

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Monika PODGORELEC

**AKUMULACIJA KOVIN Pb, Zn in Cd PRI IVI *Salix caprea* NA
ONESNAŽENEM OBMOČJU V ŽERJAVU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**Pb, Zn AND Cd ACCUMULATION IN GOAT WILLOW *Salix caprea*
FROM POLLUTED AREA IN ŽERJAV**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so bile izvedene meritve večine kemijskih lastnosti tal, z izjemo meritev fosfatov in amonijevega oz. nitratnega dušika v tleh, ki so bile opravljene na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Meritve celokupnih koncentracij kovin v tleh in rastlinskih tkivih z XRFS smo izvedli na Inštitutu Jožef Stefan, izluženih koncentracij kovin v tleh z AAS pa na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Alenka Gaberščik Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	doc. dr. Barbara Vilhar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Marjana Regvar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 31.8.2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Monika Podgorelec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 504.054:546.3:582.632(479.4Žerjav)(043.2)=863
KG *Salix caprea*/Pb/Cd/Zn/akumulacija/privzem/fitoremediacija/XRFS
AV PODGORELEC, Monika
SA REGVAR, Marjana (mentor)
KZ SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2007
IN AKUMULACIJA KOVIN Pb, Zn IN Cd PRI IVI *Salix caprea* NA
ONESNAŽENEM OBMOČJU V ŽERJAVU
TD Diplomski naloga (univerzitetni študij)
OP XII, 77 s., 11 tab., 22 sl., 9 pril., 101 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Rod *Salix* naj bi bil uporaben za fitoremediacijo s kovinami obremenjenih območij. Iva *S. caprea* je najpogostejše rastoča lesna vrsta na s Pb, Cd in Zn onesnaženih tleh v Žerjavu. Na osnovi z metodo rentgensko fluorescenčne spektrofotometrije (XRFS) izmerjenih podatkov o celokupnih koncentracijah kovin smo raziskali in primerjali kopičenje kovin Pb, Cd in Zn pri odraslih drevesih *S. caprea*, rastočih na onesnaženem rastišču v Žerjavu (592-10900 mg Pb kg⁻¹ SM (suha masa), 8,5-141 mg Cd kg⁻¹ SM in 125-1840 mg Zn kg⁻¹ SM rizosfernih tal) in na neonesnaženem rastišču na Pokljuki. Pri rastlinah iz Žerjava so bile koncentracije kovin v koreninah (332-10800 mg Pb kg⁻¹ SM, 17,5-220 mg Cd kg⁻¹ SM, 114-793 mg Zn kg⁻¹ SM) značilno ($p < 0,05$) višje kot na Pokljuki za vse kovine, koncentracije v listih (88,8-257 mg Pb kg⁻¹ SM, 120-361 mg Zn kg⁻¹ SM, 19,1-96,8 mg Cd kg⁻¹ SM) pa le v primeru Cd. Strategija privzema za Pb je izključevanje (bioakumlacijski indeks (BAI) = 0,03; translokacijski indeks (TI) = 0,12), za Cd pa neizrazita akumulacija (BAI = 1,10; TI = 0,66). Akumulacija Cd v listih je bila boljša na manj onesnaženih vzorčnih ploskvah. Iva *S. caprea* iz Žerjava se tako kaže potencialno uporabna za fitoekstrakcijo s Cd zmerno onesnaženih območij. Za potrditev tega dejstva pa so v nadaljevanju potrebne še študije letne prizvodnje biomase listov. Zaradi globljega in razvejanega koreninskega sistema ter učinkovitega izključevanja Pb pa se *S. caprea* lahko uporabi za fitostabilizacijo s Pb močno obremenjenih tal.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 504.054:546.3:582.632(479.4Žerjav)(043.2)=863
CX *Salix caprea*/Pb/Cd/Zn/accumulation/uptake/phytoremediation/XRFS
AU PODGORELEC, Monika
AA REGVAR, Marjana (supervisor)
PP SLO, 1000 Ljubljana, Vecna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2007
TI Pb, Zn and Cd ACCUMULATION IN GOAT WILLOW *Salix caprea* FROM POLLUTED AREA IN ŽERJAV
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 77 p., 11 tab., 22 fig., 9 ann., 101 ref.
LA sl
AL sl/en

AI Genus *Salix* is reported to be used for phytoremediation of heavy metal polluted areas. Goat willow *S. caprea* is most abundant woody species in Žerjav where the soils are highly polluted with metals like Pb, Cd and Zn. We investigated and compared accumulation of Pb, Cd and Zn in mature trees *S. caprea* from polluted site from Žerjav (592-10900 mg Pb kg⁻¹ SM (dry weight), 8,5-141 mg Cd kg⁻¹ SM in 125-1840 mg Zn kg⁻¹ SM rizosphere soils) and unpolluted site from Pokljuka. Total soil and plant concentration of heavy metals were measured with X-ray fluorescence spectrometry (XRFS). Metal concentration in plant roots from Žerjav were (332-10800 mg Pb kg⁻¹ SM, 17,5-220 mg Cd kg⁻¹ SM, 114-793 mg Zn kg⁻¹ SM) were significantly differed ($p < 0,05$) from concentration in roots from Pokljuka for all three kinds of metals, while for metal concentration in leaves (88,8-257 mg Pb kg⁻¹ SM, 120-361 mg Zn kg⁻¹ SM, 19,1-96,8 mg Cd kg⁻¹ SM) this was true only for Cd. Uptake strategy for Pb is exclusion [bioaccumulation index (BAI) = 0,03; translocation index (TI) = 0,12] and moderate accumulation for Cd (BAI = 1,10; TI = 0,66). Accumulation of Cd in leaves was more effective in less polluted sampling plots from Žerjav. *S. caprea* from Žerjav shows promising potential in phytoextraction of Cd on moderate polluted areas but in the future there is still necessary to study annual biomass leaves production to confirm this. Dense root system, penetrating deep into the soil and effective exclusion of Pb from aboveground tissue make *S. caprea* applicable for phytostabilization on highly polluted soils.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO TABEL	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ONESNAŽENO OBMOČJE ŽERJAV	2
2.2 RASTLINE NA TLEH S POVIŠANO KONCENTRACIJO KOVIN	3
2.2.1 Rod <i>Salix</i>	4
2.3 KOVINE Pb, Cd in Zn V TLEH	5
2.4 POMEN Pb, Cd IN Zn ZA RASTLINO, NJIHOVA STRUPENOST TER BIODOSTOPNOST	6
2.5 PRIVZEM KOVIN Pb, Cd IN Zn V RASTLINO IN NANJ VEZANI MOŽNI NAČINI DETOKSIFIKACIJE.....	8
2.5.1 Privzem preko korenin.....	8
2.5.1.1 Vpliv talnih in na rastlino vezanih dejavnikov na privzem kovin.....	8
2.5.2 Privzem preko listov.....	10
2.6 TRANSPORT KOVIN PO RASTLINI IN NANJ VEZANI MOŽNI NAČINI DETOKSIFIKACIJE.....	10
2.7 KOPIČENJE KOVIN V RASTLINSKIH ORGANIH	11
2.8 STRATEGIJE PREŽIVETJA RASTLIN NA RASTIŠČIH S POVIŠANO VSEBNOSTJO KOVIN	13
2.9 VPLIV POVIŠANIH KONCENTRACIJ KOVIN V TLEH NA KONCENTRACIJE NEKATERIH NUTRIENTOV V RASTLINI.....	14
2.10 UPORABNA VREDNOST RODU <i>Salix</i> PRI FITOREMEDIACIJI	15
3 HIPOTEZE IN CILJI	17
4 MATERIAL IN METODE	19
4.1 MATERIAL.....	19
4.2 RASTLINA: Iva <i>Salix caprea</i> L.....	19
4.3 VZORČENJE	20
4.3.1 Vzorčne ploskve	20
4.3.2 Vzorčenje tal in rastlinskega materiala	24

4.4	ANALIZE TALNIH VZORCEV	25
4.4.1	Določanje pH.....	25
4.4.2	Določanje celokupne organske snovi	25
4.4.3	Določanje vsebnosti amonijevega (NH ₄ -N) in nitratnega dušika (NO ₃ -N)	26
4.4.4	Določanje rastlinam dostopnega fosfata (PO ₄ -P) v tleh.....	26
4.4.4.1	Priprava steklovine in reagentov.....	27
4.4.4.2	Postopek ekstrakcije in analize fosfata.....	28
4.4.5	Določanje celokupnih koncentracij kovin v talnih vzorcih	29
4.4.5.1	Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRFS) – osnova tehnike	30
4.4.5.2	Priprava tablet za metodo XRFS	31
4.4.5.3	Opis meritve.....	32
4.4.5.4	Analiza spektra in kvantitativna analiza	33
4.4.6	Ocenjevanje izmenljivih frakcij kovin z FAAS	34
4.5	ANALIZE RASTLINSKIH VZORCEV	35
4.5.1	Določanje celokupnih koncentracij kovin v rastlinskih organih z XRFS	35
4.6	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	35
5	REZULTATI.....	36
5.1	ANALIZE TAL	36
5.1.1	Celokupne in z amonijevim acetatom ter vodo ekstrahirane koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v tleh	36
5.1.2	Vpliv nekaterih kemijskih lastnosti tal na privzem kovin v rastlino	39
5.2	ANALIZE RASTLINSKIH ORGANOV	41
5.2.1	Koncentracije kovin v rastlinskih organih vrste <i>Salix caprea</i>	41
5.2.2	Strategije privzema kovin v rastlinske organe	43
5.2.3	Ovrednotenje uspešnosti ekstrakcijskega sredstva amonijevega acetata za oceno biodostopnosti kovin v tleh	46
5.2.4	Porazdeljevanje kovin in sposobnost kopičenja kovin v rastlinskih organih vrste <i>Salix caprea</i>	47
5.2.4.1	Bioakumulacijski indeks (BAI)	47
5.2.4.2	Translokacijski indeks (TI)	53
5.3	VPLIV KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL NA USPEŠNOST PRIVZEMA KOVIN V RASTLINO.....	54
5.4	VPLIV ONESNAŽENJA TAL S KOVINAMI Pb, Cd IN Zn NA KONCENTRACIJE NUTRIENTOV Ca , K in Fe V RASTLINI	55
6	RAZPRAVA.....	57
6.1	ANALIZE TAL	57
6.1.1	Vpliv nekaterih kemijskih lastnosti tal na privzem kovin v rastlino.....	58
6.2	ANALIZE RASTLINSKIH ORGANOV	59
6.2.1	Koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v rastlinskih organih vrste <i>S. caprea</i> ..	59

