pomembno vplivajo na vnos težkih kovin v njen organizem (Pokorny in sod., 2004). Prav sezonska periodika prehranjevanja je zelo pomembna z vidika naloge, saj količina in vrstna sestava zaužite hrane neposredno določata vnos težkih kovin v organizem srnjadi.

2.2.3 Razmnoževanje in populacijski razvoj

Zaradi velike porabe energije, ki jo srne vlagajo v razvoj plodu in v laktacijo, morajo biti mladiči poleženi v kratkotrajnem obdobju optimalnih prehranskih razmer.

Čas poleganja je odvisen od geografskih razmer; nekoliko kasneje nastopi od jugozahoda proti severovzhodu in od ravnin v višine.

Veliko sinhronost poleganja je ugotovila Raganella-Pelliccioni s sod. (2007) v severni Italiji. Povprečen datum poleganja je bil 30. maj, mladiči pa so bili poleženi v intervalu 25 dni, od 19. maja do 13. junija. Osemdeset odstotkov mladičev je bilo poleženo v 17 dnevih.

Linnell in sod. (1998) na Norveškem ugotavljajo, da je povprečen datum poleganja 5. junij, 80 % mladičev je bilo poleženo v 26 dnevih.

Mateos-Quesada in Carranza (2000) navajata, da se je mladič v centralni Španiji polegel že 8. aprila. To potrjujejo Linne in sod. (1998), ki navajajo, da se večina mladičev v južni Španiji poleže aprila. V Angliji se večina mladičev poleže med 11. in 22. majem, v zahodni Franciji

okrog 15. maja, na Bavarskem 23. maja, na Danskem med 29. majem in 10. junijem, v tirolskih Alpah pa 13. junija.

V Sloveniji časovne dinamike poleganja ne poznamo. Pokorny (2003) je za namene svoje disertacije kot povprečni datum poleganja privzel 18. maj – sredino med modialnim dnevom poleganja v mediteranskem podnebjju Francije in v borealnem okolju Norveške.

Če upoštevamo povprečni datum in sinhronost poleganja, je starost mladičev mogoče retrogradno relativno natančno določiti. To velja vse do starosti 13–14 mesecev, ko se zaključí menjava zobovja. Kasneje je nemogoče točno določiti starost v naravi živeče srnjadi, ki ob rojstvu ni bila markirana (Pokorny, 2003).

2.2.4 Značilnosti in razvoj rogovja

Pri odraslih srnjakih rogovje sestavljata dve, v prerezu okrogli in ovalni veji, visoki od 15 do 25 cm, ki zrasteta na koščenih čelnih nastavkih, imenovanih rožnica. Iz obeh vej praviloma rasteta po dva izrastka (prednji in zadnji parožek). Med vejama pravilno ni razlik v številu parožkov. Nerazvejano rogovje imenujemo šilasto (šilar), rogovje z enim parožkom vilasto (vilar), srnjaka z dvema parožkoma na veji pa šesteraka. Glede na število parožkov na eni in na drugi veji lahko govorimo o pravilni oz. nepravilni stopnji razvitosti rogovja. Rogovje je obnovljiva kostna tvorba, ki vsako leto zraste na novo. Cikel rasti je odvisen od tvorbe spolnih hormonov (le-ta je neposredno odvisna od fotoperiode), zato se čas rasti rogovja med leti skoraj ne spreminja. Srnjak praviloma odvrže staro rogovje pozno jeseni, takoj zatem pa mu začneta rasti novi veji; njuna rast se zaključí zgodaj spomladi, ko srnjak iz njih očisti mah, rogovje pa postane mrtva kostna tvorba, ki jo nosi na glavi naslednjih nekaj mesecev oz. do pozne jeseni (Simonič, 1976).



Slika 3: Tipično za srnjaka je rogovje šesteraka (Foto: Hartl T., 2009)

Rogovje srnjadi ima številne funkcije, kot so: orožje za spopade, obramba pred plenilci, organ za označevanje (markiranje) življenjskega prostora, organ za imponiranje (Simonič, 1976).

Tvorba rogovja je energetsko zelo potraten proces, zaradi tega lahko posamezni osebek razvije močno rogovje le v optimalnih razmerah. Moč rogovja je odvisna od abiotskih dejavnikov, prehranskih razmer in starosti živali (Krže, 2000). Uporablja se lahko tudi v bioindikativne namene, in sicer kot možni odzivni kazalnik izpostavljenosti osebkov različnim vrstam okoljskega stresa, vključno z onesnaženostjo okolja (Pokorny, 2003). Poleg akumulacijske bioindikacije, tj. določanja vsebnosti onesnažil z afiniteto do kopičenja v kostnih tkivih (npr. svinec, fluoridi) v rogovju srnjakov (Pokorny, 2006; Kiedorf in Kiedorf, 2005; Pokorny in sod., 2004, 2009), je rogovje mogoče uporabiti tudi za odzivno bioindikacijo, in sicer z določanjem nihajoče asimetrije tega sicer bilateralno simetričnega sekundarnega spolnega znaka (Pokorny, 2003, 2006). V normalnih (nestresnih) razmerah namreč v velikosti leve in desne veje rogovja ne bi smelo biti nobenih razlik, in sicer zaradi:

- enakega genskega zapisa,
- enakega vpliva zunanjih dejavnikov,
- odmetavanja in rasti obeh vej, ki je časovno usklajeno.

2.3 ROGOVJE KOT REAKCIJSKI BIOINDIKATOR OKOLJSKEGA STRESA

Rogovje srnjadi predstavlja končni depo za nekatera onesnažila, ki se akumulirajo v kosteh. Zaradi časovno zelo determinirane in vsakoletne rasti rogovja je omogočena samostandardizacija analitskih metod. Obstajajo dobro datirane zbirke trofejev, kar nam omogoča retrospektivno študijo. Dosegljivost vzorcev je zaradi vsakoletnega velikega odstrela enostavna. Vse to so značilnosti rogovja, ki omogočajo njihovo uporabo v bioindikativne namene.



Slika 4: Dobro datirane zbirke so velika prednost pri analizah nihajoče asimetrije rogovja (Foto: Hartl T., 2009)

Vsaka sprememba v okolju, ki poruši ravnovesje v celicah živih organizmov, povzroči stres. Stres je značilno odstopanje od optimalnih razmer za življenje, ki vodi v spremembe na vseh ravneh organizma. O stresu govorimo, kadar jakost kateregakoli dejavnika presega prilagoditveno normo posameznega organizma (Batič, 1997).

Dejavniki stresa (stresorji) so lahko abiotskega izvora:

- mehansko delovanje vetra ali snega,
- povečana radiacija,
- temperaturni ali vlažnostni ekstremi,
- pomanjkanje kisika,
- pomanjkanje ali presežek hranil,
- slanost, kislost, bazičnost,
- izpostavljenost težkim kovinam,

ali biotskega izvora:

- različni znotrajvrstni in medvrstni odnosi,
- antropogeno povzročeni stres.

Delovanju stresa sledi reakcija izpostavljenih organizmov, ki je lahko na različnih ravneh. Odzivi niso vedno specifični za vsak posamezni stresor, zato je zaželeno, da hkrati merimo jakost stresa in način ter velikost odziva; pri tem je pomembno, da so odzivi čim bolj enostavni in lahko merljivi (Batič, 1997).

Meritve nihajoče asimetrije so se pokazale kot zelo uporaben kazalec stresnih razmer (Møller, 1990). Nihajoča asimetrija (*fluctuating asymmetry*; FA) je mera naključnih odklonov od popolne bilateralne simetrije v razvoju morfoloških znakov, ki naj bi bili navadno simetrični (Hafner, 2004). Predstavlja neusmerjene razlike med levo in desno polovico bilateralnih znakov (Møller, 1990). Nastane, ko nobena od strani pri bilateralnih značilnosti ne teži, da bi bila večja kot nasprotna, oziroma ko v razvoju določenega znaka ni tendence, da bi imela ena polovica telesa njegovo večjo vrednost kot nasprotna. Znaka sta normalno simetrična, odkloni od idealne simetrije pa lahko nastopijo zaradi različnih motenj v razvoju znaka (Hafner, 2004).

Rogovje srnjadi je sekundarni spolni znak. Njegova tvorba je energetskega zelo potratna, zato lahko močno in pravilno rogovje razvijejo le osebk, ki so v dobrem zdravstvenem stanju (Swaddle, 2003). Zaradi izločevanja manj kakovostnih osebkov se asimetrija zmanjšuje s starostjo ter z velikostjo rogovja. Le kvalitetni osebk in osebk, ki niso pod stresom, lahko proizvedejo simetrično rogovje (Pelabon in Van Breukelen, 1998). Se pravi, da je asimetrija

povezana s parametri kvalitete, zato se lahko uporablja kot kriterij za presojo vitalnosti in zdravja med posameznimi osebki, kot tudi vpliva stresa življenjskega okolja, ki mu je bil osebek izpostavljen v razvoju. Isti geni naj bi kontrolirali parne morfološke znake na obeh straneh organizma, zato se lahko slučajni odkloni od bilateralne simetrije, ki proizvajajo FA, uporabljajo kot indikator razvojne stabilnosti (prilagojeno po Pokorny, 2003).

Bartoš in Bahbouch (2006) sta ugotovila, da je imela jelenjad z večjo sposobnostjo za razmnoževanje (paritveni potencial), tudi večjo velikost oz. razvejanost rogovja. Asimetrija rogovja se je zmanjševala z večjim (razvejanim) rogovjem.

Če upoštevamo porazdelitev razlik med levo in desno polovico (»L-D razlike«) v celotnem vzorcu, lahko ločimo tri vrste nihajoče asimetrije (zbrano v Pokorny in sod., 2004):

- usmerjeno asimetrijo (DA): asimetrija je normalno stanje; med polovicama obstajajo značilne razlike v razvitosti znaka, pri čemer je običajno močnejše razvita ista stran; aritmetična sredina znaka je zato na eni polovici večja kot na drugi (npr. desni rog damjakov je zaradi uporabe v spopadih samcev bolj razvit kot levi);
- antisimetrijo (AS): asimetrija je normalno stanje; med obema polovicama obstajajo razlike, vendar ne moremo predvideti, katera stran ima večjo vrednost določenega znaka (večji znak se z enako verjetnostjo pojavlja na levi in na desni polovici – primer je različna velikost klešč pri številnih vrstah rakov); »L-D razlike« se porazdeljujejo bimodalno in imajo aritmetično sredino $\bar{a} = 0$;
- nihajočo asimetrijo (FA): za razliko od DA in AS sta v tem primeru znaka normalno simetrična, odkloni od idealne simetrije pa nastopijo zaradi različnih motenj v razvoju znaka; ker ni težnje, da bi imela ena polovica večjo vrednost določenega znaka kot druga, se »L-D razlike« porazdeljujejo normalno in imajo aritmetično sredino $\bar{a} = 0$ (Swaddle, 2003); vrednosti FA so majhne in v večini primerov ne presegajo 5 %, pogosto so celo manjše od 1 % obsega merjene lastnosti.

Nihajoča asimetrija nima nobene dedne osnove, ki je prisotna pri usmerjeni asimetriji in antisimetriji. Nihajoča asimetrija se lahko s povečevanjem stresa spremeni v usmerjeno simetrijo ali antisimetrijo. V majhnih vzorcih pa se lahko nihajoča asimetrija pokaže tudi kot antisimetrija (Swaddle, 2003).

Statistična opredelitev porazdelitve razlik med obema stranema je nujna, ker lahko le na ta način izločimo motečo prisotnost DA in AS. S tem pa zagotovimo, da velikost antisimetrije določenega znaka dejansko odraža delovanje stresnih dejavnikov (Tomkins in Kotiaho, 2001).

Vrednosti nihajoče asimetrije so majhne in v večini primerov ne presegajo 5 %, pogosto so celo manjše od 1 % obsega merjene lastnosti. Nihajoča asimetrija se pogosto šteje za kazalnika nestabilnosti okolja ali nesposobnosti osebka, da se v svojem razvoju upira dejavnikom okoljskega stresa (Swaddle, 2003).

Asimetrija je močan napovednik zdravja na področju rasti, plodnosti in preživetja, čeprav zajema le nekaj odstotkov variance. Osebki z večjo sposobnostjo obvladovanja stresa naj bi imeli manjšo asimetrijo v primerjavi z drugimi osebki v populaciji. Simetrični osebki naj bi imeli določene kvantitativne prednosti pred svojimi nesimetričnimi konkurenti. V procesu parjenja in izbire potencialnih partnerjev naj bi imeli simetrični osebki večje možnosti za pristop do samic v primerjavi s konkurenti, ki so manj simetrični, kar posledično pomeni njihov večji reprodukcijski uspeh (Swaddle, 2003).

Prednosti nihajoče asimetrije z vidika izvedb biomonitoringov (zbrano v Pokorny, 2003):

- univerzalna možnost uporabe,
- odražajo multipli okoljski stres,
- na pojav stresnih razmer opozarjajo že pred upadom vitalnosti populacij,
- meritve lahko izvajamo na živih organizmih,
- vzorcev ne uničimo,
- možnost retrospektivnih raziskav,
- uporaba možna tako v laboratorijih kot v naravi,
- hitre, poceni in enostavne analize,
- analize ne zahtevajo velikih finančnih vložkov.

Slabosti nihajoče asimetrije (zbrano v Pokorny, 2003):

- enostavnost meritev omogoča hiperprodukcijo raziskav, ki niso dovolj statistično in vsebinsko podprte,
- časovni zamik med izpostavljenostjo stresu in meritvami,
- neselektiven odziv na različne dejavnike stresa,

- asimetrija odkriva predvsem razlike v izpostavljenosti med populacijami, ne pa razlik med osebki znotraj iste populacije,
- potrebno je zbrati relativno velik vzorec,
- potencialno velika napaka meritev.

Velikost asimetrije rogovja srnjadi je zaradi vsakoletne (časovno standardizirane), hitre in energetske potratne rasti uporaben indikator, ki kaže na kakovost okolja v določenem trenutku. Med najpomembnejše stresorje, ki vplivajo na povečano asimetrijo, spada onesnaženost okolja s težkimi kovinami (Swaddle, 2003).