6.2.2 Strategije privzema, transport, porazdeljevanje in kopičenje kovin Pb, Cd in Zn pri vrsti iva <i>S. caprea</i>.....	60
6.2.2.1 <i>Svinec</i>	61
6.2.2.2 <i>Kadmij</i>	62
6.2.2.3 <i>Cink</i>	64
6.3 OVREDNOTENJE USPEŠNOSTI EKSTRAKCIJSKEGA SREDSTVA ZA OCENO BIODOSTOPNOSTI KOVIN V TLEH	65
6.4 VPLIV ONESNAŽENJA TAL S KOVINAMI Pb, Cd IN Zn NA KONCENTRACIJE NUTRIENTOV Ca, K in Fe V RASTLINI	65
6.5 UPORABNOST IVE <i>S. caprea</i> PRI FITOREMEDIACIJI.....	66
7 SKLEPI	68
8 POVZETEK.....	70
9 VIRI	72
ZAHVALA	79

KAZALO TABEL

Tabela 1: »Normalne« koncentracije kovin Pb, Cd in Zn izmerjene običajno v poganjkih rastlin in mejne koncentracije za hiperakumulacijo v poganjkih.....	12
Tabela 2: Priprava reagentov za določanje fosfatov v tleh.....	28
Tabela 3: Primerjava razponov izmerjenih koncentracij kovin v rizosfernih tleh ive <i>S. caprea</i> z onesnaženega območja v Žerjavu in neonesnaženega območja na Pokljuki z mejnimi, opozorilnimi in kritičnimi imisijskimi vrednostmi za kovine Pb, Cd in Zn podane v Ur. l. RS 68/96 in vrednostmi za neonesnažena tla po svetu.....	36
Tabela 4: Razponi z vodo in amonijevim acetatom izluženih koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive <i>S. caprea</i> z onesnaženega območja v Žerjavu in z neonesnaženega območja na Pokljuki, izraženi v odstotkih ustrezajoče celokupne koncentracije kovine.....	38
Tabela 5: Rezultati regresijskih analiz za odnos med celokupno in z amonijevim acetatom oz. z vodo izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive <i>S. caprea</i>	39
Tabela 6: Korelacije med kemijskimi lastnostmi tal in celokupno ter z amonijevim acetatom izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive <i>S. caprea</i>	40
Tabela 7: Razponi z XRF določenih koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v koreninah oz. listih ive <i>S. caprea</i> z onesnaženega območja v Žerjavu in z neonesnaženega območja na Pokljuki.....	42
Tabela 8: Mediane, minimalne in maksimalne vrednosti za bioakumulacijske indekse (BAI) kovin Pb, Cd in Zn za ive <i>S. caprea</i> z onesnaženega rastišča v Žerjavu in neonesnaženega rastišča na Pokljuki.....	48
Tabela 9: Mediane, minimalne in maksimalne vrednosti za translokacijski indeks (TI) kovin Pb, Cd in Zn za ive <i>S. caprea</i> z onesnaženega rastišča v Žerjavu in neonesnaženega rastišča na Pokljuki.....	53
Tabela 10: Korelacije med kemijskimi lastnostmi tal in koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v koreninah in listih ive <i>S. caprea</i>	55
Tabela 11: Korelacije med celokupno in z amonijevim acetatom izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh, koncentracijo teh kovin v koreninah, listih ive in koncentracijami nutrientov Ca, K in Fe v koreninah, listih <i>S. caprea</i>	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Žerjav nekoč.....	2
Slika 2: ... in danes.....	2
Slika 3: Pojavne oblike kovine v tleh.....	7
Slika 4: Rastline z različnimi sposobnostmi za kopičenje kovin po Bakerju (1981).....	14
Slika 5: Pregledna shema vzorčenja in uporabljenih analiz v naših raziskavah rastline ive <i>S. caprea</i>	19
Slika 6: Modelna rastlina iva <i>Salix caprea</i> na onesnaženem območju v Žerjavu	20
Slika 7: Vzorčne ploskve (P1-P4) nabiranja vzorcev rizosferne zemlje in rastlinskih vzorcev ive <i>S. caprea</i> v Žerjavu (Koroška), onesnaženem s Pb, Cd in Zn.	22
Slika 8: Vzorčna ploskev P1 in vzorčna ploskev P3 na onesnaženem območju v Žerjavu.....	22
Slika 9: Vzorčni ploskvi (P5, P6) nabiranja vzorcev rizosferne zemlje in rastlinskih vzorcev ive <i>S. caprea</i> na neonesnaženem območju na Pokljuki (Julijske Alpe).....	23
Slika 10: Ploskev P6 na neonesnaženem območju na Pokljuki spomladi in jeseni.....	24
Slika 11: Primer rentgensko fluorescenčnega spektra, merjenega na vzorcu zemlje pri vzbujanju z radioaktivnim izvorom ¹⁰⁹ Cd.....	31
Slika 12: Mehanični mlin za mletje vzorcev in hidravlična stiskalnica za pripravo tablet.....	32
Slika 13: Prikaz meritve z XRFS in princip XRFS.....	33
Slika 14: Celokupna in z amonijevim acetatom ter z vodo izlužena koncentracija kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive <i>S. caprea</i> na vzorčnih ploskvah P1-P6.....	37
Slika 15: Razponi z XRFS določenih koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v koreninah oz. listih ive <i>S. caprea</i> nabranih na vzorčnih ploskvah P1-P6.....	41
Slika 16: Odnos med koncentracijo Pb, Cd, Zn v rastlinskem organu (koreninah, listih) ive in celokupno koncentracijo Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh	43-44
Slika 17: Odnos med koncentracijo Pb, Cd, Zn v rastlinskem organu (koreninah, listih) ive in koncentracijo Pb, Cd in Zn, izluženo z amonijevim acetatom.....	45

- Slika 18: Primerjava regresijskih premic za odnos med logritmiranimi vrednostmi koncentracije kovine v tleh in koncentracijo kovine v rastlinskem organu s hipotetično premico privzema kovine v rastlino.....46-47
- Slika 19: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Pb v tleh oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Pb v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH₄Ac frakcije (BAI-NH₄AC) in z NH₄Ac izluženo koncentracijo Pb v tleh.....49
- Slika 20: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Cd v tleh oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Cd v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH₄Ac frakcije (BAI-NH₄AC) in z NH₄Ac izluženo koncentracijo Cd v tleh.....50
- Slika 21: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Zn v tleh oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Zn v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH₄Ac frakcije (BAI-NH₄AC) in z NH₄Ac izluženo koncentracijo Zn v tleh.....51-52
- Slika 22: Odnos med logaritmirano vrednostjo translokacijskega indeksa (TI) in celokupno koncentracijo kovine (Pb, Cd, Zn) v tleh.....54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BAI	bioakumulacijski indeks (izračunan na osnovi celokupne koncentracije kovin v tleh)
BAI-NH ₄ Ac	bioakumulacijski indeks (izračunan na osnovi z NH ₄ Ac izlužene koncentracije kovin v tleh)
C ₆ H ₈ O ₆	askorbinska kislina
Ca	kalcij
CaCO ₃	kalcijev karbonat
Cd	kadmij
CEC	Cation Exchange Capacity – kationska izmenjevalna kapaciteta
ddH ₂ O	bidestilirna voda
DTPA	dietilen-triamin-pentaacetat
EDTA	etilen-diamin-tetraocetna kislina
FAAS	Flame Absorption Atomic Spectrometry - plamenska absorpcijska atomska spektrometrija
Fe	železo
H ₂ SO ₄	žveplova kislina
HCl	klorovodikova kislina
HCO ₃ ⁻	hidrogenkarbonat
K	kalij
K(SbO) x C ₄ H ₄ O ₆ x 1/2H ₂ O	antimon kalijev tartrat
K ₂ Cr ₂ O ₇	kalijev dikromat
KCl	kalijev klorid
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogen fosfat
min	minimalna vrednost
max	maksimalna vrednost
NaHCO ₃	natrijev hidrogenkarbonat
NaOH	natrijev hidroksid
NH ₄ Ac	amonijev acetat
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	amonijev molibdat
NH ₄ -N	amonijev dušik
NH ₄ -NO ₃	amonijev nitrat
NO ₃ -N	nitratni dušik
PO ₄ -P	dostopni fosfat
Pb	svinec

rpm	rotation per minutes – tresljajev na minuto
SM	suha masa
T	temperatura
XRFS	X-Ray Fluorescence Spectrometry – rentgenska fluorescenčna spektrometrija
Zn	cink

1 UVOD

Rudarske in talilniške dejavnosti puščajo za sabo onesnažen zrak, vodna telesa in tla brez vegetacije. Tako posredno vplivajo na erozijo tal in zmanjšujejo biodiverzitetu organizmov. Obnovitev rastlinske odeje na takih območjih je velikega pomena. Ta namreč preprečuje širjenje kovin z vetrom in njihovo spiranje v podtalnico (vegetacijski filtri, fitostabilizacija) ali celo pomaga pri čiščenju s kovinami obremenjenih tal (fitoremediacija). Revegetacija je v primeru uporabe na dane razmere neprilagojenih rastlin zaradi strupenosti povišanih koncentracij kovin v tleh lahko problematična. Pravilen izbor rastlin je torej zelo pomemben.

V Mežiški dolini v Žerjavu, ki ga je več kot stoletje s kovinami, predvsem Pb, Cd in Zn, onesnaževala talilnica in predelovalnica svinca, v zadnjih dveh desetletjih zaradi prenehanja predelave svinca iz primarnih surovin in ekoloških sanacijskih ukrepov prihaja do naravne sekundarne sukcesije. Najbolj degradirane dele naseljujejo predvsem na kovine prilagojene zelnate rastline, pojavljajo pa se tudi pionirske lesne vrste npr. *Salix caprea* in *Salix appendiculata* (Regvar in sod., 2006; Vidic in sod., 2006). V literaturi se omenja, da so nekatere vrste rodu *Salix* tolerantne do visokih koncentracij kovin v tleh in da lahko kovine dobro privzemajo v svoja tkiva (Landberger in Greger, 1996; Unterbrunner in sod., 2007). Tu se kaže potencialna uporabnost ive *S. caprea* za pospeševanje sekundarne sukcesije in naravnega čiščenja tal, onesnaženih s kovinami (Kuzovkina in Quigley, 2005). Iz tega razloga smo se odločili raziskati kapaciteto privzema kovin Pb, Cd in Zn in njihovo porazdeljevanje po ivi *S. caprea*, rastoči na onesnaženem območju v Žerjavu.

Na različno onesnaženih ploskvah v Žerjavu in na neonesnaženih ploskvah na Pokljuki smo nabrali vzorčni material (rizosferna zemlja, listi, korenine). Z rentgensko fluorescenčno spektrometrično (XRFS) analizamo koncentracij kovin v tleh in rastlinah smo s pomočjo bioakumulacijskega in translokacijskega indeksa poskušali proučiti privzem kovin Pb, Cd in Zn v ivo *S. caprea*, njihov transport, porazdeljevanje ter kopičenje v rastlinskih organih. Ker na privzem pomembno vplivajo lastnosti tal, smo poskušali poiskati tudi povezavo med nekaterimi kemijskimi lastnostmi tal (pH, organska snov, dostopni fosfat, dušik) in koncentracijami kovin v tkivih tam rastočih rastlin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽENO OBMOČJE ŽERJAV

Mnogi viri poročajo o močno povišanih koncentracijah kovin v biosferi povsod po svetu (Martinez in Motto, 1999; Memon in sod., 2001; Yanqun in sod., 2004; Archer in Caldwell, 2004; Vashegyi in sod., 2005). V Sloveniji so tla sorazmerno neonesnažena s kovinami, vendar imamo nekaj žarišč (Grčman, 2001), med njimi tudi območje naših raziskav, t.j. s Pb, Zn in Cd obremenjeno območje v Žerjavu (sl. 1 in 2). Tu so se kovine več kot stoletje vezale v tla iz zraka in vode, ki sta »sredstvi transporta« kovin tudi na dolge razdalje, ali pa so se vnašale v tla neposredno iz odlagališč jalovine (Prpić-Majić, 1996).

Talilnica Pb v Žerjavu leži v soteskastem skrajnem JZ delu Zgornje Mežiške doline v Dolini dimnikov, nekoč t.i. Dolini smrti. Dolina je obdana s 750-1000 m visokimi in strmimi pobočji; odprta je le proti S in SZ (Fajmut, 1978). Posledica tega sta oteženo mešanje zraka in temperaturne inverzije (posebej pozimi), kar povzroča dolgotrajno zadrževanje strupenih snovi v okolici topilnice (Prpić-Majić, 1996).



Slika 1: Žerjav nekoč ...



Slika 2: ... in danes (vir foto: History. MPI..., 2007).

V letih 1896-1989 je intenzivno delovanje talilnice in predelovalnice Pb območje močno onesnažilo s prahom (Prpić-Majić, 1996; Kugonič in Kopušar, 2000), ki je vseboval tudi Pb, Zn, Cd, As (Souvent, 1992). Z namestitvijo modernejših filtrov ter s prehodom pridobivanja Pb iz svinčeve rude slabe kakovosti izključno na predelavo odsluženih akumulatorjev in drugih odpadkov z visoko vsebnostjo Pb (l. 1989) jim je uspelo emisije prašnih delcev v okolju zmanjšati iz 1000 ton prahu/leto (l. 1908) na približno 1,6 tone prahu/leto (l. 2001). Okoli 45 % prahu predstavlja Pb (Fugaš in sod., 1984; Prpić-Majić, 1996; Pačnik, 2002).

Sanacijski ukrepi (rekultivacija hald, nadzemno odlagališče metalurških odpadkov) v zadnjem desetletju so močno prispevali k zmanjšanju količine emisij Pb, Cd in Zn. Danes so te predvsem posledica zapraševanja s trajno kontaminiranih površin. Vhodni predelovalni material od prekinitev rudarske dejavnosti ne vsebuje več kovin As, Cd, Zn (Pačnik, 2002). Kljub tem dejstvom pa so tla v Žerjavu še vedno močno onesnažena (Prpić-Majič, 1996; Kugonič, 1999; Vogel-Mikuš in sod., 2005). Dovoljene koncentracije težkih kovin v tleh za Slovenijo obravnava uredba v Ur.l. RS 68/96 (glej Rezultati, tab. 3).

Davek stoletnega onesnaževanja s Pb, Cd, Zn in SO₂ ter slučajnega gozdnega požara na pobočjih v Žerjavu je bilo popolno uničenje prvotno manj odporne združbe bazofilnega borovega gozda z reso (*Fraxino-Pinetum* Martin Bosse) in deloma termofilnega bukovega gozda (*Ostryo-Fagetum* M.Wraber ex Trinajstić) (Druškovič, 1985; Vogel-Mikuš, 2006). V obdobju zmanjšanja emisij je prišlo do naravnega obnavljanja vegetacije (Vidic in sod., 2006). V procesu sekundarne sukcesije (Regvar in sod., 2006; Vidic in sod., 2006) so se najprej pojavile na kovine odporne zelnate travniške rastline in rastline bližnjih skalno gruščnatih rastišč, kasneje so jim na manj onesnaženih območjih sledile posamezne grmovne in drevesne vrste (Vidic in sod., 2006). Na osrednjem grebenu v Žerjavu sta najpogostejši vrsti gola vrba *Salix glabra* in *S. caprea* (Vidic in sod., 2006), kjer je slednja prisotna že od l. 1971 (Druškovič, 1985). Najnovejše raziskave Regvar in sod. (2006) ter Vidic in sod. (2006) kažejo, da pestrost in abundanca rastlinskih vrst naraščata in da sta edini lesni rastlini na najbolj opustošeni ploskvi bili pionirski vrbi *S. caprea* in velikolistna vrba *Salix appendiculata* in sta kot taki najbolj primerni za poznejše faze revegetacije (Regvar in sod., 2006).

2.2 RASTLINE NA TLEH S POVIŠANO KONCENTRACIJO KOVIN

Začetni odziv na antropogeni vnos velikih količin kovin je ponavadi propad rastlin, saj večino rastlin, tudi dreves pri preseženih kritičnih koncentracijah kovin v rizosferi ni sposobno omejiti njihovega privzema v korenine (Kahle, 1993). V relativno kratkem času pa ta območja lahko poselijo na kovine tolerantni ekotipi rastlin (z genotipom, prilagojenim na dane razmere) (Punshon in Dickinson, 1997) ali rastline z ustrezno fenotipsko plastičnostjo (Baker in Proctor, 1990). Med njimi so pogosto pionirske rastline, tudi nekatere vrbe *Salix* spp.

2.2.1 Rod *Salix*

Vrbe *Salix* spp. postajajo v zadnjem desetletju kot cenen material z določenimi fiziološkimi prilagoditvami in ekološko plastičnostjo vedno bolj uporabljane v različnih okoljskih poskusih stabilizacije in obnove uničenih ekosistemov, fitoremediacije, kontrole obrežne in višinske erozije. Poleg vlagoljubnih vrst najdemo med njimi namreč tudi hitro rastoče pionirske rastline zgodnjih sukcesijskih faz, ki naseljujejo nove, s pomočjo človeka nastale odprte površine kot so npr. močno erodirana tla, obcestne površine, stara rudarska in industrijska središča, ... (Alvarez in sod., 2003; Kuzovkina in Quigley, 2005). Uspešno poseljevanje takih ostrih okoljskih razmer (Roselli in sod., 2003) jim omogoča prilagojenost na direktno sončno svetlobo, s hranili revna tla, razvejan koreninski sistem s številnimi tankimi koreninami, množična produkcija semen in mehanizem za uspešno razširjanje teh na dolge razdalje ter odpornost na kemijsko onesnaženost tal. Rod *Salix* naj bi namreč od sedmih najpogostejših kovin onesnaževalcev tal toleriral vsaj štiri (Cd, Cu, Zn, Pb) (Kuzovkina in Quigley, 2005).

Nekaj avtorjev navaja, da lahko rod *Salix* v okolju s povišanimi koncentracijami kovin v tleh celo kopiči visok nivo kovin (Unterbrunner, 2007). Znane so razlike v odpornosti na različne kovine in sposobnosti akumulacije kovin, ki se kažejo med različnimi vrstami in tudi med ekotipi (populacijami) iste vrste (Landberg in Greger, 1996; Unterbrunner, 2007). Landberg in Greger (1996) sta npr. na Švedskem našla ekotip vrbe beke *S. viminalis*, ki lahko akumulira visoke koncentracije Cd in Zn. V literaturi se o dobri akumulacijski sposobnosti kovin, najpogosteje Cd piše tudi za vrste *S. cathayana* (Yanqun in sod., 2004), *S. alba* (Zn) (Vashegyi in sod., 2005), *S. phylicifolia* in *S. borealis* (Stoltz in Greger, 2002), nekaj študij v zvezi z odpornostjo, privzemom in kopičenjem kovin pa je bilo narejenih tudi na ivi *S. caprea* v Nemčiji, na Madžarskem, na Češkem in v Avstriji (Eltrop, 1991; Vashegyi in sod., 2005; Unterbrunnner, 2007).

Odpornost rastlin iz rodu *Salix* na povišane koncentracije kovin v tleh je v svetu dobro dokumentirana, biokemijski mehanizmi in strategije, ki so zaslužne za to pa so šele na začetku raziskav (Dos Santos Utmazian in Wenzel, 2007). Tudi v Sloveniji je poznavanje vrb v primerjavi z zelnatimi rastlinami v zvezi z fitoremediacijo kovin obremenjenih območij slabo raziskana.