2.4 LEDVICE KOT INDIKATOR ONESNAŽENOSTI OKOLJA

Za ugotavljanje onesnaženosti okolja s težkimi kovinami so notranji organi najprimernejša skupina tkiv, ki jih uporabljamo predvsem za akumulacijsko bioindikacijo.

Na EPA listo persistentnih strupenih snovi z bioindikacijskim potencialom so kot najbolj problematični uvrščeni elementi, ki so rakotvorni ali prizadenejo encimatsko delovanje in presnovo (Pokorny, 2001). Med njih prištevamo svinec, živo srebro, kadmij, arzen, krom, nikelj, baker in cink; prve štiri smo vzeli tudi v raziskavo. Poleg razpršenih virov emisij (promet, uporaba kemičnih preparatov v kmetijstvu in gozdarstvu) prispevajo k obremenitvi okolja s temi prvinami na lokalni in regionalni ravni tudi točkovni viri, ki so povezani z izgorevanjem fosilnih goriv, predelavo rudnin ali odlaganjem odpadkov. Območja v bližini elektroenergetskih objektov so zato primeri »vročih« točk – območij, kjer so prostoživeče živali najbolj izpostavljene delovanju težkih kovin (Pokorny, 2003).

Pri bioindikaciji onesnaženosti okolja je za pravilno interpretacijo rezultatov treba upoštevati kar nekaj bioloških dejavnikov:

- živalska vrsta,
- vzorčno tkivo,
- spol,
- starost,
- sezona zbiranja podatkov.

Način prehranjevanja je vzrok, da srnjad akumulira več težkih kovin kot ostali prežvekovalci (Pokorny, 2001). Zaradi majhnega vampa in velikih energetskih potreb mora izbirati lahko prebavljive in s hranili bogate rastlinske vrste. Te vrste pa vsebujejo tudi več kovin kot druge vrste v istem okolju.

Najbolj primeren organ za spremljavo onesnaženosti okolja s težkimi kovinami (Cd, Pb, Hg) so ledvice, saj se v njih akumulira večina težkih kovin (Măcinic in sod., 2009; Pompe-Gotal in Prevendar Crnić, 2002). Zanimivo je razmerje vsebnosti Cd med ledvicami in jetri. V ledvicah je približno 10-krat več Cd kot v jetrih (Pompe-Gotal in Prevendar Crnić, 2002). Ledvice so edini dovolj občutljiv organ, v katerem lahko ugotovimo tudi majhne spremembe v izpostavljenosti osebkov.

Pompe-Gotal in Prevendar Crnić (2002) sta v severnem delu Hrvaške določila vsebnost Cd v mišicah, jetrih in ledvicah srnjadi. Razpon koncentracij Cd, izražen v mg/kg sveže snovi, je bil sledeč: za mišice 0,003–0,065; za jetra 0,015–2,306, za ledvice 0,223–27,686. 43 % vzorcev jeter in celo 90 % vzorcev ledvic je bilo preko maksimalne zakonsko določene vrednosti.

Garcia in sod. (2010) so v SZ Španiji preučevali vsebnosti Cd, Pb in Zn v ledvicah, jetrih in mišicah srnjadi. Pri srnah so ugotovili višje vsebnosti Cd kot pri srnjakih, nasprotno pa za Pb niso ugotovili nobenih razlik. Večina raziskovalcev ni ugotovila razlik v akumulaciji težkih kovin med spoloma (Pokorny, 2003).

Kolar (1999) navaja povišane koncentracije svinca v tkivu srnjadi in gamsov v koroški regiji v obdobju od leta 1985 do 1988 v 29,2 % mišičnega tkiva, 43,5 % vzorcih ledvic in 27,3 % jeter. 3,1 % vzorcev je presegalo dovoljeno koncentracijo kadmija v mišičnem tkivu, 78,3 % je presegalo koncentracijo kadmija v ledvicah in 64 % je presegalo koncentracijo kadmija v jetrnem tkivu.

Večina raziskovalcev (npr. Măcinic in sod., 2009; Pompe-Gotal in Prevendar Crnić, 2002; Garcia in sod., 2010) je ugotovila, da s starostjo srnjadi naraščajo vrednosti Cd.

Vsebnost težkih kovin v organih srnjadi naj bi kulminirala v poznem poletju oz. zgodnji jeseni, kar je posledica večje intenzitete ter pogostega prehranjevanja z gobami v tem letnem času (Pokorny in sod., 2004). Variabilnost je povezana zlasti z izborom (dosegljivostjo) hrane, delno pa tudi s fiziološkimi procesi.

Gnamuš (2002) je na širšem področju Idrije ugotovil, da je privzem Hg v kopenske sesalce s hrano pomembnejši od privzema hlapne kovine z dihanjem. Študija je pokazala značilne poškodbe celic v skorji ledvic, ki jih je bilo mogoče pripisati posledicam dolgotrajne izpostavljenosti visokim koncentracijam Hg v življenjskem okolju. Izračuni in ovrednotenje privzema Hg iz okolja v srnjad in človeka na preiskovanih območjih so pokazali mnogo večji privzem kovine s hrano skozi prebavila, v primerjavi z vdihavanjem zračnega Hg, ki predstavlja pri srnjadi le do 0,6 % in pri človeku največ do 18 % s hrano privzete kovine, celo na z emisijami močno onesnaženih območjih.

Z vidika bioindikacije so pomembne prostorske primerjave, ki kažejo na različne ali enake vsebnosti težkih kovin v notranjih organih srnjadi. Mäcinic in sod. (2009) so med sabo primerjali 2 območji in ugotovili velike razlike med vsebnostjo Cd pri odrasli srnjadi. V onesnaženem območju so bile vsebnosti Cd 404 % večje kot v kontrolnem, neonesnaženem območju.

Pokorny (2003) je ugotovil, da se vsebnosti težkih kovin med območji razlikujejo in so odraz onesnaženosti življenjskega okolja, v katerem živali živijo. S Cd je najbolj obremenjena srnjad na Pokljuki, s Pb in Cu v Zgornji Mežiški dolini, s Hg v Kočevskem Rogu ter na Pokljuki, s Cr pa v Zasavju. Obremenjenost srnjadi na Pokljuki je posledica svojstvenih abiotskih in biotskih razmer na tej visoki planoti, obremenjenost v Zgornji Mežiški dolini pa posledica rudarjenja in topilniške dejavnosti. Ne glede na spol, starost živali, sezono odstrela in območje uplenitve so se vsebnosti težkih kovin v ledvicah srnjadi nahajale v intervalih (mg/kg svežega vzorca): Cd: 0,11–32,6; Pb: <0,02–0,76; Hg: <0,01–3,20; As: <0,02–0,23.

Srnjad absorbira le manjši delež zaužitih težkih kovin; približno 65 % vseh zaužitih kovin izločijo živali z iztrebki, nekaj pa tudi z urinom in z akumulacijo v tkivih, ki jih kasneje odvržejo (dlaka, rogovje) (Pokorny, 2003).

3 NAMEN, CILJI IN HIPOTEZE RAZISKAVE

V Sloveniji je bila srnjad kot bioindikator onesnaženosti okolja z ioni težkih kovin v zadnjem desetletju že večkrat uporabljena, njena sistematična uporaba kot ciljne bioindikatorske živalske vrste v kopenskih ekosistemih je predlagana in vključena tudi v program *Okoljskega monitoringa kemikalij*, ki ga je v letu 2008 pripravila ekspertna skupina, imenovana s strani *Urada RS za kemikalije*. Vendar pa so bile dosedanje raziskave in biomonitoringi omejeni predvsem na območja v okolici večjih točkovnih in razpršenih virov emisij (npr. Šaleška dolina, Zgornja Mežiška dolina, Zasavje, Poljanska dolina, okolica Idrije, vojaški poligon Počeki), relativno slabo pa so preučena manj obremenjena območja, kakršno bi lahko bilo npr. Kozjansko.

Srnjad izpolnjuje številne kriterije, ki naj bi jih izpolnjevala vrsta, ki jo želimo uporabiti v bioindikativne namene: visoka stopnja kopičenja onesnažil; pozitivna povezava med vnosom onesnažil v ekosisteme in njihovimi vsebnostmi v tkivih srnjadi; določena tkiva (rogovje, čeljusti) omogočajo vsebinsko utemeljene in zanesljive retrospektivne raziskave; standardizirane vzorčevalne in analitske metode lahko enostavno razvijemo; vrsta ni ogrožena in ima ekološki optimum skoraj povsod po Evropi; teritorialen način življenja z arealom aktivnosti, ki je praviloma bistveno manjši od 100 ha; ekološke in fiziološke značilnosti vrste so dobro poznane; specifičen način prehranjevanja (rastlinojedi izbiralec); relativno dolga življenjska doba; etično sprejemljivo vzorčenje v sklopu rednega odstrela živali; pomembna zastopanost mesa srnjadi v prehrani ljudi (Pokorny in sod., 2009).

V raziskavo smo vključili dva tipa vzorcev srnjadi – notranje organe (ledvice) kot zbiralne in rogovje kot odzivne bioindikatorje.

Z nalogo smo hoteli doseči naslednji namen:

– kot akumulacijske bioindikatorje uporabiti in preizkusiti ledvice srnjadi – določiti stopnjo onesnaženosti na Kozjanskem in rezultate primerjati z vzorci iz Šaleške doline,

– raziskati dnevno akumulacijo težkih kovin v ledvicah srnjadi,– preizkusiti metodo reakcijske bioindikacije (merjenje nihajoče asimetrije rogovja; ang. *fluctuating asymmetry*: FA), s katero lahko dobimo vpogled v izpostavljenost populacij različnim vrstam okoljskega oz. genetskega stresa.

Cilj okoljskega biomonitoringa kemikalij (v tem pomenu se izraz kemikalije nanaša na različna v okolje vnesena anorganska in organska onesnažila antropogenega izvora), katerega izvedba je v Sloveniji predpisana z *Zakonom o kemikalijah*, je pridobiti statistično pomembne količine podatkov, s katerimi dobimo vpogled v dejanske obremenitve življenjskega okolja in organizmov s konkretnimi onesnažili (Kononenko, 2009). Podatki, ki jih bomo dobili, odražajo celotno izpostavljenost preučevani kemikaliji, poleg tega pa bomo prišli tudi do podatkov o spremembah in trendih izpostavljenosti.

Konkretni raziskovalni cilji so:

A Z uporabo ledvic srnjadi:

A.1. izmeriti vsebnosti težkih kovin na Kozjanskem,

A.2. ugotoviti razlike v vsebnostih težkih kovin med območjem Kozjanskega in Šaleško dolino,

A.3. ugotoviti vsebnosti težkih kovin v odvisnosti od dneva uplenitve.

B Z uporabo rogovja srnjakov:

B.1. izbrati ustrezne znake za meritve nihajoče asimetrije rogovja srnjakov, in sicer z upoštevanjem velikosti napake meritev, motečih oblik asimetrije ter najprimernejših metod obdelave podatkov,

B.2. narediti retrospektivno študijo spreminjanja asimetrije rogovja srnjakov na Kozjanskem.

Raziskovalne hipoteze so naslednje:

A.1. V povprečju naj ne bi vsebnosti preučevanih elementov segale preko najvišjih dovoljenih vsebnosti, ob predpostavki, da je Kozjansko neonesnaženo območje. Dovoljene vsebnosti Pb, Cd, Hg in As v živilih živalskega izvora so določene v: Ur. l. SFRJ 59/1983, 79/1987; Ur. l. RS 69/2003; EC 1881/2006.

A.2. Vsebnost težkih kovin ter njihova akumulacija v ledvicah srnjadi je večja v emisijam bolj izpostavljeni Šaleški dolini kot na Kozjanskem.

A.3. Vsebnosti Cd v ledvicah srnjadi s starostjo živali značilno naraščajo, medtem ko vsebnosti Pb, As in Hg v tem organu niso odvisne od dneva uplenitve srnjadi. Razlog je v dolgem, več desetletij trajajočem retencijskem času Cd v mehkih tkivih sesalcev in hitrem izločanju ostalih naštetih kovin.

B.1. Vsi znaki rogovja srnjadi so primerni za obdelavo nihajoče asimetrije.

B.2. Nihajoča asimetrija je odličen pokazatelj izpostavljenosti stresu, vključno z delovanjem onesnažil.

4 MATERIAL IN METODE DELA

4.1 OBMOČJE RAZISKAVE

Raziskava je potekala na območju treh lovskih družin, in sicer: LD Kozje, LD Podčetrtek in LD Podsreda. Ker vse tri lovske družine ležijo na območju Kozjanskega, smo pri opisu naravno-geografskih značilnosti uporabili le-to.

Kozjansko ali Srednjesotelsko gričevje je pokrajina vzhodnega Posavskega hribovja v porečju Bistrice v srednjem delu vzhodne Slovenije. Na jugu meji na hribovje Orlica (Veliki vrh, 697 m) in Bohor (Veliki Javornik, 1023 m), na severu na Žusem (669 m) in Rudnico (Plešivec, 686 m), na vzhodu na Sotlo. Zahodna meja se naslanja na razvodje pritokov Savinje in Save. V njej se prepletajo predalpske in subpanonske značilnosti, ki dajejo izrazito pestrost v naravno-geografskih potezih.



Slika 5: Orientacijska karta Kozjanskega (Vir: Tretja razvojna ..., 2008)

Območje je brez osrednjega, prostornejšega podolja. Njegovo površje lahko razčlenimo na več pokrajinskih enot – dolini rek Bistrica in Sotla, ki ju obrobajo hriboviti predeli Rudnice, Bohorja, Veternika in Orlice, ter gričevnat svet na vzhodnem delu pokrajine. Višinska razlika med dnem doline reke Bistrice in bližnjimi slemeni se s približevanjem Sotli zmanjša z nekaj več kot 200 m na okoli 100 m. Gorice so tod manj strme in bolj zaobljene. Površje vzhodno od Bistrice v glavnem še presega 400 m, s približevanjem Sotli pa so gričevnata slemena vedno nižja. Najnižja točka v pokrajini je z nekaj več kot 170 m na Sotli, na skrajnem jugovzhodu pokrajine (Sajovic, 2005).

Srednja letna temperatura zraka je le malo pod 10 °C, januarska pa od -1 do -2 °C. V hladnejši polovici leta se v dolinah uveljavlja toplotni obrat. Ta je lahko neugoden zgodaj spomladi ob začetku vegetacijske dobe. To velja predvsem za dolino ob Bistrici, manj pa vzdolž srednje Sotle. Ožji dolinski deli namreč zavirajo odtekanje hladnega zraka, kar samo povečuje temperaturne razlike med nižjimi in vzpetimi deli pokrajine. V toplem pasu, ki se v prisojnih legah začne od 10 do 30 m nad dolinskim dnem in je najizrazitejši okoli 100 m nad njim, so zato pozimi temperaturna povprečja višja, poleti, ko se doline močno ogrejejo, pa nižja (Sajovic, 2005).

Letna količina padavin narašča proti zahodu oziroma s približevanjem vznožju okoliškega hribovitega obrobja. Razlike v letni količini padavin med posameznimi padavinskimi postajami so glede na manjšo razgibanost površja precejšnje, saj so v Podčetrtku namerili 1086 mm padavin, v Podsredi pa že 1137 mm. V gričevju in ob Sotli je količina nekoliko manjša. Največ padavin je v poletnem trimesečju, drugi višek pa je novembra. Zaradi velikega deleža neprepustnih kamnin je ob močnih padavinah površje zelo izpostavljeno eroziji. S podnebnimi značilnostmi je povezana tudi pogosta suša, do katere pride v letih, ko izostane poletni padavinski višek (Sajovic, 2005).

Prevladuje relativno gosta mreža vodotokov v številnih grapah s pogostimi pobočnimi izviri. Ožilje pokrajine predstavljata porečji rek Sotla in Bistrica. Sotla je v zadnjem desetletju (vsaj v zgornjem toku) v 4. kakovostnem razredu. Onesnaženost lahko potencialno povzročajo Steklarna Rogaška, jezero Vonarje (danes izpraznjeno in izsušeno) ter kmetijske površine z uporabo različnih škodljivih snovi. Reka Bistrica, najdaljši rečni tok na Kozjanskem, je naravno dobro ohranjena, zaradi redke poseljenosti in ekstenzivne kmetijske pridelave je tudi

onesnaženost minimalna. Ponekod se le pojavljajo posamezne točke onesnaženosti zaradi neurejene kanalizacije.



Slika 6: Pogled na kozjansko pokrajino (Vir: Kozjansko, 2008)

Večje, strnjene gozdne površine na antiklinalnih hrbtih sestavljajo pretežno mešani listnati gozdovi. Najpomembnejše drevesne vrste so bukev, kostanj in hrast graden. Manjše gozdne zaplate se sicer pojavljajo na severnih ekspozicijah in na večjih strminah prisojnih leg. Pogoste so tudi monokulture iglaste združbe. Višje prisojne lege vsebujejo termofilno rastje, med njimi tudi brin. Močvirno rastje se pojavlja na vlažnih travnikih, na počasnejših poplavnih odsekih vodotokov: takšne obrežne pasove vegetacije sestavljajo jelše, vrbe, redkeje jesen. Vrbovje in jelševje sta torej značilni združbi, ki se pojavljata predvsem ob sotelskih pritokih in v dolini Sotle.

Polovica površin je namenjena obdelovanju, skoraj polovico pa pokriva gozd. V začetku 90. let prejšnjega stoletja je gozd pokrival kar 90 % vse površine. Najbolj sklenjena območja gozda so na Bohorju, kjer so predvsem samotne kmetije in zaselki. Drugo večje območje je na Žusmu in Rudnici.

Kljub obrtni tradiciji, ki je začela proti koncu 19. stoletja zamirati, se je na Kozjanskem šele pred kratkim začel skromnejši razvoj industrije. V zadnjih desetletjih je nastalo nekaj manjših

industrijskih obratov, podružnic podjetij, katerih sedeži so v bližnjih večjih središčih. V spodnje-miocenskih sedimentih pri Babni Gori in Spodnjem Tinskem so pred drugo svetovno vojno kopali premog, vendar so danes vsa delovišča skoraj neopazna. Železovo rudo so v preteklosti kopali okoli Olimja in Podčetrтка ter pri Pilštanju. Na južnem pobočju Rudnice, med Podčetrtkom in Slivjem, kjer se nahajajo tudi magmatske kamnine, so včasih kopali železovo in svinčeno rudo (Aničić, 1984).

Danes so naravni viri večinoma agrarne narave, kar pomeni, da so v večji meri lahko izkoriščene le kmetijske površine in gozdovi. To se kaže tudi v velikem odstotku kmečkega prebivalstva v pokrajini. Surovin in energetskih virov je zelo malo, v vsakem primeru pa premalo, da bi jih lahko izkoriščali v večji meri. Proizvodnja in izkoriščanje naravnih bogastev je bilo tukaj v primerjavi z ostalimi pokrajinami, ki jih je zajela industrijska revolucija, v veliki meri nerentabilno (Žagar, 1967).

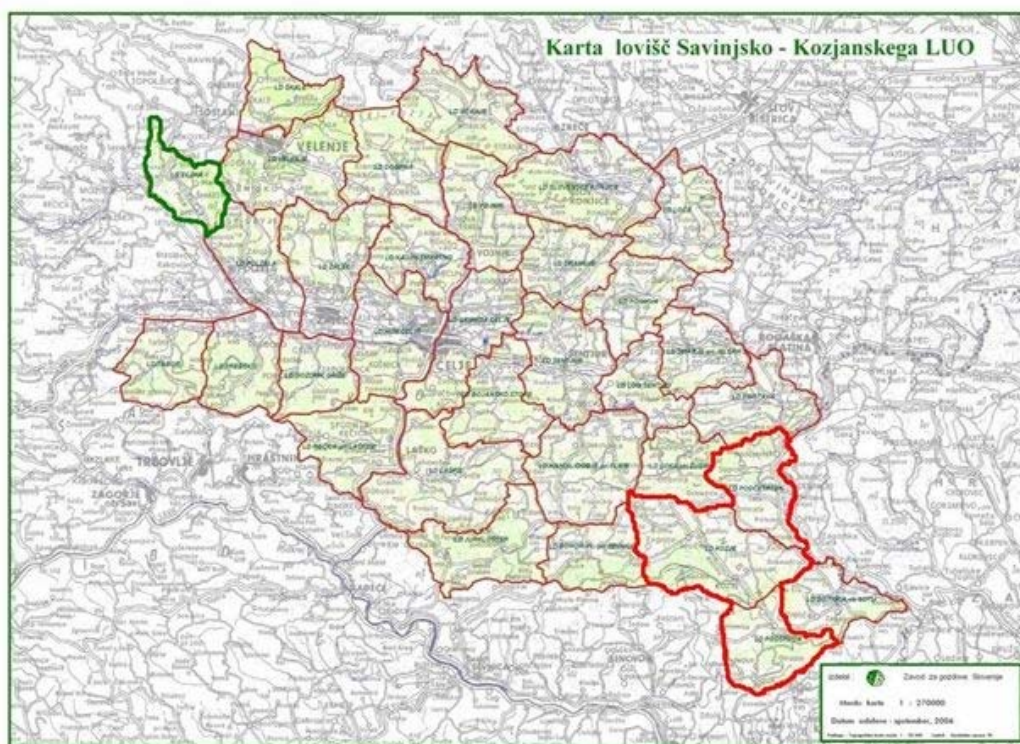
Za to območje ni nobenih obsežnejših študij ali meritev, na podlagi katerih bi lahko sklepali o stanju okolja v tem delu Savinjske statistične regije. Nobena od občin nima večjih okoljskih problemov. To lahko pripišemo manjši industrializiranosti območja. Zrak najbolj obremenjujejo emisije iz prometa in kurišč. V območju pa so lahko prisotna zračna onesnažila, ki izvirajo izven obravnavanega območja, in sicer zlasti iz Celja in Krškega. Tveganje za okolje predstavlja tudi odlaganje komunalnih odpadkov. Večina obstoječih deponij je zapolnjenih in neustrezno urejenih (Regionalna ..., 2006).

Veliko posebnost znotraj Kozjanskega predstavlja Kozjanski regijski park, ki je bil ustanovljen leta 1981 s posebnim zakonom kot Spominski park Trebče. Leta 1996 se je preimenoval v Kozjanski park in s 206 km² sega v občine Bistrica ob Sotli, Kozje, Podčetrtek, Brežice in Krško. To je prvi in največji regijski park v Sloveniji, odlikuje pa ga raznolika pokrajina, naravne zanimivosti, bogata kulturna dediščina in tradicija. 69 % Kozjanskega parka spada v področje Natura 2000 (Kozjanski ..., 2009).

4.2 DELO Z VZORCI

4.2.1 LEDVICE

Vzorke ledvic srnjadi smo v sklopu rednega odstrela (ob pomoči lokalnih lovcev upleniteljev) zbirali od 3. 10. 2005 do 31. 12. 2005. V tem času smo zbrali vzorce tkiv 14 osebkov srnjadi, uplenjenih v loviščih Kozje, Podčetrtek in Podsreda. Vsi uplenjeni osebki srnjadi so bili mladiči, s čimer smo zaradi odprave starostno pogojene akumulacije Cd v ledvicah skušali doseči čim večjo standardizacijo, potrebno za relevantno primerjavo s Šaleško dolino. Za slednjo smo namreč z istimi metodami pridobili tudi podatke o vsebnostih težkih kovin v ledvicah srnjadi, uplenjene v istem letu v lovišču Oljka, Šmartno ob Paki, tj. lovišču, ki je močno izpostavljeno emisijam iz termoelektrarne Šoštanj.



Slika 7: Območja lovišč, s katerimi upravljajo lovske družine (LD) Kozje, Podčetrtek in Podsreda (rdeče obkrožena) oz. primerjalno Oljka, Šmartno ob Paki (zeleno obkrožena) (Vir: Letni ..., 2009)

Takoj po odstrelu so uplenitelji ledvice shranili v plastične vrečke. Vzorce so opremili s podatki o kraju in času uplenitve. Kakor hitro je bilo možno, so tkiva globoko zamrznili. Zamrznjena smo hranili do kemijskih analiz, ki so jih opravili v laboratoriju inštituta ERICo Velenje.

Analitske metode:

Homogenizacijo vzorcev smo naredili z mlinčkom Büchi-Mixer B-400 s keramičnim nožem. Za pripravo vzorcev smo uporabili mokri sežig z mikrovalovno napravo CEM MSP 1000 (zatehta vzorca 1,4–1,5 g; reagent 7 ml HNO₃ konc., z dodatkom H₂O₂). Za meritve vsebnosti Hg smo uporabili hidridno tehniko na atomskem absorpcijskem spektrometru (Perkin Elmer SIMAA 6000), za meritve vsebnosti Cd, Pb in As pa tehniko plazmatske masne spektrometrije (ICP-MS, instrument Hewlett Packard 4500). Skladnost izmerjenih vsebnosti referenčnega materiala (Bovine liver BCR 185) s certificiranimi vrednostmi (vse meritve so bile znotraj intervala zaupanja vrednosti kovin v BCR vzorcu) je potrdila natančnost uporabljenih analitskih metod.

4.2.2 ROGOVJE

Meritve asimetrije smo izvedli na vzorcu 163 rogovij odraslih srnjakov, ki so bili uplenjeni v obdobju 1975–2005, in sicer v loviščih Kozje in Podčetrtek. Vsa rogovja smo obravnavali kot enoten vzorec s Kozjanskega.

Preglednica 2: Število vzorcev rogovij, razdeljenih po obdobjih uplenitve

Obdobje uplenitve	1975–1979	1980–1984	1985–1989	1990–1994	1995–1999	2000–2004	2005
Število vzorcev	10	29	23	30	27	28	16

Deformirano (povsem asimetrično) rogovje je predvsem posledica fizičnih poškodb osebkov in ne okoljskega stresa (Pokorny in sod., 2004). Zaradi tega deformiranega rogovja nismo vključili v raziskavo, s tem pa smo izločili vpliv poškodb na stopnjo nihajoče asimetrije. Zaradi potencialne napake meritve v raziskavo prav tako nismo vključili rogovja v mahu, rogovja z zlomljenim vrhom ter rogovja, ki je imelo zlomljene prednje ali zadnje paroške.

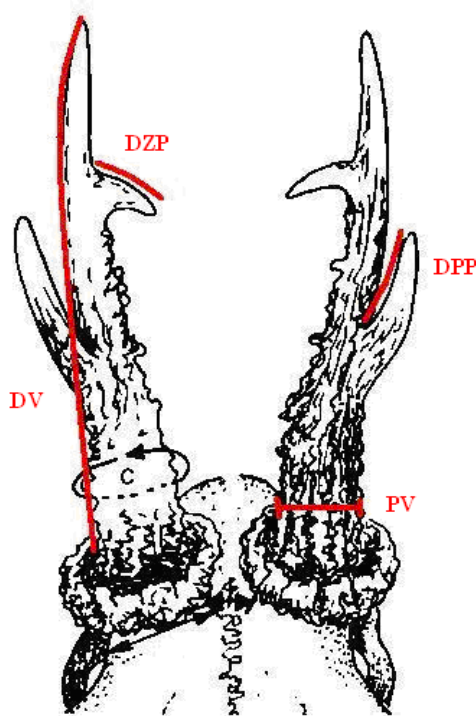


Slika 8: Zaradi mehanskih poškodb poškodovanega rogovja nismo vključil v raziskavo (Foto: Hartl T., 2009)

Na vsaki veji smo merili naslednje merske znake:

- dolžino veje nad rožo,
- dolžino prednjega parožka,
- dolžino zadnjega parožka,
- premer veje tik nad rožo.