2.3 KOVINE Pb, Cd in Zn V TLEH

Kovine svinec (Pb), kadmij (Cd) in cink (Zn) se uvrščajo v t.i. skupino težkih kovin. Gre za skupino kovin, katerih gostota presega 5 g cm^{-3} , relativna atomska masa pa je večja od 40 (Barcelo in Poschenrieder, 1990; Baker in Proctor, 1990; Seregin in Ivanov, 2001). Termin ob presežku neke mejne vrednosti za določeno kovino v tleh povezujemo z onesnaženjem in strupenostjo kovine za žive organizme, čeprav so nekatere od teh kovin (npr. Zn, Cu) za normalno zaključen življenjski cikel rastline v majhni količini nujno potrebne (esencialne) (Adriano, 2001; Taiz in Zeiger, 2002; Seregin in Ivanov, 2001). Ker se težke kovine med seboj kemijsko razlikujejo in imajo različne učinke na rastlino (Baker in Proctor, 1990), je ustreznost uporabe skupnega poimenovanja »težke kovine« vprašljiva.

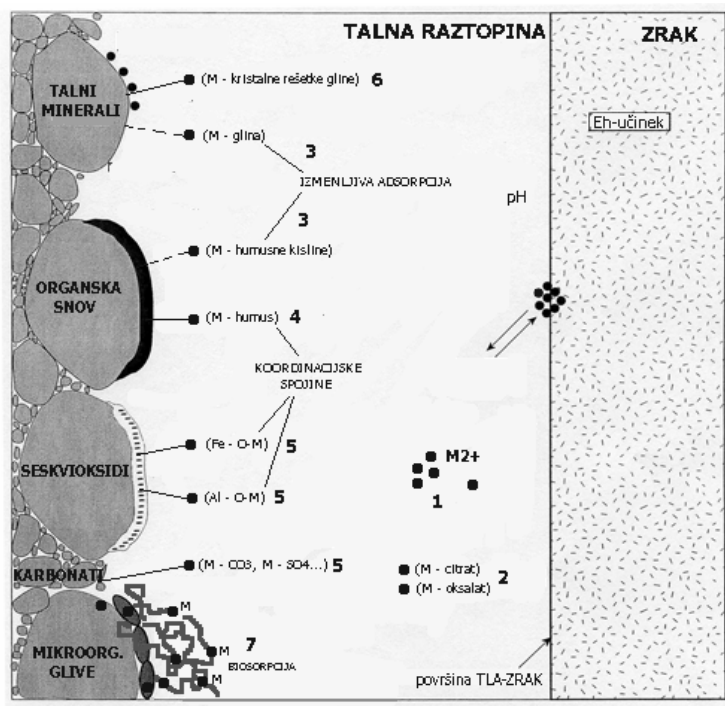
Nekaj Pb, Cd in Zn najdemo v vseh vrstah tal (Baker in Proctor, 1990). Tla so namreč naravna tvorba na površju zemeljske skorje, ki so nastala s preperevanjem kamnine in razgradnjo organske snovi ob sodelovanju živih organizmov. So dinamičen sistem, ki se sestoji iz organskega, humusnega in mineralnega dela. Fizikalne, kemijske (tudi vsebnost kovin) in biotske lastnosti tal pa so poleg podnebja, organizmov, reliefa in časa v prvi vrsti odvisna od matične kamnine, iz katere so tla nastala (Mršić, 1997).

Poleg naravnega pojavljanja kovin v tleh iz matičnih kamnin (koncentracija v zemeljski skorji navadno ne presega 100 mg kg^{-1} (1%) (Alloway, 1990) pa se z industrializacijo in urbanizacijo z različnimi človekovimi dejavnosti v biosfero vnaša vedno več kovin. Najpogostejši antropogeni viri kovin so rudarjenje in metalurgija, različne industrije, avtomobilski izpuhi, deponije odpadkov, uporaba umetnih gnojil in pesticidov v kmetijstvu, odpadne vode in blato iz čistilnih naprav (Farago, 1981; Ross, 1996; Punshon in Dickinson, 1997; Singh in sod., 1997; Jiries in sod., 2000; Robinson in sod., 2000; Adriano, 2001). Onesnaževanje okolja je lahko razpršeno, linijsko ali točkovno (Grčman, 2001) kot v primeru talilnice svinca v Žerjavu, kjer z oddaljenostjo od dimnikov onesnaženost tal s kovinami Pb, Cd in Zn pada (Druškovič, 1981; Regvar in sod., 2006). V vsakem primeru pa gre za povečevanje organizmom dostopnega deleža kovin v tleh, ki je zaradi biološke nerazgradljivosti kovin in posledično njihovega kopičenja vzdolž prehranjevalne verige nevarno.

2.4 POMEN Pb, Cd IN Zn ZA RASTLINO, NJIHOVA STRUPENOST TER BIODOSTOPNOST

Različni kovinski kationi so za rastlino različno (ne)pomembni, v nekaterih primerih pa so lahko celo strupeni. Pb in Cd npr. nista na seznamu rastlinskih makro- ali mikronutrientov (Taiz in Zeiger, 2002) in sta zaenkrat brez znane biološke funkcije v rastlini (Seregin in Ivanov, 2001), Zn pa je v prehrani rastlin v majhnih količinah nujen, saj je sestavni del različnih skupin encimov (dehidrogenaz, proteinaz in fosfohidrolaz) (Adriano, 2001; Larcher, 2003) in sodeluje v številnih pomembnih procesih (stabilizacija citoplazemskih ribosomov in plazemske membrane koreninskih celic, sinteza proteinov in indol očetne kisline (avksin), transformacija ogljikovih hidratov...) (Adriano, 2001). V nekaterih rastlinah je potreben tudi pri biosintezi klorofila (Taiz in Zeiger, 2002). Kljub pomembnosti Zn za normalno rast in razvoj rastline pa je tudi ta, tako kot Pb in Cd, lahko za rastlino strupen. Vendar je znano, da je Cd, čeprav je geokemično podoben Zn, rastlinam strupen že pri dosti nižjih koncentracijah kot Zn in Pb in da je strupenost Pb za rastline v primerjavi z drugimi kovinami relativno nizka (Adriano, 2001). Vzrok za strupenost večine kovin za rastline je pogosto inaktivacija mnogih encimov zaradi velike afinitete kovin za vezavo z SH-skupinami proteinov (Ivanov in sod., 2003).

Obseg privzema kovin v rastlino in posledično njihova strupenost za rastlino pa ni odvisna samo od kemijske vrste kovine in njene celokupne koncentracije v tleh, temveč od njene dostopnosti za rastlino (biodostopnosti) (Leštan, 2002). Biodostopna koncentracija kovin je del celokupne koncentracije kovin, ki se zaradi šibke vezanosti v tleh lahko prenese iz substrata v žive organizme (Leyval in Joner, 2001). Dobro dostopne pojavne oblike kovin so tiste, ki so raztopljene v talni raztopini ali pa so v tleh izmenljivo adsorbirane na površini talnih koloidov (Adriano 2001, Leštan, 2002) in so za rastlino najbolj problematične (sl. 3). Poleg teh dveh pojavnih oblik kovin pa so v tleh tudi na različne talne delce tesno vezane in rastlinam slabo dostopne oblike (Leštan, 2002) (sl. 3). Jakost vezave pozitivno nabitih ionov kovin na negativno nabite koloide in v različne komplekse lahko spremenijo različni dejavniki tal kot so npr. pH, vsebnost organske snovi, prisotnost drugih kationov (Greger, 1999; Leštan, 2002). Če ti dejavniki delujejo v smeri sprostitve jakosti vezave, se delež dostopne koncentracije kovin v tleh poveča.



Slika 3: Pojavne oblike kovine (M) v tleh. Kovine se v talni raztopini nahajajo v obliki prostih ionov (1) in vodotopnih kovinskih kompleksov (2), v tleh pa kot izmenljivi (na adsorpcijska mesta = koloide vezani) ioni (3), organsko (na humus) vezane kovine (4), izoborjeni precipitirani oz. netopni kompleksi (karbonati, sulfati, fosfati, oksidi, hidroksidi) (5), so del silikatnih mineralov (6) ali pa so vključene v biomaso talnih organizmov (μorganizmi, glive), tudi rastlinskih korenin (7) (Leyval in Joner, 2000; Adriano, 2001; Leštan, 2002). (1)-(3) – biološko dostopne oblike kovin, (4)-(7) – biološko nedostopne oblike kovin. (prirejeno po: Soils 101..., 2006 in Leštan, 2002).

Na topnost in mobilnost kovin v tleh pa lahko v skladu s svojimi potrebami vplivajo tudi rastline same (Greger, 1999), torej so same merilo biodostopnih kovin. To je razlog za težavnost merjenja rastlinam dostopnih kovin in za to, da celokupne koncentracije večine kovin v tleh niso dobri pokazatelji biodostopnosti (Adriano, 2001). V znanosti zato za ocenjevanje biodostopnega deleža kovin uporabljajo različna ekstrakcijska sredstva (CaCl_2 , DTPA, EDTA, NH_4Ac , NH_4NO_3) (Qian in sod., 1996; Greger, 1999; Adriano, 2001), s katerimi se hočejo čim bolj približati specifičnim talnim razmeram v raziskovanih tleh. Nobeno od sredstev namreč ni univerzalno (Adriano, 2001) in le redko se izkaže tesna povezava med ekstrahiranimi biodostopnimi koncentracijami kovin in koncentracijami kovin v rastlinskem tkivu (Greger, 1999). Ker se v literaturi večkrat omenja, da naj bi bila z NH_4Ac izlužena koncentracija kovin dobro merilo dostopne frakcije kovin v tleh (Eltrop, 1991; Ernst, 1996; Wenzel in Jockwer, 1999; Vidic in sod., 2006), smo to ekstrakcijsko sredstvo za oceno biodostopnosti kovin uporabili tudi v naših raziskavah.

2.5 PRIVZEM KOVIN Pb, Cd IN Zn V RASTLINO IN NANJ VEZANI MOŽNI NAČINI DETOKSIFIKACIJE

Rastline lahko privzemajo kovine s koreninami iz tal, v območjih z onesnaženim ozračjem pa delno tudi iz zračnih depozitov preko listne površine (kutikula in listne reže) (Ross in Kaye, 1996; Seregin in Ivanov, 2001).