Vse tri dolžine smo merili z merilno vrvico na 0,1 cm natačno, premer pa s kljunatim merilom na 0,1 mm natačno. Dolžino veje smo merili po zunanji strani od zgornjega roba rože do vrha roga.



Slika 9: Merjeni parametri rogovja (dolžina veje nad rožo (DV), dolžina prednjega parožka (DPP), dolžina zadnjega parožka (DZP), premer veje tik nad rožo (PV))

4.3 STATISTIČNE METODE

4.3.1 LEDVICE

Vsebnosti večine onesnažil v tkivih imajo desno asimetrično (logaritemsko) porazdelitev, za katero velja $\bar{a} > Me > Mo$. Normalnost porazdelitve in homogenost varianc smo skušali doseči z logaritemsko transformacijo izmerjenih vrednosti.

Za vse statistične analize smo uporabili statistični paket SPSS for Windows 10.0. Razlike smo pri vseh primerjavah upoštevali kot statistično značilne, če je bila velikost statističnega tveganja $p < 0,05$. Za vzorce, v katerih so bile vsebnosti posamezne kovine pod mejo določljivosti uporabljene analitske metode, smo pri izračunih upoštevali polovično vrednost meje detekcije. Meje določljivosti so bile: 0,01 µg/g za Cd, As in Hg in 0,05 µg/g za Pb. Vse v nadaljevanju podane vsebnosti so izražene v mg/kg svežega vzorca.

Za posamezne primerjave smo uporabili sledeče statistične metode:

- Izračunali smo vse srednje vrednosti z intervalom zaupanja, standardne odklone, mediane, moduse ter določili minimalne in maksimalne vrednosti za vse proučevane kovine na Kozjanskem in jih primerjali s podatki iz Šaleške doline.
- Velikost dnevne akumulacije kovin smo določili z izračunom regresijskega koeficienta (b) linearne regresije, kjer smo kot neodvisno spremenljivko privzeli ocenjeno starost v dnevih in kot odvisno vsebnost posamezne kovine v ledvicah. Pri določitvi starosti smo za vse živali (mladiče) kot povprečen datum poleganja upoštevali 18. maj (glej poglavje 1.2.3.), starost pa smo določili iz razlike med datumom uplenitve (posredoval uplenitelj) in tako ocenjenim datumom poleganja.

4.3.2 ROGOVJE

Predpogoj za uporabo asimetrije kot merila razvojne stabilnosti je izbor ustreznih znakov. Natančna ocena in izločitev napake merjenja je pogoj za izvedbo korektnih FA analiz. Velikost bilateralne asimetrije je namreč običajno majhna, zato so lahko rezultati močno obremenjeni z napako meritev. Nihajoča asimetrija odraža delovanje stresnih dejavnikov, medtem ko imata antisimetrija in usmerjena asimetrija genetsko ozadje. Zato moramo opraviti preizkus prisotnosti antisimetrije in usmerjene asimetrije (normalnost porazdelitve, aritmetična sredina se ne sme razlikovati od 0). Z izključitvijo genetskega ozadja zagotovimo, da velikost asimetrije določenega znaka dejansko odraža delovanje stresnih dejavnikov (zbrano v Swaddle, 2003).

Značilnost rogovij smo preučevali v vzorcu 163 odraslih živali, ki so bile uplenjene v obdobju 1975–2005.

Za vse statistične analize smo uporabili statistični paket SPSS for Windows 10.0.

Glede na možnost vpliva napake merjenja na asimetrijo smo izvedli trikratno merjenje parametrov dvanajstih naključno izbranih rogovij, in sicer smo vsako ponovitev opravili najmanj po preteku enega dneva.

Velikost napake merjenja v primerjavi s celotno variabilnostjo med osebki smo določili z dvofaktorsko analizo varianc (osebek x ponovitev), pri čemer smo zanesljivost posamezne meritve določili iz povprečne razlike med varianco med osebki in skupno varianco znotraj osebkov:

$$r = (MS_I - MS_m) / (MS_I + (k-1) MS_m).$$

Relativno velikost napake merjenja v primerjavi z variabilnostjo med obema stranema smo določili za vsak znak posebej z dvofaktorsko analizo variance (stran x osebki). Relativna napaka pomeni dejansko napako meritev asimetrije dveh bilateralnih strani. Varianca napake predstavlja povprečen kvadrat odstopanj znotraj osebkov:

$$MS_{\text{notraj}} = MS_m = \sigma^2_m,$$

varianco med stranema pa izraz:

$$\sigma^2_i = (MS_{\text{Sj}} - MS_m) / k.$$

Dejansko napako meritev smo podali z razmerjem:

$$\sigma^2_m / \sigma^2_i.$$

Pri tem mora biti izpolnjen pogoj, da je varianca interakcije ($MS_{\text{interakcija}} = MS_{\text{Sj}}$) značilno večja (F-test z ustreznimi stopinjami prostosti) od variance napake merjenja (MS_m) (Pokorny in sod., 2004).

Opombe:

r = zanesljivost posamezne meritve – cenilka, pridobljena iz vzorca in predstavlja točkovno vrednost za σ , ki velja v populaciji

MS_m = povprečni kvadrat napake merjenja

MS_{Sj} = povprečni kvadrat stran x osebek

MS_{J} = povprečni kvadrat za osebek

k = število ponovljenih meritev

Poleg posameznih znakov smo kot novo variabla uporabili tudi skupno dolžino rogovja (SDV), ki predstavlja vsoto dolžine veje in obeh parožkov.

Razlike med desno in levo stranjo (D-L) določenih znakov se pri FA razporejajo normalno in imajo aritmetično sredino enako $\bar{a} = 0$. S tem smo izločili prisotnost antisimetrije in usmerjene asimetrije, ki imata genetsko ozadje.

Prisotnost asimetrije smo za vsak znak posebej preizkušali s t-testom za odvisne vzorce. Test smo izvajali po metodi parov, in sicer smo kot prvo vrednost za vsak par vedno vzeli večjo in kot drugo manjšo vrednost. Isti test smo uporabili tudi za preizkus prisotnosti usmerjene asimetrije ((DA) v smeri morebitne bolj razvite značilnosti na eni strani telesa), pri čemer sta

par predstavljali meritvi dolžine določenega morfološkega znaka na levi oziroma desni veji istega rogovja.

Normalnost porazdelitve razlik med levo in desno stranjo (L-D razlike) smo preizkusili s *Shapiro-Wilk's W-testom*. Vzroke (asimetrija, bimodalnost, ozkoveršnost) za odstopanje od normalnosti, ki lahko pomenijo prisotnost AS in DA, smo ugotavljali z ustreznim t-testom asimetrije (*skewness*, $t = g_1/sg_1$) in sploščenosti (*kurtosis*, $t = g_2/sg_2$). Znaki, katerih L-D razlike se porazdeljujejo bimodalno ali širokoveršno (prisotnost AS) oziroma so na eni strani značilno večji kot na drugi (prisotnost DA), niso primerni kot kazalci stresa, zato smo jih izpustili iz nadaljnjih analiz (zbrano v Pokorny in sod., 2004).

Odvisnost FA od velikosti znaka smo določali z izračunom korelacijskega koeficienta (r) linearne regresije med absolutno razliko /L-D/ (odvisna spremenljivka) in večjo vrednostjo usteznega znaka.

V primeru primerjave FA med petletnimi obdobji smo razlike preizkušali z *Levenovim testom* homogenosti varianc; le-ta je v primerjavi z ostalimi testi manj občutljiv na odklon od normalnosti porazdelitve, zelo enostaven za računanje (analiza variance absolutnih |L-D| razlik) in je skoraj tako učinkovit kot *Bartlettov test*, zato predstavlja najbolj primeren preizkus za potrebe FA analiz (Pokorny in sod., 2004).

5 REZULTATI

5.1 LEDVICE

Vsebnosti težkih kovin na Kozjanskem in primerjava s Šaleško dolino

V preglednici 4 so predstavljene vsebnosti Cd, Pb, Hg in As v ledvicah srnjadi, uplenjene na Kozjanskem leta 2005. Podane so:

- aritmetične sredine s 95 % intervalom zaupanja ($\bar{a} \pm t_{0,05} * SE$),
- standardni odkloni (SD),
- mediane (Me),
- modusi (Mo),
- minimalne in maksimalne vrednosti (Min in Max),
- delež vzorcev, ki prekoračujejo najvišje dovoljene vsebnosti, podane v preglednici 3.

Preglednica 3: Dovoljene vsebnosti Pb, Cd, Hg in As v ledvicah srnjadi, določene z Ur. l. SFRJ 59/1983, 79/1987 (a); Ur. l. RS 69/2003 (b); EC 1881/2006 (c)

Živilo	Pb	Cd	Hg	As
Ledvice	0,5 mg/kg ^{(b), (c)}	1,0 mg/kg ^{(b), (c)}	0,1 mg/kg ^(a)	0,5 mg/kg ^(a)

Preglednica 4: Vsebnosti Cd, Pb, Hg, As v ledvicah mladičev srnjadi na Kozjanskem v letu 2005 (v mg/kg svežega vzorca)

Element	n	$\bar{a} \pm t_{0,05} * SE$	SD	Me	Mo	Min	Max	Delež vzorcev, ki presegajo dovoljene vsebnosti
Cd	14	0,48 ± 0,30	0,52	0,31	0,10	0,10	1,70	14 %
Pb	14	0,07 ± 0,04	0,07	0,04	0,03	0,03	0,25	0
Hg	14	0,05 ± 0,35	0,06	0,02	0,00	<0,01	0,20	14 %
As	14	0,01 ± 0,00	0,01	0,01	0,00	<0,01	0,02	0

Pod mejo določljivosti je bilo 14 % vzorcev Hg in 42 % vzorcev As, zato smo pri izračunavanju uporabil njihove polovične vrednosti.

Zaradi lažjega razumevanja, kaj izmerjeni podatki s Kozjanskega sploh pomenijo, je v spodnji preglednici primerjava s Šaleško dolino. Podatki za Šaleško dolino so bili dobljeni iz vzorca 35 osebkov srnjadi, uplenjenih leta 2005 v lovišču Oljka, Šmartno ob Paki.

Preglednica 5: Vsebnosti Cd, Pb, Hg, As v ledvicah srnjadi na Kozjanskem in v Šaleški dolini v letu 2005 (v mg/kg svežega vzorca)

Element	Območje	n	$\bar{a} \pm t_{0,05} * SE$	SD	Me	Min	Max
Cd	Kozjansko	14	$0,48 \pm 0,30$	0,52	0,31	0,10	1,70
	Šaleška dolina	14	$0,37 \pm 0,13$	0,22	0,34	0,11	1,00
Pb	Kozjansko	14	$0,07 \pm 0,04$	0,07	0,04	0,03	0,25
	Šaleška dolina	35	$0,16 \pm 0,06$	0,20	0,08	0,04	1,01
Hg	Kozjansko	14	$0,05 \pm 0,35$	0,06	0,02	<0,01	0,20
	Šaleška dolina	35	$0,13 \pm 0,11$	0,34	0,02	0,01	1,63
As	Kozjansko	14	$0,01 \pm 0,00$	0,01	0,01	<0,01	0,03
	Šaleška dolina	35	$0,01 \pm 0,00$	0,01	0,01	<0,01	0,02

OPOMBE: Za Cd je značilno kopičenje s starostjo, zaradi česar smo primerjavo izvedli le za 14 vzorcev – toliko je bilo mladičev v Šaleški dolini.

Vsebnosti težkih kovin v odvisnosti od dneva uplenitve

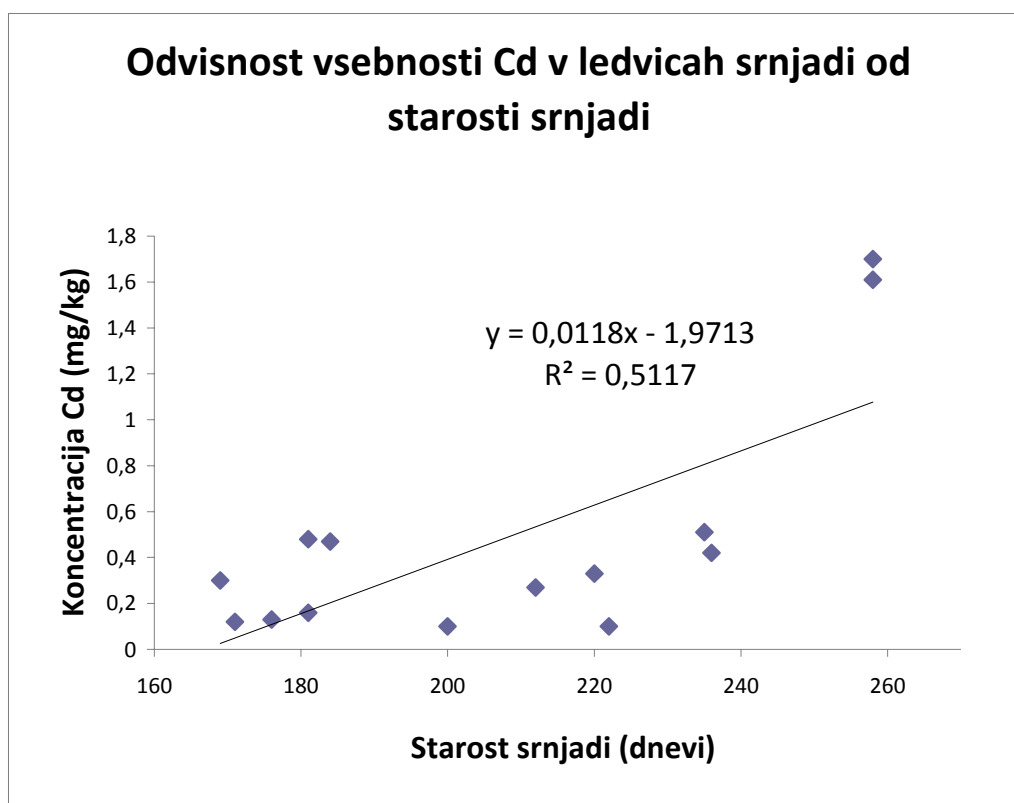
Regresija je prikazana na spodnji preglednici in na sliki.

Preglednica 6: Parametri linearne regresije med ocenjeno starostjo mladičev v dnevih in vsebnostjo kovin v njihovih ledvicah (Kozjansko, n=14)

Element	korelacijski koeficient (r)	regresijski koeficient (b_0)
Cd	0,71**	0,011
Pb	0,29	/
Hg	0,46	/
As	0,30	/

OPOMBE:

*** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; v primeru, da ni zvezdic, r ni značilno različen od 0.



Slika 10: Cd v ledvicah mladičev srnjadi v odvisnosti od ocenjene starosti (Kozjansko, n = 14)

5.2 ROGOVJE

Vse analize, ki so potrebne za korekten izbor ustreznih znakov in metod, temeljijo na številnih dejstvih in ugotovitvah, podanih v tuji literaturi (npr. Swaddle in sod., 1994; Palmer in Strobeck, 1986; Leung in Forbes, 1996; Palmer, 1994). Vse ugotovitve so bile sintezno zbrane v Pokorny (2003), kjer smo dobili tudi pripravljena izhodišča.

5.2.1 Napaka meritev znakov rogovja srnjakov

Velikost bilateralne asimetrije je običajno majhna, in sicer v večini primerov do 5 % izbranega znaka.

$$n = 12; t_{(12)} = 2,1788$$

Preglednica 7: Preizkus zanesljivosti meritev morfoloških znakov rogovja srnjakov (2-ANOVA s ponovitvami meritev)

Znak rogovja	MS (med osebk)	MS (znotraj osebkov)	r_j
DV	8,5226	0,1700	0,9425
DPP	3,5571	0,2113	0,8408
DZP	5,9975	0,1914	0,9100
PV	8,1181	0,4950	0,8370
SDV	15,7895	0,9503	0,8388

OPOMBE:

N=24.

MS je povprečen kvadrat odstopanj (med osebk: df=23; znotraj osebkov: df=48).

$r = (MS_I - MS_m) / (MS_I + (k-1) MS_m)$; r =zanesljivost meritev; k =število ponovitev.

Preglednica 8: Test virov variabilnosti znakov rogovja srnjakov (2-ANOVA: osebek x stran; n=12)

Znak rogovja	Med osebki		Med stranema (DA)		Interakcija (neusmerjena as.)		Napaka meritev	
	MS _j	p _j	MS _s	p _s	MS _{sj}	p _{sj}	MS _m (σ _m ²)	σ _m ² /σ _i ²
DV	17,742	<0,001	0,142	0,668	0,735	<0,001	0,017	0,070
DPP	7,348	<0,001	1,253	0,256	0,873	<0,001	0,006	0,020
DZP	12,450	<0,001	0,007	0,932	0,904	<0,001	0,005	0,016
PV	16,749	<0,001	0,333	0,698	2,101	<0,001	0,058	0,085
SDV	32,566	<0,001	0,436	0,760	4,442	<0,001	0,026	0,017

OPOMBE:

Osebk (MS_j; df=11) imajo značaj slučajnostnega faktorja.

Strani (MS_s; df=1) imata značaj fiksnega faktorja.

V imenovalcu F-testa značilnosti interakcije (MS_{sj}; df=11) je MS_m (df=48).

Kvocient σ_m²/σ_i² podaja relativno velikost napake meritev v primerjavi z variabilnostjo med stranema.

5.2.2 Obstoje asimetrije znakov rogovja srnjakov

Pred nadaljnjo obdelavo podatkov smo preizkušali ugotoviti obstoj asimetrije.

Preglednica 9: Preizkus obstoja asimetrije za znake rogovja srnjakov

Znak rogovja	n	$\bar{a}_{\max}$ (cm)	$\bar{a}_{\min}$ (cm)	t-vrednost	p
DV	163	20,7	20,0	15,990	<0,001
DPP	163	4,6	3,9	14,103	<0,001
DZP	163	4,1	3,4	13,452	<0,001
PV	163	18,7	18,0	13,739	<0,001
SDV	163	29,1	27,8	14,514	<0,001

OPOMBE:

$\bar{a}_{\max}$: povprečna velikost večjega znaka.

$\bar{a}_{\min}$: povprečna velikost manjšega znaka.

PV: merjeno v mm.

5.2.3 Prisotnost DA in normalnost porazdelitve L-D razlik

Preizkus prisotnosti DA smo opravili s t-testom za odvisne vzorce, in sicer po metodi parov, kjer sta par predstavljal meritvi istega znaka na desni in levi strani (veji) istega rogovja.

Preglednica 10: Preizkus prisotnosti DA (značilnosti razlik med levo in desno vejo rogovja srnjakov)

Znak rogovja	n	$\bar{a}_L$ (cm)	$\bar{a}_D$ (cm)	t-vrednost	p
DV	163	20,3	20,3	-0,553	0,581
DPP	163	4,2	4,2	0,261	0,794
DZP	163	3,7	3,8	-0,556	0,579
PV	163	18,4	18,5	-1,356	0,177
SDV	163	28,4	28,4	-0,420	0,675

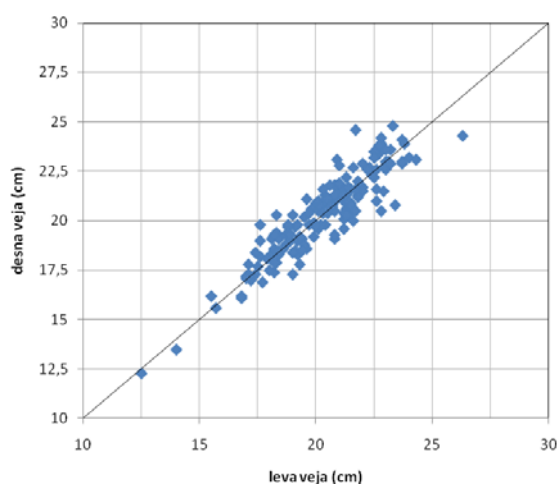
OPOMBE:

$\bar{a}_L$: povprečna velikost znaka na levi veji.

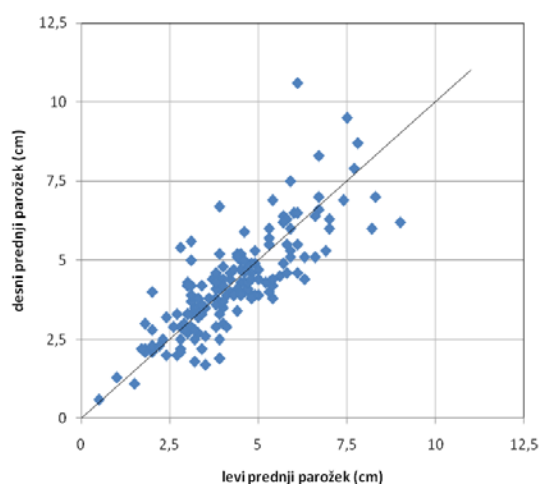
$\bar{a}_D$: povprečna velikost znaka na desni veji.

PV: merjeno v mm.

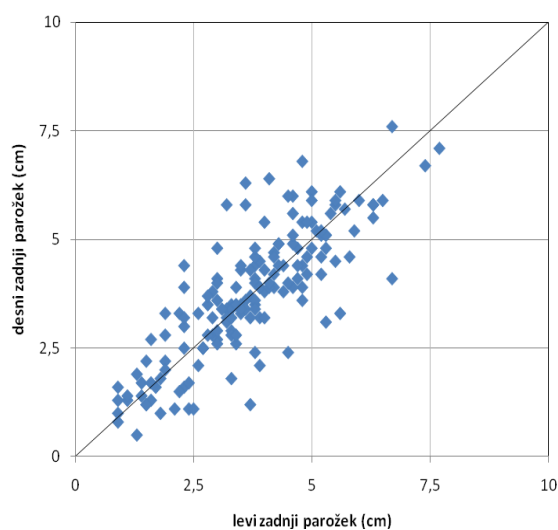
Soodvisnost med obema vejama v velikosti nekaterih znakov nam prikazuje slika 11.



$R=0,911^{**}$ (N=163)



$R=0,801^{**}$ (N=163)



$$R=0,896^{**} (N=163)$$

Slika 11: Soodvisnost med vejama v velikosti nekaterih znakov (DV, DPP, DZP) srnjakov, uplenjenih v obdobju 1975–2005 na Kozjanskem

Preglednica 11: Preizkus normalnosti porazdelitve »L-D razlik«

Znak	Shapiro		Asimetrija				Sploščenost			
	W	p	g ₁	s _{g1}	T	p	g ₂	s _{g2}	t	p
DV	0,9932	0,6444	0,0276	0,1901	0,1452	NS	0,5028	0,3780	1,3300	NS
DPP	0,9623	0,0002	-0,6433	0,1901	3,3838	***	2,6603	0,3780	7,0372	***
DZP	0,9712	0,0018	-0,0512	0,1901	0,2691	NS	1,3678	0,3780	3,6183	***
PV	0,9724	0,0024	-0,2555	0,1901	1,3436	NS	1,0822	0,3780	2,8627	**
SDV	0,9783	0,0114	0,3423	0,1901	1,8004	NS	2,1302	0,3780	5,6349	***

OPOMBE:

$$s_{g1} = \sqrt{[6n(n-1)/(n-2)(n+1)(n+3)]}.$$

$$s_{g2} = \sqrt{[24n(n-1)^2/(n-3)(n-2)(n+3)(n+5)]}.$$

$$t = g_1 / s_{g1} \text{ oziroma } t = g_2 / s_{g2}.$$

Statistično tveganje: ***: $p < 0,001$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,05$; NS: odstopanje od normalnosti ni značilno

Shapiro: Shapiro Wilk's W-test.

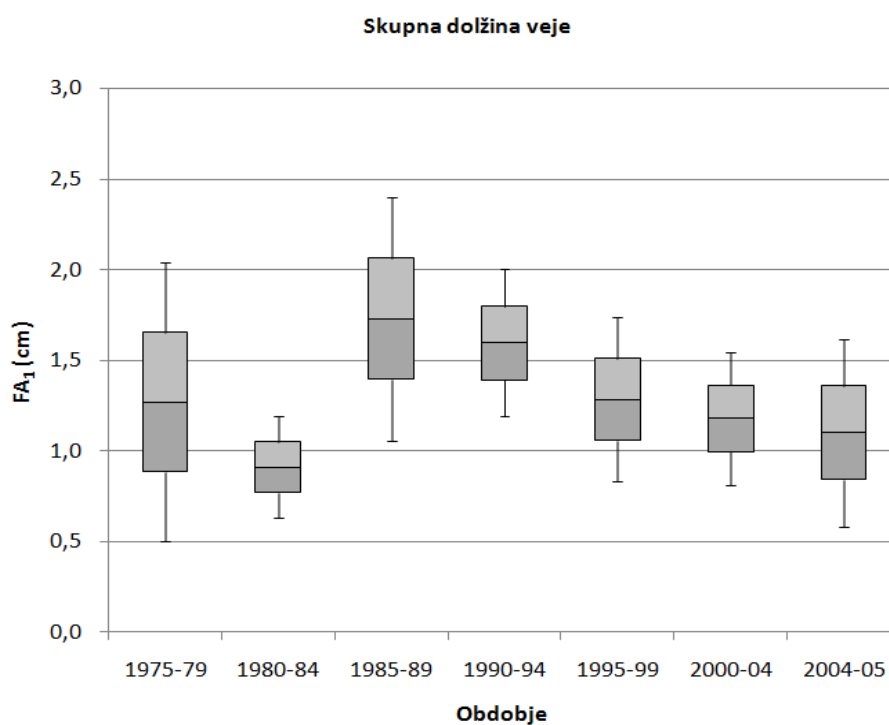
5.2.4 Odvisnost FA od velikosti znaka

Preglednica 12: Parametri linearne regresije med velikostjo (večjo vrednostjo) znaka in absolutno razliko L-D

Znak rogovja	n	r	p
DV	163	0,312	<0,001
DZP	163	0,209	<0,05
PV	163	0,253	<0,001
SDV	163	0,303	<0,001

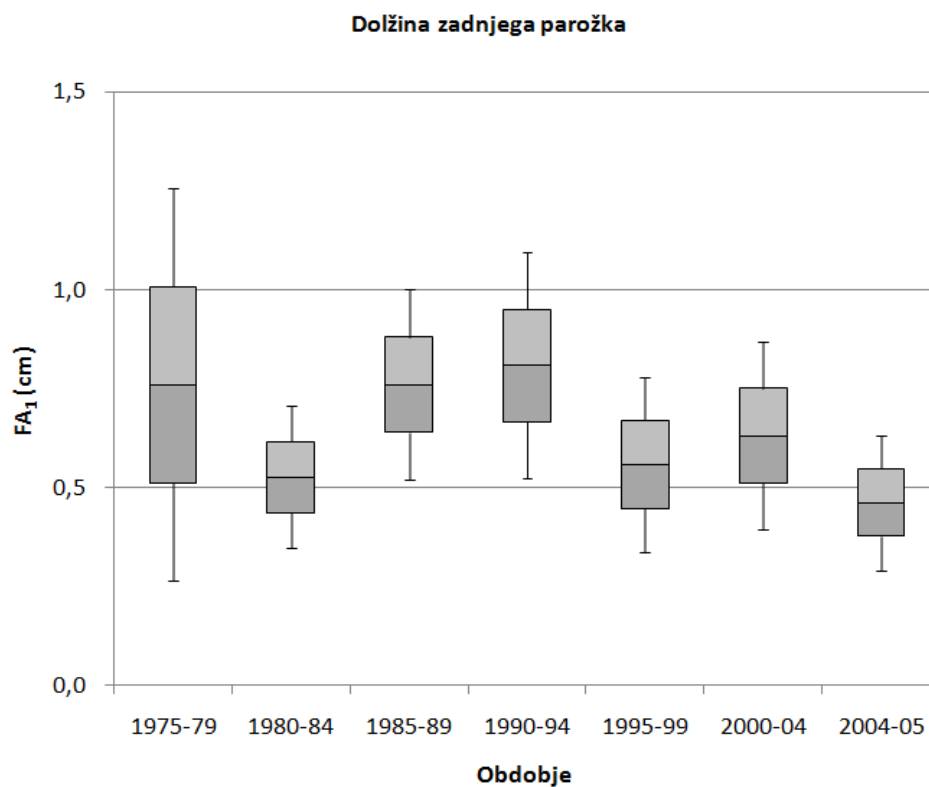
5.2.5 Spreminjanje FA rogovja srnjakov v obdobju 1975–2005

Med petletnimi obdobji razlike v asimetriji (FA_1) SDV niso značilne (Levenov test: $F_{(6,156)}=1,678$; $p=0,130$).