2.5.1 Privzem preko korenin

Korenine privzemajo iz tal vse elemente, tako esencialne nutriende (P, S, Mg, Ca, Fe, Mn, Zn, Cl, Mo...) kot tudi elemente brez znane biološke funkcije (Cd, Pb, Cr, Me, Au, Hg). Kovine se ob stiku s korenino najprej vežejo na karboksilne skupine sluznih izločkov na površini korenin (vezavna sposobnost pada v smeri $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+}$) (Seregin in Ivanov, 2001), po pasivnem vstopu iz talne raztopine v celične stene korenin (Marshner, 1995) pa se del kovin tu veže na negativno nabite poligalakturonske kisline (*imobilizacija, sekvestracija kovin*) (Seregin in Ivanov, 2001). Preostali del kovin pa ali vstopi v celice (simplast) ali pa po apoplastu korenine potuje do endodermisa s Kasparijevimi trakovi (*bariera*). Po vstopu v koreninske celice se kovine lahko vežejo na negativne dele topnih citoplazemskih ali vakuolarnih molekul (organske kisline, npr.citrat, malat, oksalat) in/ali strukturnih sestavin celice (Greger, 1999). Kovinski ioni lahko v citoplazmi tvorijo komplekse (*kompleksacija*) s cisteinom bogatimi polipepidi (fitohelatini) ali pa slednji služijo kot njihovi transporterji v vakuole koreninskih celic. (Greger, 1999; Seregin in Ivanov, 2001). Pojav kopičenja kovin v vakuolah imenujemo *kompartmentizacija (sekvestracija)*.

Hitrejši in manj kontroliran privzem kovin v korenine se lahko odvija na mestih izraščanja stranskih korenin (Seregin in Ivanov, 2001) in v mlajših delih korenin (Greger, 1999).

2.5.1.1 Vpliv talnih in na rastlino vezanih dejavnikov na privzem kovin

Obseg privzema kovin v rastline preko korenin je običajno rezultanta dostopnosti kovine v tleh, stopnje transpiracije rastline in njenega selektivnega privzema kovine (Robinson in sod., 2000). Dostopnost kovin za rastlino pa je odvisna od celokupne koncentracije kovine v tleh, njene kemijske pojavnosti oblike, različnih lastnosti tal (pH tal, kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) definirana z vsebnostjo organske snovi, prisotnostjo mineralnih glinenih delcev in Fe, Mn ter Al oksidov, T, redoks potencial, struktura tal (Marschner, 1995; Greger, 1999; Kayser in sod. 2000) in dejavnikov, vezanih na rastlino (Adriano, 2001) in druge organizme v tleh.

Velja, da je pH najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na dostopnost kovin in da višji ko je pH, več ko je glinenih delcev in več ko je organske snovi (vezava na fulvične ali huminske kisline), močnejše so kovine (predvsem Pb, Zn) vezane in dalj časa adsorbirane na talne delce (Greger, 1999; Martinez in Motto, 1999; Leštan, 2002). Nizek pH poveča biodostopnost vseh kovin za rastline zaradi večje afinitete protona (H^+) za vezavna mesta na negativno nabitih talnih koloidih. Rezultat je sprostitev kovin (Greger, 1999). Ta problem se pojavlja pri zakisanju tal zaradi emisij SO_2 (npr. bližine talilnic) (Adriano, 2001). Nasprotno pa velja npr. za bolj alkalna karbonatna tla, kjer je vsebnost Cd v rastlinah zaradi vezanosti kovine na karbonate bila znatno manjša (Seregin in Ivanov, 2001). pH tal in s tem dostopnost kovin za rastlino je torej odvisna tudi od vrste matične kamnine.

Splošno znana je pozitivna korelacija med vsebnostjo kovin v tleh in rastlinah (Alloway, 1990), kar pomeni, da z večanjem koncentracije kovin v tleh narašča tudi koncentracija kovine v rastlinskih tkivih. Hkrati ob tem lahko zaradi pozitivnega naboja drugih kovinskih ionov in nutrientov prihaja do tekmovanja le-teh s kovinami Pb, Cd, Zn za mesta privzema v rastlino (Greger, 1999). Greger (1999) ter Seregin in Ivanov (2001) pišeta o zmanjšanem privzemu Cd v korenine rodu *Salix* in s tem njegove strupenosti ob povečanih koncentracijah Ca^{2+} v tleh, medtem ko so pri brezi *Betula pendula* opazili povečan privzem Cd^{2+} pri višjih koncentracijah Ca^{2+} v substratu (Seregin in Ivanov, 2001). Wenzel je s sodelavci (2005) opazil, da Cu pri vrbah *Salix* spp. na hidroponiki zmanjša privzem Cd in Zn. Cd, ki je kemijsko zelo podoben Zn, lahko slednjega ob povišani prisotnosti v tleh zamenja pri privzemu v rastlino (Alloway, 1990) ali obratno (Seregin in Ivanov, 2001). Dostopnost Zn naj bi zavirale tudi velike količine P, Cu, Fe, Mn in N v tleh (Kabata-Pendias in Pendias, 1984), pri neki vrsti fižola pa so opazili inhibitorni učinek $Ca^{2+} > Mg^{2+} \gg K^+ > Na^+$ na privzem Cd^{2+} v korenine (Seregin in Ivanov, 2001). Interakcije so pri različnih rastlinah v različnih tleh lahko zelo različne.

Privzem določene kovine v rastlino je vrstno specifičen in odvisen od genotipa rastline (Adriano, 2001; Seregin in Ivanov, 2001). Znano je tudi, da lahko rastlina sama uravnava privzem kovin, npr. akumulatorske rastline lahko z znižanjem pH (ekskrecija organskih kislin ali H^+) aktivno mobilizirajo kovine v rizosfernih tleh (Greger, 1999), medtem ko je izogibanje oz. omejevanje privzema pri rastlinah izključevalcih lahko povezano z inducirano celično smrtjo epidermalnih celic korenin (Delisle in sod., 2001) ali sekrecijo organskih kislin, kot so npr. malat in citrat (za Al) (Briat in Lebrun, 1999). Na privzem kovin vpliva tudi starost, prehranski status in rastiščne razmere rastline ter obseg (velikost) njenega koreninskega sistema (Alloway, 1990; Witting, 1993).

Dostopnost kovin za drevesa in s tem njihovo preživetje na onesnaženih tleh je lahko povezano s sodelovanjem drugih talnih organizmov, npr. koreninskimi bakterijami in z mikoriznimi glivami (Kahle, 1993; Wilkinson in Dickinson, 1995; Clemens in sod., 2002). Glivni plašč mikoriznih korenin lahko namreč deluje kot bariera za strupene kovine (Greger, 1999) in prispeva k detoksifikaciji kovin.

2.5.2 Privzem preko listov

Manjši del kovin lahko rastlina privzame tudi preko listne površine. Količina površinskih depozitov kovin in privzem preko listov je odvisen od relativne zračne vlage (Greger in sod., 1993; Adriano 2001), smeri vetra, moči in količine padavin, temperature, razporeditve listov in vej, vrste kovine (Ross in Kaye, 1996), morfologije listov (Singh in sod., 1997; Adriano, 2001; Seregin in Ivanov, 2001). Rastline s hrapavimi in kosmatimi listi zadržujejo več zračnih depozitov (Singh in sod., 1997; Adriano, 2001) in absorbirajo več kovine. Cd, Zn in Cu lažje vstopajo v liste, Pb pa se v glavnem veže na voske na površini (Greger in sod., 1993). Pri študiju sposobnosti privzema kovin iz tal za neko rastlino je spiranje listov pred meritvami velikega pomena. Singh (1997) je s sodelavci namreč pokazal, da neoprani listi lahko na površini vsebujejo 5-200 krat več Pb kot oprani. Podobno o zračnih depozitih Pb poroča tudi Adriano (2001).

2.6 TRANSPORT KOVIN PO RASTLINI IN NANJ VEZANI MOŽNI NAČINI DETOKSIFIKACIJE

Kovine, ki jih sprejmejo korenine rastline, se kopičijo v vakuolah koreninskih celic (Raskins in sod., 1994) ali pa po apoplastu in simplastu radialno potujejo do žile v prevodnem cilindru korenine. Vstop v prevajalna tkiva po apoplastni poti je odvisen od kemijske sestave celičnih sten endodermalnih celic (Seregin in Ivanov, 2001) in je razen v mlajših delih korenin z še nepovsem izoblikovanimi Kasparijevimi trakovi (Greger, 1999) ponavadi uspešno omejevan (Seregin in Ivanov, 2001). Ob močno povišanih koncentracijah kovin pa zaradi »zloma« endodermalne bariere vendar lahko pride do vstopa kovin v prevajalna tkiva (Seregin in Ivanov, 2001). Vstop kovin v celice (začetek simplastne poti kovin), potovanje med njimi in končno vstop v prevajalna tkiva pa naj bi bil nemetabolen, pasiven proces, ki ga poganjata od transpiracije odvisen masni pretok in difuzija (Greger, 1999; Saxena in sod., 1999). Drugi avtorji za vstop kovin v celice navajajo prenašalsko posredovani aktivni transport (Raskin s sod., 1994; Clemens in sod., 2002), ki je povezan s kompeticijo z drugimi kovinskimi kationi za membranske prenašalce in ionske kanalčke (Seregin in Ivanov, 2001). Znano je, da nekateri dvovalentni

kovinski ioni (npr. Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}) lahko vstopijo v celico s prenašalci za esencialne katione (npr. Fe^{2+} prenašalec) (Briat in Lebrun, 1999; Memon in sod., 2001). Pri radialnem transportu po skorji korenine se velik del kovin, posebej Pb, Cr, Ti, Ag z visoko afiniteto do komponent celične stene (Adriano, 2001), lahko imobilizira z vezavo na celične stene (Seregin in Ivanov, 2001). Rezultat tega je omejevanje nalaganja kovin v ksilem in posledično omejevanje transporta kovin iz korenin v poganjke (Lasat, 2002; Hall, 2002).