Slika 12: Časovno spreminjanje FA rogovja srnjakov (znak SDV), uplenjenih v obdobju 1975–2005

Razlike v asimetriji (FA_1) ZP so na meji značilnosti (Levenov test enakosti varianc: $F_{(6,156)}=1,862$; $p=0,091$).



Slika 13: Časovno spreminjanje FA rogovja srnjakov (znak DZP), uplenjenih v obdobju 1975–2005

6 RAZPRAVA

6.1 LEDVICE

Vsebnosti težkih kovin na Kozjanskem in primerjava s Šaleško dolino

Kot je razvidno iz preglednice 4, je 14 % vzorcev vsebovalo več Cd in Hg, kot je zakonsko določeno. Nobena izmed preučevanih težkih kovin pa ni dosegala vrednosti, ki bi lahko ogrožale vitalnost osebkov oz. dolgoživost populacij. Za Cd znaša kritična vrednost v ledvicah približno 100 mg/kg, za Pb 4–4,5 mg/kg in za Hg 30 mg/kg (Pokorny, 2003).

Potencialno najbolj problematičen naj bi bil Cd, vendar je bila večina določenih vrednosti v mejah normale. Mladiča, ki sta imela največjo vsebnost v ledvicah (1,61 mg/kg in 1,70 mg/kg), sta bila uplenjena 31. 12., na zadnji lovni dan. Opoziriti je treba, da gre za mladiče, ki imajo bistveno manj Cd v primerjavi z odraslimi živalmi. Nasploh sta ti dve vrednosti med višjimi, ki so bile izmerjene v ledvicah mladičev kjerkoli v Sloveniji. Cd se vnaša v ekosistem tudi preko mineralnih gnojil (Air ..., 2010) in morda je prav kmetijstvo vzrok večjih vsebnosti Cd. Vplivi na zrak na območje Kozjanskega prihajajo izven obravnavanega območja, in sicer iz Celja in TE Trbovlje (Regionalna ..., 2006), za Cd pa je značilno, da se prenaša na velike razdalje. Cd je sicer nevaren za skoraj vsak fiziološki proces v organizmu. Velike vsebnosti Cd povzročajo zmanjšano rast, anemijo, nezadostno mineralizacijo kosti, resne poškodbe ledvic, razširitev srca, nastanek rakavih obolenj ... Vrednosti, ki bi lahko ogrožale srnjad z ohranitvenega vidika, se ponavadi pojavijo pri zelo majhnem številu zelo starih živali.

Pb z ekosistemskega vidika ni danes problematičen skoraj nikjer po Sloveniji (z izjemo neposredne bližine topilnice svinca v Žerjavu (Pokorny, 2003)) in prav tako tudi na Kozjanskem ne. Pb zelo slabo prehaja iz tal v rastline in naprej v živali, hkrati pa se v živalskem organizmu kopiči predvsem v kosteh in se zato ne kopiči po prehranjevalni verigi. Vsebnosti Pb v ledvicah so zato pokazatelj trenutne izpostavljenosti osebkov.

Vsebnosti Hg v raziskavi so daleč pod kritičnimi vrednostmi za srnjad, vendar sta dva vzorca vsebovala več Hg, kot je zakonsko določeno. Za Hg so značilne sezonske razlike v

vsebnostih, s kulminacijo v jesenskem času. To sovpada z obdobjem intenzivne rasti gob oz. to je posledica kvalitativnih in kvantitativnih sprememb v prehrani srnjadi.

Vsebnosti As so bile zelo majhne in so v številnih vzorcih pod mejo detekcije (42 % vzorcev).

Z vidika vpliva kovin na dolgoživost srnjadi vsebnosti kovin niso problematične.

Iz preglednice 5 je razvidno, da se vsebnosti kovin v ledvicah srnjadi med območjema ne razlikujejo veliko.

Povprečne vsebnosti Cd v ledvicah mladičev srnjadi se ne razlikujejo med Kozjanskim in Šaleško dolino, pri čemer so na Kozjanskem največje izmerjene vrednosti celo večje kot v Šaleški dolini in so v dveh vzorcih presegale dopustne vsebnosti. Večje vrednosti so presenetljive in niso v skladu s postavljeno hipotezo o manjši obremenjenosti Kozjanskega v primerjavi z emisijsko ogroženim predelom Šaleške doline. Vzrok za to je lahko daljinski transport onesnažil. Za Cd je značilno, da se prenaša na velike razdalje, zato je obremenitev povečana tudi daleč od industrijskih središč. Pomembno je, da so izpostavljeni prav višje ležeči predeli in ravno na takšnem sta bila uplenjena tudi mladiča s povečano vsebnostjo Cd. Kot smo že omenili, je lahko vzrok tudi v kmetijstvu, preko vnosa mineralnih gnojil.

Vsebnosti Pb in Hg v ledvicah srnjadi so v obeh območjih daleč pod kritičnimi vrednostmi. V Šaleški dolini smo ugotovili večjo obremenjenost kot na Kozjanskem. Za vsebnost Hg je sicer značilna sezonska kulminacija, ki sovpada z obdobjem intenzivne rasti gob (Pokorny, 2003).

Arzen je za sesalce esencialen element, ki je lahko pri velikih vsebnostih tudi strupen (Pokorny, 2003). Se pa ta element zelo slabo kopiči v prehranjevalni verigi srnjadi. Vsebnosti As, ugotovljene v nalogi, so zelo majhne, veliko vzorcev pa je tudi pod mejo detekcije. Na Kozjanskem je bilo takšnih vzorcev 42 %, v Šaleški dolini pa 31 %.

Vsebnosti težkih kovin v odvisnosti od dneva uplenitve

Za srnjad je značilno, da se mladiči v določenem letu poležejo v intervalu manj kot 30 dni, več kot polovica pa znotraj dveh tednov (Pokorny, 2003). Zaradi tega lahko starost v dnevih dokaj natančno določimo. Kot povprečni datum smo privzeli 18. maj. Dnevno akumulacijo kovin smo ugotavljali z izračunom regresijskega koeficienta linearne regresije. Za neodvisno spremenljivko smo vzeli starost mladičev srnjadi v dnevih. Le-to smo določili s številom dni, ki so potekali od 18. maja do dneva uplenitve posameznega mladiča.

Korelacijski koeficient r nam pojasni jakost linearne povezave, ki je pri Cd bistveno močnejša kot pri ostalih elementih. Izračun korelacijskih koeficientov potrjuje hipotezo, da se s starostjo v ledvicah srnjadi znatno kopiči Cd, kar pa ne velja za ostale tri preučevane elemente. Za Cd nam naklon premice (velikost regresijskega koeficienta) pove, za koliko enot (mg/kg sveže snovi) se z vsakim letom poveča vsebnost v ledvicah srnjadi. Ob izločitvi vpliva konstante (nastavitev izračuna na $a = 0$) znaša vrednost regresijskega koeficienta $b_D = 0,011$. Poudariti je treba, da je privzeta starost živali obremenjena z določeno napako. Če na podlagi povprečne dnevne akumulacije Cd izračunamo akumulacijo v celem letu ($b_D \cdot 365$ dni), se vsako leto vsebnost Cd v ledvicah srnjadi na Kozjanskem v povprečju poveča za 4,01 mg/kg, kar je zelo veliko in je posledica dveh vzorcev s konca leta (1,61 mg/kg in 1,70 mg/kg). Nasploh sta ti dve vrednosti med višjimi, ki so bile izmerjene v ledvicah mladičev kjerkoli v Sloveniji. Če izračun opravimo brez teh dveh vrednosti, znaša vrednost regresijskega koeficienta $b_D = 0,0019$ in posledično se akumulacija v ledvicah mladičev v celem letu poveča za 0,69 mg/kg, kar je primerljivo z rezultati, ki so bili ugotovljeni v drugih delih Slovenije. Pokorny (2003) je v svoji disertaciji ugotovil, da se s starostjo živali najbolj višajo vsebnosti Cd na Pokljuki (letna akumulacija približno 2,24 mg/kg ledvic), najmanj na Kočevskem (0,77 mg/kg), medtem ko med Šaleško (0,98 mg/kg) in Zgornjo Mežiško dolino (0,90 mg/kg) ni pomembnih razlik.

6.2 ROGOVJE

6.2.1 Napaka meritev znakov rogovja srnjakov

Ker je velikost bilateralne asimetrije običajno majhna, so lahko zaradi tega rezultati obremenjeni z napako meritev. Predpogoj za izvedbo ustreznih FA analiz je natančna ocena in izločitev napak. Preizkus natančnosti meritev smo opravili s tremi časovno neodvisnimi ponovitvami meritev vseh za raziskavo zanimivih morfoloških znakov leve in desne veje dvanajstih naključno izbranih rogovij.

Preciznost meritev znakov je velika, saj so bile povprečne relativne napake meritev manjše od 4 %.

Iz preglednice 7 je razvidno, da je zanesljivost meritev velika, kar dokazuje, da večkratno merjenje istega znaka ni potrebno.

Čeprav sta zanesljivost in preciznost meritev veliki, se oba kazalca natančnosti nanašata zgolj na kakovost posameznih meritev, ne upoštevata pa hkratne napake meritve na bilateralnem znaku. Velikost asimetrije ni merski znak, ampak predstavlja variabilnost med dvema odvisnima meritvama; dobro merilo natančnosti določitve FA predstavlja zato relativna velikost napake merjenja v primerjavi z variabilnostjo med obema polovicama. Parametri 2-ANOVA (stran kot fiksni, osebki kot slučajnostni faktor) trikratno časovno neodvisne ponovitve meritev obeh vej dvanajstih rogovij srnjakov so podani v preglednici 8.

Uporaba določenega znaka za oceno FA je dopustna v primeru, če je varianca interakcije (MS_{sj}) značilno večja od variance napake merjenja (MS_m). Značilnost interakcije v primerjavi z napako merjenja podaja p_{sj} . Kot je razvidno iz preglednice 8, vsi merjeni znaki ustrezajo statistični zahtevi, torej se jih da meriti z dovolj veliko natančnostjo, potrebno za izvedbo korektnih analiz FA. Za merjene parametre DPP, DZP, SDV je prispevek napake merjenja k variabilnosti med stranema zelo majhen (kvocient $\sigma_m^2/\sigma_i^2 < 0,020$). Pri DV in PV je prispevek napake merjenja k stopnji FA bistveno večji in je potrebno nadaljnje rezultate upoštevati z določeno mero zadržkov.

Ker je p_s v intervalu od 0,256 do 0,932, smo zaključili, da za noben merjen znak ne obstajajo statistično značilne razlike med levo in desno vejo rogovja srnjakov. To pomeni, da za noben parameter nismo ugotovili prisotnosti usmerjene asimetrije (DA). Ker pa je to le majhen vzorec (12 rogovij), smo prisotnost DA in normalnost porazdelitve L-D razlik preizkusili še z drugimi testi.

6.2.2 Obstoje asimetrije znakov rogovja srnjakov

Pred nadaljnjo obdelavo podatkov smo preizkušali ugotoviti obstoj asimetrije. Primerjali smo razlike med stranema in ugotavljali, če so razlike med večjo in manjšo vrednostjo znotraj para značilno različne (večje) od nič. Obstoje asimetrije smo za vsak znak posebej preizkušali s t-testom po metodi parov, pri čemer smo kot prvo vrednost za vsak par vzeli večjo in kot drugo manjšo vrednost. Pri vseh znakih smo odkrili obstoj asimetrije, zato so primerni za nadaljnje raziskave. Ker pa ta test ne pokaže prisotnosti različnih oblik asimetrije, smo pred izračunom indeksov FA skušali ugotoviti tudi morebiten moteč vpliv DA in AS.

6.2.3 Prisotnost DA in normalnost porazdelitve L-D razlik

Preizkus prisotnosti DA je potrebno opraviti, ker imata tako usmerjena asimetrija kot tudi antisimetrija (AS) genetsko ozadje, medtem ko FA edina odraža delovanje stresnih dejavnikov. Prav tako je potrebno opraviti preizkus normalnosti porazdelitve. Aritmetična sredina mora biti 0 oziroma se od te vrednosti ne sme bistveno razlikovati. Preizkus prisotnosti DA smo opravili s t-testom za odvisne vzorce, in sicer po metodi parov, kjer sta par predstavljali meritvi istega znaka na desni in levi strani (veji) istega rogovja.

Iz preglednice 10 je razvidno, da za noben morfološki znak rogovja srnjakov nismo ugotovili značilnih razlik v razvitosti leve in desne veje, saj so p-vrednosti med 0,177 in 0,794. To pomeni, da moteče prisotnosti usmerjene asimetrije nismo odkrili. V povprečju enakomerna razvitost obeh vej dopušča možnost uporabe vseh morfoloških znakov rogovja srnjakov za analize FA.

Soodvisnost med obema vejama v velikosti nekaterih znakov nam prikazuje slika 11.

V nasprotju s testom značilnosti razlik v razvitosti obeh vej, ki kaže na možnost uporabe vseh preučevanih morfoloških znakov rogovja za korektne analize FA, smo za nekatere znake ugotovili, da se razlike L-D ne porazdeljujejo normalno. Vsi izračuni so prikazani v preglednici 11. Če je $p < 0,05$ (pri W-testu), potem se porazdelitev statistično značilno razlikuje od normalne. Porazdelitve razlik DPP, DZP, PV in SDV se značilno razlikujejo od normalne porazdelitve, porazdelitev DV pa ne.

Značilen odklon od normalnosti porazdelitve (W-vrednost v preglednici 11) še ne pomeni nujno moteče prisotnosti AS. Le-to bolje pokaže odklon od normalnosti v smislu asimetrije in sploščenosti porazdelitve. Asimetričnost porazdelitve (*skewness*) pomeni hkratno prisotnost AS in DA, zato znaki, za katere se g_1 značilno razlikuje od 0, niso primerni za FA analize. Njihova asimetrija ima zelo verjetno genetsko pogojeno ozadje. Poleg tega smo kot pokazatelj uporabili tudi sploščenost – g_2 (*kurtosis*). Negativna vrednost g_2 je znak bimodalne oziroma širokovršne (*plainkurtic*) porazdelitve, medtem ko je pozitivna vrednost g_2 znak ozkovršne (*leptokurtic*) porazdelitve. Prva je zanesljiv pokazatelj prisotnosti AS (večja velikost bodisi leve bodisi desne strani je genetsko določena), zato znaki $g_2 < 0$ niso primerni za analize FA.

Kot lahko vidimo v preglednici 11, smo odklon od normalnosti v smislu asimetrije ugotovili le pri DPP, asimetričnost ostalih L-D razlik ni statistično različna od 0. Ker je vrednost g_1 pri znaku DPP negativna, to nakazuje več razpršenih vrednosti na levem repu porazdelitve (porazdelitev je asimetrična v levo). Pri ostalih znakih se odklon od normalne porazdelitve pojavi zgolj zaradi njihove ozkovršnosti.

Po statistični obdelavi smo v nadaljnjo analizo vzeli naslednje znake: DV, DZP, PV in SDV. Edini znak, ki je izpadel kot neprimeren, je DPP, ki je asimetričen. Smo pa ugotovili, da je pri razlikah levega in desnega DPP ena vrednost - 4,5 (ostale so med 0 in +/- 2,8). Ta vrednost tudi »izkrivi« simetričnost porazdelitve DPP. Po izključitvi te vrednosti se tudi asimetričnost tega znaka ni značilno razlikovala od 0. Ne glede na to pa tega znaka vseeno nismo vključili v nadaljnje raziskave.

6.2.4 Odvisnost FA od velikosti znaka

Odvisnost velikosti asimetrije od velikosti znaka lahko močno vpliva na razlago rezultatov, dobljenih z analizami FA. Pri tem lahko nastanejo naslednje vrste napak (Palmer, 1994):

- če je velikost asimetrije odvisna od velikosti znaka znotraj posameznih vzorcev, določeni vzorci pa imajo večji razpon velikosti znaka kot drugi, lahko s primerjavo med vzorci odkrijemo neobstoječe razlike v stopnji FA;
- če je FA odvisna od povprečne velikosti znaka in se le-ta razlikuje med vzorci, so lahko ugotovljene razlike v razvojni stabilnosti posledica variabilnosti v velikosti znaka med vzorci (vzorci z večjo velikostjo znaka bodo imeli večjo FA);
- če je FA odvisna od povprečne velikosti znaka in primerjamo med sabo različne znake, so lahko ugotovljene razlike med znaki artefakt razlik v velikosti znakov.

Problem odvisnosti FA od velikosti znaka lahko rešimo s podajanjem velikosti relativne asimetrije glede na velikost znaka, pri čemer je korekcija dopustna samo v primeru, če dejansko obstaja soodvisnost med velikostjo znaka in velikostjo FA. Podajanje relativne asimetrije v primeru, da le-ta ni odvisna od velikosti znaka, lahko namreč pokaže lažne razlike med vzorci – vzorci z večjo povprečno velikostjo znaka bodo v tem primeru izkazovali manjšo FA. Proučitev odvisnosti asimetrije od velikosti znaka je zato pogoj za izbiro ustreznega indeksa FA (Pokorny in sod., 2004).

Soodvisnost smo dobili z izračunom korelacijskega koeficienta linearne regresije med L-D razliko in velikostjo vsakega posameznega znaka. Ker lahko na soodvisnost med razliko in povprečno velikostjo vpliva manjša vrednost sama po sebi (majhnost ene strani zmanjša aritmetično sredino obeh strani), smo v izračun regresije kot odvisno spremenljivko vzeli absolutno razliko $|L-D|$, kot neodvisno pa večjo vrednost ustreznega znaka (zbrano v Pokorny, 2003).

6.2.5 Spreminjanje FA rogovja srnjakov v obdobju 1975–2005

Z retrospektivno določitvijo časovne variabilnosti FA rogovja srnjakov smo le-to skušali uporabiti kot potencialen bioindikator sprememb v onesnaženosti okolja na Kozjanskem.

Za izračun časovnega spreminjanja FA smo izbrali indeks FA_1 , ki temelji na aritmetičnih sredinah razlik v velikosti znakov. Prednosti tega indeksa so enostavno računanje, lahka razumljivost in neobčutljivost na ekstreme. Njegova pomanjkljivost je občutljivost na prisotnost obeh motečih oblik asimetrije (DA in AS) (Palmer, 1994).

Časovno spreminjanje asimetrije rogovja srnjakov, uplenjenih v zadnjih tridesetih letih na Kozjanskem, je prikazano na slikah 12 in 13. Podatke smo združili v petletna obdobja. V krajšem obdobju analiza sprememb FA ni smiselna, saj izpostavljenost stresu ne povzroči takojšnjih odzivov v populacijah prostoživečih živali.

FA v obdobju 1975–1979 je zaradi majhnega vzorca ($n=10$) zelo nezanesljivo določena.

Upad asimetrije rogovja po letu 1985 lahko kaže na manjšo izpostavljenost osebkov razvojnim motnjam. Na slikah 12 in 13 se dobro vidi kulminacija asimetrije konec osemdesetih in na začetku devetdesetih let ter upad v obdobjih kasneje.

Zaradi intenzivnega širjenja cestnega omrežja in skokovitega naraščanja števila vozil predstavlja onesnaženje zaradi prometa (posledica izgorevanja fosilnih goriv v motorjih z notranjim izgorevanjem in trenja mehanskih delov vozil med sabo oziroma s cestno površino) zelo pomembno komponento celotnega oz. globalnega onesnaženja okolja (Poličnik in sod., 2010). Slovenija pri onesnaževanju zaradi emisij iz prometa ni izjema in se srečuje s podobnimi problemi kot ostali razviti svet. Upošteva je promet kot pomemben razpršen emisijski vir, je (bilo) najbolj problematično anorgansko onesnažilo svinec; do sredine devetdesetih let prejšnjega stoletja je bil namreč največji vir emisij Pb v okolje prav promet. V osemdesetih in devetdesetih letih prejšnjega stoletja so se emisije zmanjšale zaradi uvedbe neosvinčenega bencina in prepovedi uporabe osvinčenega. To je zelo pomemben podatek in sovпада z našo ugotovitvijo o zmanjšanju asimetrije rogovij v devetdesetih letih.

Velikost FA ni le specifičen, temveč je univerzalen pokazatelj stresnih razmer. Kot navaja Palmer (1996), so povzročitelji povečane asimetrije lahko – (a) notranji dejavniki: hibridizacija, kromosomske aberacije in parjenje znotraj sorodstva; (b) zunanji dejavniki: klimatski ekstremi, pomanjkanje hrane, populacijska gostota, inducirana kompeticija zaradi naseljevanja neavtohtonih vrst, izpostavljenost zajedalcem in onesnaženost okolja. Pokorny

(2003) je v svoji disertaciji prišel do zaključka, da so najpomembnejši stresorji, ki lahko vplivajo na velikost asimetrije rogovja srnjakov v Šaleški dolini, onesnaženost okolja in napadenost s paraziti, potencialno pa tudi velika populacijska gostota. Kar pomeni, da upad asimetrije ni nujno posledica manjše onesnaženosti okolja.

7 ZAKLJUČEK

V zadnjem času so vedno bolj pomembne informacije, povezane z onesnaženostjo okolja. Te informacije lahko dobimo tudi z uporabo bioindikatorskih metod, organizmov in vrst. Srnjad ustreza številnim kriterijem, ki so potrebni, da lahko vrsto uporabimo v bioindikativne namene.

Za oceno stanja okolja in za pridobitev potrebnih informacij o velikosti in trendih onesnaženosti okolja na Kozjanskem smo v nalogo vključili dva tipa vzorcev. Pri ledvicah srnjadi smo uporabili princip akumulacijske bioindikacije, z rogovjem srnjadi pa smo raziskali spreminjanje nihajoče asimetrije (reakcijska bioindikacija) skozi daljše časovno obdobje.

Po primerjavi med rezultati s Kozjanskega in iz Šaleške doline smo ugotovili, da niso vsebnosti nobene izmed preučevanih kovin tako velike, da bi ogrožale vitalnost oziroma dolgoživost populacij. Najbolj problematičen je Cd, ki je v dveh vzorcih ledvic mladičev na Kozjanskem dosegel nepričakovano velike vrednosti.

Potrdili smo hipotezo, da se s starostjo v ledvicah srnjadi kopiči Cd, kar pa nismo ugotovili za ostale tri preučevane elemente (Pb, Hg, As).

Rogovje srnjadi je zaradi svoje morfologije, velike sposobnosti kopičenja anorganskih onesnažil, vsakoletne intenzivne rasti v točno določenem obdobju leta (naravna standardizacija metode) in trofejne vrednosti (dostopnost vzorcev skozi čas) zelo primeren ciljni organ za določitev onesnaženosti okolja oz. ostalih dejavnikov stresa. Uporabili smo reakcijsko bioindikacijo (merjenje nihajoče asimetrije, FA). Pri tem je zelo pomembna možnost uporabe rogovja v retrospektivnih študijah, kjer vidimo spreminjanje velikosti nihajoče asimetrije skozi čas, posledično pa tudi spreminjanje v izpostavljenosti srnjadi kot ciljne vrste različnim dejavnikom okoljskega stresa. Upad asimetrije rogovja po letu 1985 lahko kaže na manjšo izpostavljenost osebkov razvojnim motnjam. Onesnaženje zaradi prometa je zelo pomembna komponenta globalnega onesnaženja, znotraj prometa pa je najbolj problematično onesnažilo svinec. Z zmanjševanjem in odpravljanjem svinčenih

dodatkov v bencinu ter z drugimi ukrepi so se emisije tega elementa v devetdesetih letih močno zmanjšale. Ta ugotovitev sovпада z našo ugotovitvijo o kulminaciji asimetrije konec osemdesetih in na začetku devetdesetih let in kasnejšim upadom.

Za uporabo FA kot pravočasnega indikatorja onesneženosti populacij je predvsem pomembno dejstvo, da se spremembe v razvojni stabilnosti in posledično v velikosti FA pokažejo bistveno pred upadom zdravstvenega stanja osebkov oziroma dolgoživosti populacij. Na velikost FA pa poleg onesnaženosti okolja oziroma okoljskega stresa vplivajo še številni drugi moteči dejavniki, kot so npr. gostota populacije, okuženost z zajedalci, temperaturni ekstremi itd.

8 POVZETEK

Onesnaženost okolja lahko poleg fizikalno-kemijskih merenj določimo tudi s pomočjo bioindikatorjev. To so organizmi, ki s svojimi življenjskimi funkcijami, razširjenostjo, kemično sestavo, fiziološkimi odzivi in morfološko-anatomskimi značilnostmi odražajo razmere v okolju.

Upoštevanje primernost srnjadi za bioindikacijo onesnaženosti okolja smo želeli v nalogi preizkusiti metode akumulacijske in reakcijske bioindikacije. Osnovni nameni so bili:

- kot akumulacijske bioindikatorje uporabiti in preizkusiti ledvice srnjadi – določiti stopnjo onesnaženosti na Kozjanskem in rezultate primerjati z vzorci iz Šaleške doline, poleg tega pa ugotoviti dnevno akumulacijo težkih kovin v ledvicah srnjadi;
- preizkusiti metodo reakcijske bioindikacije (merjenje nihajoče asimetrije rogovja; ang. *fluctuating asymmetry*: FA) in ugotoviti spreminjanje le-te v daljšem časovnem obdobju.

Določili smo vsebnost elementov (Cd, Pb, Hg, As) v ledvicah 14 osebkov srnjadi, uplenjene leta 2005 na Kozjanskem. Meritve nihajoče asimetrije smo opravili na štirih merskih znakih rogovja 163 srnjakov, uplenjenih v obdobju 1975–2005 v istem območju.

Vsebnosti štirih elementov v sledovih (Cd, Pb, Hg, As) na Kozjanskem ne dosežajo vrednosti, ki bi lahko ogrožale vitalnost oziroma dolgoživost populacij. Potencialno najbolj problematičen je Cd, čeprav je bila tudi za ta element večina vrednosti v mejah normale. Vendar sta bili konec leta v ledvicah dveh mladičev izmerjeni zelo visoki vrednosti (1,61 mg/kg in 1,70 mg/kg), ki presegata večino poznanih vrednosti, izmerjenih v ledvicah mladičev srnjadi v Sloveniji. Pb z ekosistemskega vidika ni problematičen nikjer po Sloveniji in prav tako tudi na Kozjanskem ne. Vsebnosti Hg so bile daleč pod kritičnimi vrednostmi, vsebnosti As pa zelo majhne in v številnih vzorcih pod mejo določljivosti uporabljene analitske metode.

Vsebnosti kovin v ledvicah mladičev srnjadi s Kozjanskega smo primerjali z rezultati iz Šaleške doline. Vsebnosti Pb, Hg in As so bile v Šaleški dolini večje kot na Kozjanskem. Presenetljivi so rezultati merjenja vsebnosti Cd. Povprečne vrednosti Cd v ledvicah mladičev srnjadi se ne razlikujejo med Kozjanskim in Šaleško dolino, pri čemer so na Kozjanskem

največje izmerjene vrednosti celo večje kot v Šaleški dolini in so v dveh vzorcih presegale dopustne vsebnosti. Za Cd je značilno, da se prenaša na velike razdalje, zato je lahko izpostavljenost živali povečana tudi daleč od industrijskih središč. Cd se vnaša v ekosistem tudi preko mineralnih gnojil in morda je prav kmetijstvo vzrok večjih vsebnosti Cd.