Transport kovinskih ionov po rastlini iz korenin v nadzemne dele večinoma poteka po apoplastu (Greger, 1999), in sicer po ksilemu, najverjetneje v kompleksirani obliki z organskimi kislinami (citrati) in aminokislinami (histidin) (Briat in Lebrun, 1999; Greger, 1999; Saxena in sod., 1999; Seregin in Ivanov, 2001), Cd^{2+} pa tudi v prosti ionski obliki (Greger, 1999). Zn se iz korenin v poganjke transportira vezan na organske kisline ali pa se transportira kot Zn^{2+} (Marschner, 1995). Na akropetalni transport verjetno vpliva transpiracijski tok v rastlini (Adriano, 2001), vendar ob povečanju transpiracijskega toka pri *Salix viminalis*, privzem in transport Cd v poganjke ni bil povečan (Greger, 1999). Hitrost apoplastnega transporta naj bi bila odvisna tudi od vrste transportirane kovine, in sicer naj bi bilo potovanje Pb zaradi močnejše vezave na celične stene ksilemskih elementov počasnejše od Cd (Seregin in Ivanov, 2001). Del kovin (posebej Pb) se z vezavo na celične stene ksilemskih cevi torej lahko imobilizira (Adriano, 2001; Clemens in sod., 2002), kar doprinese k toleranci rastlin na povišane koncentracije kovin. K oteženemu privzemu in posledično zmanjšanemu transportu kovin po rastlini lahko prispeva tudi pod vplivom kovin spodbujeno odlaganje kaloze in suberina (Seregin in Ivanov, 2001).

Manjši del transporta kovin po rastlini pa se lahko vrši tudi s floemskim sokom, čeprav sestavljajo floem žive celice, ki vsebujejo polno snovi, na katere se kovine vežejo (Seregin in Ivanov, 2001). Tudi v floemskem soku so namreč odkrili dvovalentne katione nekaterih kovin (Briat in Lebrun, 1999).

Stopnja transporta kovin je odvisna tudi od prisotnosti drugih ionov. Ca^{2+} pri vrbah in brezah pospešuje transport Cd^{2+} iz korenin v poganjke, privzem in transport Mn^{2+} in Zn^{2+} pa naj bi zaviral (Seregin in Ivanov, 2001).

2.7 KOPIČENJE KOVIN V RASTLINSKIH ORGANIH

Porazdelitev in kopičenje kovin Pb, Cd in Zn po rastlini sta odvisna od transportnih mehanizmov (Seregin in Ivanov, 2001). Adriano (2001) navaja, da se elementi v sledih v rastlini lahko porazdeljujejo na tri načine,

- 1) enakomerno med korenine in poganjke (Zn, Mn, Ni, B)
- 2) več kovine v koreninah kot v poganjkih, z zmernimi in včasih velikimi količinami v poganjkih (Cu, Cd, Co, Mo)
- 3) večina kovine v koreninah z zelo majhno količino v poganjkih (Pb, Sn, Ti, Ag, Cr, V)

vendar je lahko razporejanje kovin po tkivih pri rastlinah rastočih na s kovinami onesnaženem območju zaradi razvoja posebnih mehanizmov tolerance tudi drugačno, koncentracije »normalnih« vrednosti kovin Pb, Cd in Zn v nadzemnih delih rastlin na takih tleh (tab. 1) pa so običajno presežene (Seregin in Ivanov, 2001).

Tabela 1: »Normalne« koncentracije kovin Pb, Cd in Zn izmerjene običajno v poganjkih rastlin in mejne koncentracije za hiperakumulacijo v poganjkih. Vrednosti so podane v mg kg⁻¹ SM (prirejeno po ^a Brooks, 2000; ^b Greger, 1999 in ^c Yanqun in sod., 2004).

Kovina	»Normalne« koncentracije	Koncentracije pri hiperakumulaciji
Pb	1 ^{ab} ali 5 ^c	> 1000 ^a
Cd	0,05 ^b ali 0,1 ^{ac}	> 100 ^a
Zn	50 ^b ali 70 ^a ali 100 ^c	> 10000 ^a

Pb iz tal se običajno kopiči v koreninah in se slabo prenaša v druge dele rastline. Povišane koncentracije Pb v listih pa so lahko rezultat zračne depozicije. (Adriano, 2001). Koncentracije Cd in Zn pri vrbah *Salix* spp. so bile relativno visoke predvsem v listih rastlin (Robinson in sod. 2000, Unterbrunner, 2007). Unterbrunner (2007) je pri ivi *Salix caprea* opazil padanje koncentracije Cd in Zn v smeri drobne korenine > listi > srednje korenine > skorja > debele korenine > les, Vandecasteele pa je s sodelavci (2002) ugotovil značilno zvezo med celokupno koncentracijo Zn oz. Cd v tleh in koncentracijo Zn oz. Cd v listih vrh *Salix* spp.

V literaturi se pojavljajo poročila o koncentracijah kovin v koreninah in listih vrh *Salix* spp., dobljeni iz različno zasnovanih raziskav: iz hidroponskih, lončnih in iz poljskih poskusov, najpogosteje z novo zakoreninjenimi potaknjenci dreves. Raziskave pri vrbah iz naravnega okolja so zelo redke. Zato prihaja do velikih razlik v izmerjenih koncentracijah kovin v rastlinskih tkivih (Wenzel in sod., 2005; Unterbrunner, 2007).

2.8 STRATEGIJE PREŽIVETJA RASTLIN NA RASTIŠČIH S POVIŠANO VSEBNOSTJO KOVIN

Toleranca rastlin na povišane koncentracije kovin v tleh se po Baker-ju (1981) lahko kaže na dva osnovna načina: z akumulacijo ali izključevanjem kovin. V obeh primerih se končni učinek dosega z različnimi homeostaznimi mehanizmi t.i. tolerančnimi mehanizmi, ki omogočajo ohranjanje ustreznih fizioloških koncentracij kovin v citosolu rastlinskih celic in so prisotni na različnih nivojih vzdolž celotne poti kovine od rizosfernih tal rastline do končne lokacije v rastlini (Clemens, 2002; Ernst in sod., 1992).

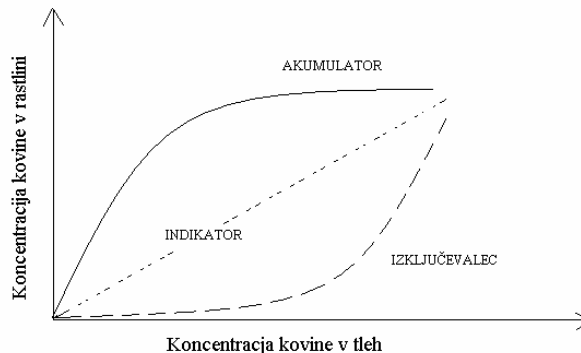
Na kovine tolerantne rastline, ki poseljujejo tla s povišanimi koncentracijami kovin, se razlikujejo v sposobnosti privzema in kopičenja kovin. Baker (1981) govori o treh tipih rastlin:

Izključevalci lahko s pomočjo različnih fizioloških ali tkivnih ovir ohranjajo nivo kovin v poganjkih preko večjega koncentracijskega območja v tleh stalen in nizek. Kopičenje kovine v koreninah ni nujno izključeno. Mehanizem kontrole privzema se ob neki kritični koncentraciji kovine v tleh lahko podre in pride do nekontroliranega privzema kovin v rastline. Odnos med koncentracijami kovin v tleh in rastlinah opišemo z eksponentno krivuljo (Baker, 1981; sl. 4). Koncentracije kovin v nadzemnih delih rastline (listi, poganjki) so manjše kot v tleh (BAI (bioakumulacijski indeks) < 1) (Baker in sod., 1994), translokacijski indeks (TI = razmerje med koncentracijo kovine v listih in koncentracijo kovine v koreninah) pa je < 1 (Baker, 1981). Izključevanje kovin iz rastlinskih organov je povezano z izogibanjem oz. omejevanjem privzema kovin v korenine – rezistenca, oz. omejevanjem transporta kovin iz korenin v poganjke – toleranca.

Indikatorske rastline privzem in transport kovin uravnavajo. Z večanjem vsebsti kovin v substratu privzem v rastlino linearno narašča (sl. 4), kar se lahko izkoristi za odkrivanje potencialnih rudniških ali onesnaženih območij.

Akumulacijske rastline lahko kovine aktivno privzemajo iz tal, jih uspešno nalagajo v ksilem, transportirajo iz korenin v nadzemne dele in jih tu zaradi različnih razstrupljevanih mehanizmov (tvorba helatnih substanc, kompartmentizacija kovine in/ali sprememba metabolizma) kopičijo (Baker, 1981). To se dogaja tako v primeru majhne kot velike zunanje koncentracije kovine, pri čemer se relativni privzem pri veliki koncentraciji v substratu zmanjša (koncentracijsko odvisen privzem opisuje eksponentna oz. logaritemska krivulja - slika) (Baker, 1981; sl. 4). Bioakumulacijski in translokacijski indeks sta pri tej

strategiji > 1. Rastline sposobne ekstremnih akumulacij imenujemo hiperakumulatorji (Baker in sod., 1994).



Slika 4: Rastline z različnimi sposobnostmi za kopičenje kovin v nadzemnih delih (Baker, 1981).

2.9 VPLIV POVIŠANIH KONCENTRACIJ KOVIN V TLEH NA KONCENTRACIJE NEKATERIH NUTRIENTOV V RASTLINI

Povišane koncentracije kovin v tleh lahko zaradi možnih interakcij kationov v tleh (Greger, 1999) in kompeticije kationov za membranske prenašalce ter ionske kanalčke pri privzemu v koreninske celice in transportu med rastlinskimi organi (Thomine in sod., 2000; Seregin in Ivanov, 2001) vplivajo na spremenjen prehraben status rastline in s tem na koncentracije nutrientov (Ca^{2+} , K^{+} , Fe^{2+} ...) v rastlinskih tkivih. Ca^{2+} in K^{+} sta za rastlino esencialna makronutrienta, ki sta v rastlini prisotna v visokih koncentracijah 10-50 g kg^{-1} suhe mase (SM), Fe^{2+} pa esencialni mikronutrient, katerega koncentracije v rastlini varirajo med kritično mejo 66 mg kg^{-1} SM (Marschner, 1995) in 0,2 g kg^{-1} SM (Larcher, 2003). Ca^{2+} in K^{+} sta pomembna pri uravnavanju hidracije rastlinskih tkiv in aktivaciji različnih encimov. K^{+} je pomemben tudi pri vzdrževanju transmembranskega potenciala, Ca^{2+} pa je v povezavi s kalmodulinom znan kot pomemben sekundarni sporočevalec. Fe^{2+} ima s sodelovanjem pri redoks reakcijah pomembno vlogo v splošnem metabolizmu rastline (Larcher, 2003).