Z izračunom korelacijskih koeficientov smo potrdili tudi hipotezo, da se s starostjo v ledvicah srnjadi znatno kopiči Cd, kar pa ne velja za ostale tri preučevane elemente.

Onesnaženost okolja je eden od poglavitnih dejavnikov stresa, ki vpliva na odklon od idealne simetrije rogovja srnjakov. Na velikost nihajoče asimetrije, ki je univerzalen bioindikator stresa, pa lahko vplivajo tudi številni drugi moteči dejavniki. Pri meritvah nihajoče asimetrije rogovja srnjakov smo najprej določili znake rogovja, ki ustrezajo statističnim zahtevam, potrebnim za korektne analize FA. Edini znak, ki ni prestal statističnega testiranja in smo ga izvzeli iz nadaljnjih analiz, je bila dolžina prednjega parožka (DPP). V retrospektivni študiji smo ugotovili spreminjanje nihajoče asimetrije v obdobju 1975–2005 z viškom konec osemdesetih in na začetku devetdesetih let in kasnejšim upadom. Ta ugotovitev sovпада z obdobjem uvedbe neosvinčenega in s prepovedjo uporabe osvinčenega bencina, ki je bil pomemben vir emisij v okolje.

9 VIRI

Adamič M. 1990. Prehranske značilnosti kot element načrtovanja, varstva, gojitve in lova parkljaste divjadi s poudarkom na jelenjadi (*Cervus elaphus* L.). Strokovna in znanstvena dela, 105. Ljubljana, IGLG: 203 str.

Air pollution and vegetation. 2010. V: ICP Vegetation: Annual report 2009/2010. Centre for ecology & hydrology: 2–3

Al Sayegh Petkovšek S., Pokorny B., Ribarič Lasnik C., Vrtačnik J. 2002. Vsebnost Cd, Pb, Hg in As v trosnjakih gliv iz gozdnate krajine Šaleške doline. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 67: 5–46

Aničić B. 1984. Geološka zgradba ozemlja občine Šmarje pri Jelšah. V: Med Bočem in Bohorjem. Rogaška Slatina, Delavska univerza Rogaška Slatina: 46–55

Bartoš L., Bahbouch R. 2006. Antler size and fluctuating asymmetry in red deer (*Cervus elaphus*) stags and probability of becoming of harem holder in rut. Biological journal of the linnean society, 87: 59–68

Batič F. 1994. Bioindikacija onesnaženosti zraka in njen pomen pri vzpostavitvi integralnega monitoringa. V: Varstvo zraka – stanje in ukrepi za izboljšanje stanja v Sloveniji. Batič F. (ur.). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 12/11–2/10.

Batič F. 1997. Bioindikacija in stresna fiziologija – princip pri ekosistemskih raziskavah gozdnih ekosistemov. V: Znanje za gozd: zbornik ob 50. obletnici Gozdarskega inštituta Slovenije. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 93–102

EC Commission Regulation no. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs

Erico – komunikacija med naravo, družbo in sodobno tehnologijo (18. 1. 2011)

<http://www.erico.si/biomonitoring> (18. 1. 2011)

Garcia M .H., Moreno D .H., Rodriguez F .S., Beceiro A .L., Alvarez L .E., Lopez M .P. 2010. Sex- and age-dependent accumulation of heavy metals (Cd, Pb and Zn) in liver, kidney and muscle of roe deer (*Capreolus capreolus*) from NW Spain. Journal of environmental science and health, Part A, 46, 2: 109-116

Gnamuš A. 2002. Živo srebro v kopenski prehranski verigi – Indikatorski organizmi, privzem in kopičenje. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan

Hafner M. 2004. Ali asimetrija dolžine roglov gamsa (*Rupicapra rupicapra* L.) odraža kvaliteto in starost živali. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 73: 5–29

Istenič B. 2005. Sprejem cinka iz onesnaženih tal MO Celje v izbrane rastline: diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. Ljubljana, samozal.: 45 str.

Kierdorf U., Kierdorf H. 2005. Antlers as biomonitors of environmental pollution by lead and fluoride: a review. European journal of wildlife resources, 51: 137–150

Kolar B. 1999. Ekologija živali in varstvo okolja divjadi. Ljubljana, Lovska zveza Slovenije, 225 str.

Kononenko L. 2009. Predlog in cilji okoljskega biomonitoringa kemikalij. V: Delavnica »Predstavitev predlogov za program okoljskega biomonitoringa. Ljubljana, 10. april 2009. Gozdarski inštitut Slovenije: 17 str.

Kotar M. 1977. Statistične metode: izbrana poglavja za študij gozdarstva (1. in 2. zvezek). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 378 str.

Kozjanski regijski park – zavarovano območje kot razvojna priložnost. 2009. Delavnica »Narava in vode«

<http://www.rralur-prostor.uirs.si/.../2.Predstavitev%20Kozjanskega%20regijskega%20parka.pdf>
(23. 1. 2011)

Kozjansko. 2006. EACS

<http://eacs.uni-aas.si/slovenia/?kraj=kozjansko> (14. 5. 2010)

Krže B. 2000. Srnjad: biologija, gojitev, ekologija. Ljubljana, Lovska zveza Slovenije: 271 str.

Letni načrt za IX. Savinjsko-Kozjansko lovsko-upravljalno območje za leto 2009. 2009. Zavod za gozdove Slovenije

http://www.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/GOZD/jul9/Letni_nacrt_za_IX._Savinjsko_-_Kozjansko_LUO_za_leto_2009.pdf (10. 5. 2010)

Leung B., Forbes M. 1966. Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: effects of trait type as revealed by meta-analyses. *Ecoscience*, 3: 400–413

Linnell J. D. C., Andersen R. 1998. Timing and synchrony of birth in a hider species, the roe deer *Capreolus capreolus*. *Journal of zoology*, 244, 4: 497–504

Măcinic I., Trif A., Muselin F. 2009. Roe deer (*Capreolus capreolus*) as bioindicator for cadmium pollution. *Lucrări științifice medicină veterinară*, 42,2

Møller A. P. 1990. Fluctuating asymmetry in male sexual ornaments may reliably reveal male quality. *Animal behaviour*, 40: 1185–1187

Mysterud A. 1999. Seasonal migration pattern and home range of roe deer (*Capreolus capreolus*) in altitudinal gradient in southern Norway. *Journal of zoology*, 247: 479–486

Palmer A. 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. V: Developmental instability: its origin and evolutionary implications. Markow, T. A. (ur.), Dordrecht, Kluwert Academic Pub.: 335–364

Palmer A. 1996. Waltzing with asymmetry: is fluctuating asymmetry a powerful new tool for biologists or just an alluring new step? *Bioscience*, 46: 518–532

Palmer A., Strobeck C. 1986. Fluctuating asymmetry: Measurement, Analysis, Patterns. Annual Reviews of Ecology and Systematics, 17: 391–421

Pelabon C., Van Breukelen L. 1998. Asymmetry in antler size in roe deer (*Capreolus capreolus*): an index of individual and population conditions. Oecologia, 116: 1–8

Pokorny B. 2003. Notranji organi in rogovje srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) kot bioindikatorji onesnaženosti okolja z ioni težkih kovin: doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire. Ljubljana, samozal.: 193 str.

Pokorny B. 2006. Retrospektivni biomonitoring onesnaženosti ekosistemov Šaleške doline s svincem in fluoridi z uporabo rogovja srnjakov. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 80: 65–80

Pokorny B. 2006. Roe deer (*Capreolus capreolus* L.) antlers as an accumulative and reactive bioindicator of lead pollution near the largest Slovene thermal power plant. Veterinarski arhiv, 76: 131–142

Pokorny B. 2010. Bioindikacija onesnaženosti okolja s fluoridi z uporabo čeljusti srnjadi (*Capreolus capreolus* L.): stanje in perspektive. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 92: 3–20

Pokorny B., Adamič M., Ribarič Lasnik C. 2004. Nihajoča asimetrija (s poudarkom na asimetriji rogovja Cervidov) kot zgodnji kazalec stresa: principi, dosedanja dognanja in možnosti uporabe. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 73: 137–159

Pokorny B., Al Sayegh Petkovšek S., Ribarič Lasnik C., Vrtačnik J., Doganoc D. Z., Adamič M. 2004. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. Science of total Environment, 324: 223–234

Pokorny B., Glinšek A., Ribarič Lasnik C. 2004. Roe deer antlers as a historical bioindicator of lead pollution in the Šalek valley, Slovenia. Journal of atmospheric chemistry, 49: 175–189

Pokorny B., Jelenko I., Kiedorf U., Kiedorf H. 2009. Roe deer antlers as a historical bioindicators of lead pollution in the vicinity of a lead smelter, Slovenia. *Water, air, & soil pollution*, 203, 1/4: 3173–24

Pokorny B., Jelenko I., Poličnik H. 2009. Biomonitoring z vretenčarji – s poudarkom na srnjadi – v kopenskih ekosistemih Slovenije. V: Delavnica »predstavitev predlogov za program okoljskega biomonitoringa: Ljubljana, 10. april 2009. Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije: 17 str.

Pokorny B., Ribarič Lasnik C. 2002. Seasonal variability of mercury and heavy metals in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) kidney. *Environmental Pollution*, 117: 35–46

Poličnik H., Papler U., Pokorny B. 2010. Uporaba epifitskih lišajev kot bioindikatorskih organizmov za ugotavljanje onesnaženosti zraka ob izbranih državnih cestah v Sloveniji. V: 10. slovenski kongres o cestah in prometu, Portorož, 20.–22. oktober 2010 Ljubljana, DRC – Družba za raziskave v cestni in prometni stroki Slovenije: 1023–1035

Pompe-Gotal J., Prevendar Crnić A. 2002. Cadmium in tissues of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Croatia. *Veterinarski arhiv*, 72, 6: 303–310

Pravilnik o količinah pesticidov in drugih strupenih snovi, hormonov, antibiotikov in mikotoksinov, ki smejo biti v živilih. 1983. Ur. l. SFRJ, št 59/83: 1634–1651

Pravilnik o onesnaževalcih v živilih. 2003. Ur. l. RS, št 69/03

Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o količinah pesticidov in drugih strupenih snovi, hormonov, antibiotikov in mikotoksinov ki smejo biti v živilih. 1983. Ur. l. SFRJ, št 79/87

Raganella-Pellicioni E., Scremin M., Toso S. 2007. Phenology and synchrony of roe deer breeding in northern Italy. *Acta Theriologica* 52, 1: 95–100

Regionalna zasnova prostorskega razvoja Savinjske regije – 1. faza. 2006. Ljubljana, Urbanistični inštitut RS

<http://rzpr-savinjska.uirs.si/index1.htm> (10. 8. 2010)

Romih N., Grabner B., Ribarič Lasnik C. 2010. Remediacija tal s težkimi kovinami. Celje, Inštitut za okolje in prostor

Ross M.S. 1994. Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. V: Toxic metals in soil-plant systems. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons: 3–25

Rossi I., Lamberti P., Mauri L., Apollonio M. 2003. Home range dynamics of male roe deer *Capreolus capreolus* in a mountainous habitat. Acta Theriologica, 48, 3: 425–432

Sajovic A. 2005. Pomen regijskega parka za sonaraven razvoj Kozjanskega: diplomsko delo. Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo. Ljubljana, samozal.: 84 str.

Simonič A. 1976. Srnjad – biologija in gospodarjenje. Zlatoroga knjižnica. Ljubljana, Lovska zveza Slovenije: 606 str.

Swaddle J. P. 2003. Fluctuating asymmetry, animal behavior, and evolution. Advances in the study of behavior, 32

Swaddle J. P., Witter M. S., Cuthill I. C. 1994. The analyses of fluctuating asymmetry. Animal Behavior, 48: 986–989

Tixier H., Duncan P., Scehovic J., Yant A., Gleizes M., Lila M. 1997. Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): Effects of plant chemistry and consequences for the nutritional value of their diets. Journal of zoology, 242, 2: 229–245

Tompkins J. L., Kotiaho J. S. 2001. Fluctuating asymmetry. V: Encyclopedia of life sciences. London, Nature Publishing group

Tretja razvojna os za razvoj Kozjanskega? 2008.

http://www.ednevniki.si/entry.php?w=dramlje&e_id=73397-karta_kozjanskega (12. 3. 2010)

Žagar M. 1967. Kozjansko - gospodarsko - geografska problematika. Geografski zbornik, 10: 17–155

Živalski svet. 2005. Ljubljana, Zavod za gozdove Slovenije

<http://www.zgs.gov.si/slo/obmocne-enote/postojna/zivalski-svet/index.html> (20. 6. 2010)

ZAHVALA

Za nastanek diplomske naloge se moram v prvi vrsti zahvaliti somentorju doc. dr. Boštjanu Pokornemu za vse nasvete in konstruktivne pripombe pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala mentorju doc. dr. Klemnu Jerini za mentorstvo, hiter pregled diplome in koristne nasvete.

Prof. dr. Francu Batiču se zahvaljujem za res hitro in strokovno recenzijo diplomske naloge in za vse nasvete in strokovne usmeritve pri izdelavi diplomske naloge.

Za kemijske analize gre zahvala inštitutu ERICo Velenje.

Zahvala gre tudi lovcem LD Kozje in LD Podčetrtek. Brez vašega sodelovanja raziskava ne bi bila mogoča.

Zahvaljujem se Evi Biščan za lektoriranje diplome.

Posebej bi se rad zahvalil svojim staršem za zaupanje in materialno podporo.

Cirili, Žarotu in Majdi se zahvaljujem za vse finančne injekcije med samim študijem.

In nenazadnje; hvala tebi Simona, ker brez tvoje vzpodbude in pomoči sedaj tega dela sploh ne bi bilo.