Različne kovine imajo različen učinek na absorpcijo drugih ionov zaradi različnih mehanizmov, zato so opazne varaiacije med vrstami (Seregin in Ivanov, 2001). V večini primerov Cd in Pb negativno vplivata na privzem kationov (K^{+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{3+}) in anionov (NO_3^-), saj lahko vodita do nepravilnosti v aktivnosti membranskih encimov in strukturi membrane. Posledica tega je lahko iztok K^{+} iz korenin

in zmanjšanje privzema Fe^{3+} (Seregin in Ivanov, 2001). Pogosto se omenjajo inhibitorni učinki Cd na privzem kovinskih nutrientov za različne transportne sisteme v različnih rastlinah. Cd lahko zavira prenos Fe, Mn, Zn (Thomine in sod., 2000; Meda, 2007 cit. po Korshunova in sod., 1999) preko membrane in/ali vpliva na transport Ca^{2+} preko posebnega prenašalca ali Ca^{2+} kanalčkov (Meda, 2007 cit. po Clemens in sod., 1998). Cohen s sodelavci (1998) omenja sposobnost transporta Cd in Zn, z enim od prenašalcev za Fe. Arduini s sodelavci (1998) govori o zmanjšani vsebnost Mn in Zn v koreninah pri povišanih koncentracijah Cu in Cd ter o spremenjenem privzemu Ca^{2+} in Mg^{2+} pri različnih rastlinah (Arduini in sod., 1998). Pri zelju, koruzi in rižu so ugotovili, da Cd^{2+} lahko inhibira H^+/K^+ antiport (Seregin in Ivanov, 2001).

2.10 UPORABNA VREDNOST RODU *Salix* PRI FITOREMEDIACIJI

Fitoremediacija je postopek uporabe rastlin za čiščenje večjih površin nizko do srednje onesnaženih tal (Garbisu in Alkorta, 2001; Pulford in Watson, 2003). Ker je okolju prijazna, poceni in vizualno prijetna, je vedno bolj aktualna in raziskovana tema (Khan in sod., 2000). Ločimo dve metodi: fitostabilizacijo in fitodekontaminacijo (Salt in sod., 1995). Pri fitostabilizaciji se onesnaževalci (kovine) pretvorijo v nedostopno, nemobilno, stabilno obliko, kar prepereči njihovo spiranje v podtalnico in prenašanje z vetrom, vodo. Pri fitoekstrakciji, eni od metod fitodekontaminacije, pa rastline odstranjujejo kovine iz tal in jih kopičijo v svojih tkivih. Te lahko potem predelamo in jih deponiramo na ustrezno urejenih deponijah/odlagališčih.

Idealne rastline za odstranjevanje toksičnih kovin iz tal bi morale biti odporne na kovine, prilagojene na talne in podnebne značilnosti, sposobne (hiper)akumulacije velikih količin kovin v nadzemnih delih, hitre rasti in velike produkcije biomase ter bi morale imeti globok koreninski sistem (Garbisu in Alkorta, 2001). Takih rastlin zaradi energetsko prezahtevne hiperakumulacije in hkratne velike produkcije biomase v naravi najverjetneje ni. V realnosti pa sta za fitoekstrakcijo (na malo in srednje onesnaženih tleh) uporabna dva tipa rastlin: hiperakumulatorji (npr. *Thlaspi caerulescens*) z zelo visokimi koncentracijami specifične kovine v poganjkih, a majhno biomaso in rastline z nizko do povprečno vsebnostjo nespecifičnih kovin v poganjkih, kar kompenzirajo s svojo veliko biomaso (Keller in sod., 2003). Med slednje bi lahko uvrstili tudi vrbe *Salix* spp.

Vrbe so zaradi prilagodljivosti, hitre rasti in velike produkcije biomase potencialno zelo uporabne za fitoremediacijo (Alvarez in sod., 2003; Vandecasteele in sod., 2002) in zanimive za ponovno ozelenitev onesnaženih tal z ekstremnimi kemijskimi in fizikalnimi

lastnostmi tal (Roselli in sod., 2003). Landberg in Greger (1996) predlagata, da bi ekotipe vrb *Salix* spp. z onesnaženih območij zaradi velike sposobnosti kopičenja kovin lahko izkoristili za čiščenje tal ali da bi vrbe zaradi večjega kopičenja kovin v koreninah rastlin na onesnaženih območjih služili kot dobri vegetacijski filtri.

3 HIPOTEZE IN CILJI

HIPOTEZE:

1. Koncentracija kovin Pb, Cd in Zn, izlužena z amonijevim acetatom, je boljše merilo za oceno ivi *S. caprea* dostopnih koncentracij kovin, kot je celokupna koncentracija kovin.
2. Strategija privzema pri ivi za Pb je izključevanje, z večino privzetega Pb nakopičenega v koreninah, za Cd in Zn pa neizrazita akumulacija z večjo koncentracijo Cd in Zn v listih kot pa v koreninah.
3. Sposobnost kopičenja kovin Pb, Cd in Zn bo boljša pri ivah z onesnaženega območja.
4. Višje vrednosti pH, večja vsebnost organske snovi in višja koncentracija Ca v tleh vplivajo na zmanjšan privzem kovin v rastlino.
5. Povišane koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v tleh zaradi medsebojnih interakcij z kationskimi nutrienti Ca, K, Fe vplivajo na njihove koncentracije v rastlinskih organih.

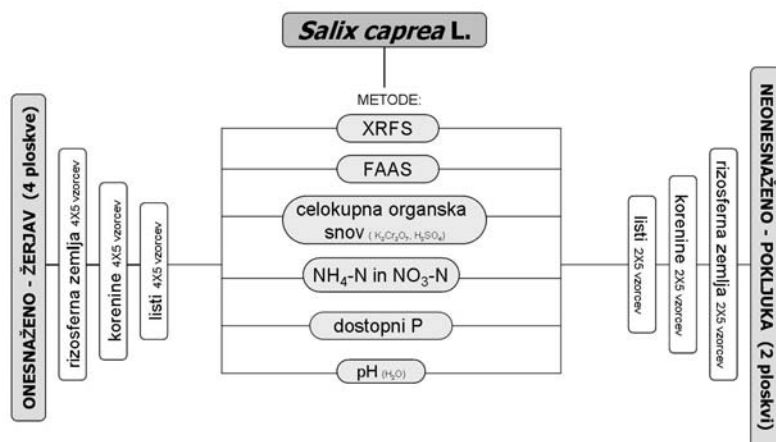
CILJI NALOGE:

1. Določiti celokupno in oceniti biodostopno koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu in neonesnaženega območja na Pokljuki ter ovrednotiti uspešnost ekstrakcijskega sredstva amonijevega acetata za oceno dostopnosti kovin za ivo v žerjavskih tleh. Z vodno ekstrakcijo talnih vzorcev pa določiti tudi koncentracijo kovin v talni raztopini.
2. Določiti koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v koreninah in listih ive *S. caprea*, rastoče na onesnaženem in na neonesnaženem območju.
3. Iz odnosa med koncentracijami kovin Pb, Cd in Zn v koreninah oz. listih in naraščajočo celokupno koncentracijo kovin v rizosfernih tleh sklepati na strategijo privzema (izključevanje, indikacija ali akumulacija) posamezne kovine pri modelni rastlini.
4. S pomočjo bioakumulacijskega (BAI) in translokacijskega (TI) indeksa oceniti kopičenje in porazdeljevanje kovin Pb, Cd in Zn v listih in koreninah ive *S. caprea* ter primerjati sposobnost kopičenja kovin v rastlinah iz populacij na onesnaženem rastišču v Žerjavu in neonesnaženem rastišču na Pokljuki. Na podlagi

tega sklepati na potencialno uporabnost ive za remediacijo s kovinami onesnaženih tal.

5. Ugotoviti ali in kako vplivajo na privzem kovin Pb, Cd in Zn v ivo *C. caprea* nekatere kemijske lastnosti tal (pH, organska snov, fosfati in nitrati v tleh, Ca).
6. Ugotoviti ali povišane celokupne koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v tleh vplivajo in kako (če) vplivajo na vsebnost nutrientov Ca, K, Fe v ivi *S. caprea*.

4 MATERIAL IN METODE



Slika 5: Pregledna shema vzorčenja in uporabljenih analiz v naših raziskavah rastline ive *S. caprea*. XRFS – rentgenska fluorescenčna spektrometrija, FAAS – plamenska atomska absorpcijska spektroskopija, NH₄-N – amonijev dušik, NO₃-N – nitratni dušik, P – fosfat.

4.1 MATERIAL

Uporabljen material (raztopine, steklovina, aparature) in opremo smo navajali sproti med opisom metod.

Vse raztopine smo pripravljali in redčili z bidestilirano vodo (dd H₂O) (Milipore Q-185, 18,2 MΩ/cm).

Vso steklovino, ki smo jo uporabljali pri analizah, smo sprali pod tekočo vodo, nato še z bidestilirano vodo in sušili v sušilniku pol ure pri 105°C, razen če je pri metodah navedeno drugače.

4.2 RASTLINA: Iva *Salix caprea* L.

Iva *Salix caprea* (fam. *Salicaceae*) (sl. 6a) je 2 do 10 m visok grm ali drevo (Bačič, 2003), ki je med najpogostejšimi vrbami in je razširjena po vsej Sloveniji. Pogosta je na posekah, pogoriščih, po gozdnih robovih, ob vodah in v svetlih gozdovih. Cveti marca in aprila, precej pred olistanjem (Brus, 2004). Spoznamo jo po tem, da so mlade olupljene veje brez vzdolžnih prog in po značilnih listih. Listna ploskev je 1,5-2 (2,5)-krat tako dolga kot široka, zaokrožena, najširša v sredini. Listi so enostavni, spodaj gosto in mehko

belkastovolnatodlakavi (na otip mehki), brez zelenega vrha, večinoma z izstopajočimi žilami in imajo večinoma razvite 3-5 mm dolge priliste (Bačič, 2003) (sl. 6b).

Iva je ena najbolj značilnih pionirskih drevesnih vrst, saj se skoraj vedno med prvimi pojavi na zaraščajočih gozdnih površinah. To ji omogočajo lahko in hitro kaljivo seme, ki ga veter zlahka raznese daleč naokrog, hitra mladostna rast in rastiščna skromnost (Brus, 2004).

Slika 6: Rastlina iva *Salix caprea* L. na onesnaženem območju v Žerjavu (a) (foto: M. Likar) in njena vejica (b). Spodnji trije listi na vejici od leve proti desni prikazujejo spodnjo stran listov.

a)



b)



4.3 VZORČENJE

4.3.1 Vzorčne ploskve

Rastlinske vzorce in vzorce tal smo nabrali na štirih vzorčnih ploskvah na onesnaženem območju v Žerjavu (Koroška, Vzhodne Karavanke) in na dveh neonesnaženih vzorčnih ploskvah na visoki planoti Pokljuki (Julijske Alpe). Na vsaki ploskvi velikosti približno 300 m² je raslo vsaj pet vrb *Salix caprea*. Za določitev rastlinske vrste smo uporabili Malo floro Slovenije (Martinčič in sod., 1999) in knjižico Razni določevalni ključi. Verzija 2.78. (Bačič, 2003). Žerjavske vzorčne ploskve se razlikujejo v oddaljenosti od dimnikov talilnice svinca (sl. 7). Njihova nadmorska višina se giblje med 600 in 900 m. Matično kamnino teh ploskev gradita triasni apnenec in s kovinami bogati dolomit, ki ju prekriva kamniti tip rendzine z različno debelo in s kovinami Pb, Cd, Zn različno onesnaženo humusno plastjo (Regvar in sod., 2006).

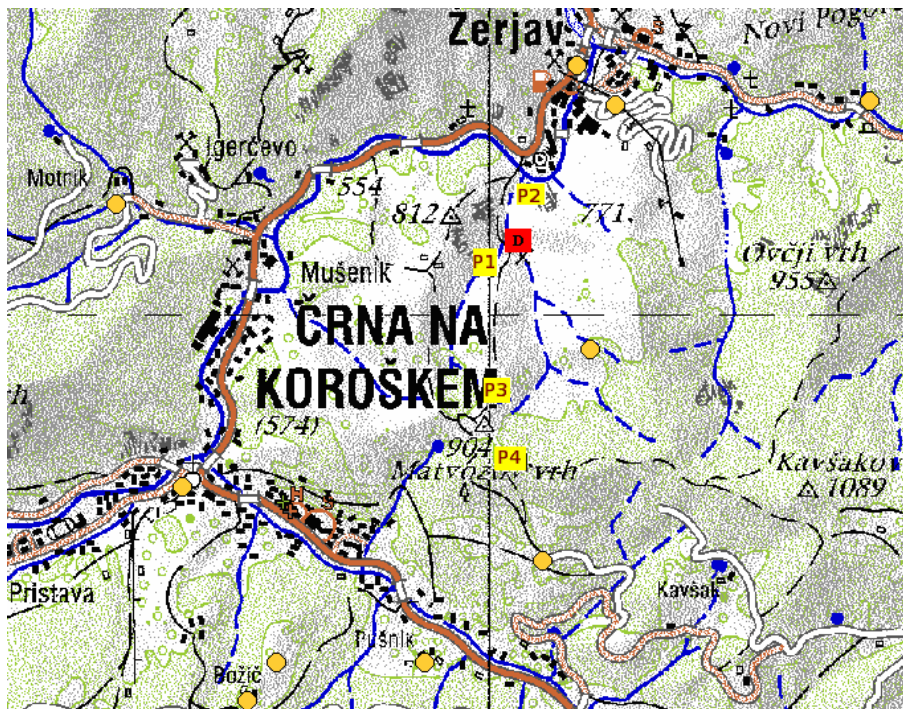
Vzorčna ploskev P1 ($x = 489997$, $y = 148252$) leži nasproti dimnikov in ima naklon 30° . Tla so erodirana, kamnita in obremenjena z zračnimi depoziti kovin. Neposredno na matični kamnini se je oblikovala tanka plast (1 cm) delno razkrojene organske snovi ter nakopičene humificirane organske snovi. Pokrovnost tal je nepopolna (70 %). Med zelišči prevladujeta *Minuartia gerardii* in *Calamagrostis varia* (Vogel-Mikuš in sod., 2005) pojavljajo pa se tudi različne vrste vrb, od katerih prevladuje iva (sl. 8a).

Vzorčna ploskev P2 ($x = 490134$, $y = 148578$) se nahaja blizu zapuščenih vhodov v rudnik svinca (obremenjena z depoziti rude). To je približno 250 m severno od dimnikov na pobočju z naklonom 40° . Leži na nekoliko bolj odprti legi. Tla so skeletna. Delno razgrajena organska snov s humusom sega do globine 20 cm. Pokrovnost z vegetacijo je 70 % (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Od lesnih vrst se največ pojavljajo vrbe *Salix* spp., najpogostejše *Salix caprea*, od zelišč pa prevladujejo trave, med njimi *Sesleria caerulea*.

Ploskvi P1 in P2 ležita v ozki zaprti dolini z prevladujočim (70%) J-JZ vetrom v času opoldanskih ur, ki sega do roba doline. Smer vetra narekuje usmerjenost doline (Fajmut, 1978).

Vzorčna ploskev P3 ($x = 486976$, $y = 147625$) leži na vrhu hriba (nadmorska višina 780 m), približno 500 m južno od talilniških dimnikov (Regvar in sod., 2006). Tla prekriva nastajajoča rendzina z delno razgrajeno organsko snovjo in humusom (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Pokrovnost z vegetacijo je 90 %. Med lesnimi vrstami prednjači rod *Salix* z vrstama *S. caprea*, *S. appendiculata*, pojavljajo se tudi vrsti *Populus tremula*, *Betula pendula*. Najpogostejša zelišča so *Sesleria caerulea*, *Thlaspi praecox* in *Thymus serpyllum* (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Ploskev je izpostavljena insolaciji, vetru in zračnemu onesnaževanju iz doline (Regvar in sod., 2001) (sl. 8b).

Vzorčna ploskev P4 ($x = 490119$, $y = 174415$) leži na vrhu hriba, 200 m južneje od P3, kjer je vpliv kovin in zračnega onesnaževanja zaradi največje oddaljenosti od talilnice zmanjšan. Tla pokriva nastajajoča rendzina, delno razgrajena organska snov in humus. Pokrovnost ploskve (100 %) (Vogel-Mikuš in sod., 2005) predstavlja travnata ruša, prisotna so tudi drevesa in grmi. Najpogostejše od zelišč so vrste *Calamagrostis varia* in *Erica carnea*. Od lesnih vrst se pojavljajo vrbe *Salix* spp. (*S. caprea*, *S. appendiculata*, *S. glabra*), *Acer pseudoplatanus*, *Pinus sylvestris* in *Picea abies*. Za ploskev so značilni prevladujoči jutranji, večerni in nočni V-SV vetrovi (Fajmut, 1978).

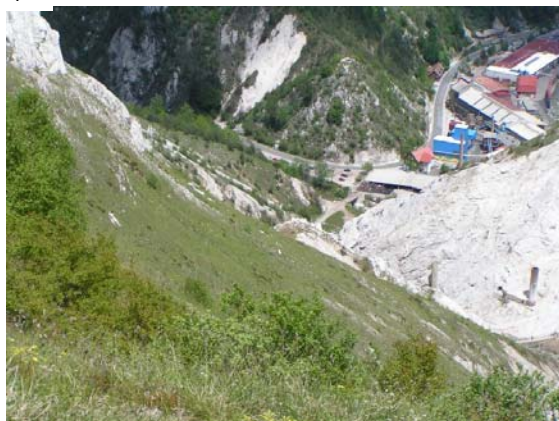


Slika 7: Vzorčne ploskve (P1-P4) nabiranja vzorcev rizosferne zemlje in rastlinskih vzorcev ive *S. caprea* v Žerjavu (Koroška), onesnaženem s Pb, Cd in Zn. D – dimniki talilnice svinca (Vir: Bioportal..., 2006).

a)



b)

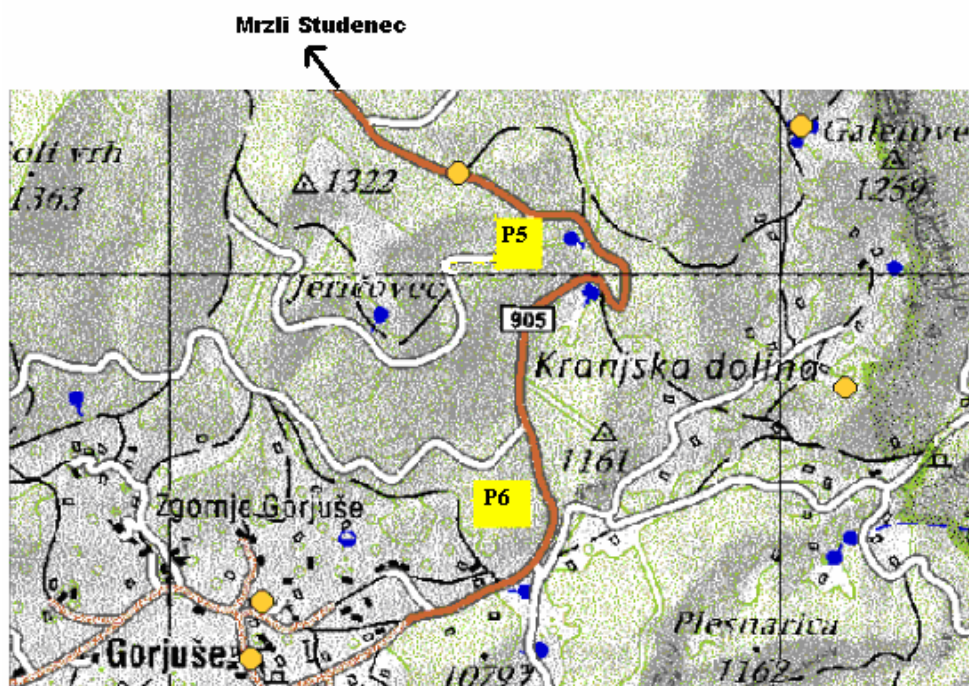


Slika 8: Vzorčna ploskev P1 (a) in vzorčna ploskev P3 (b) na onesnaženem območju v Žerjavu. Na slednji so vidni obrati talilnice svinca v Dolini dimnikov. (foto: M. Likar)

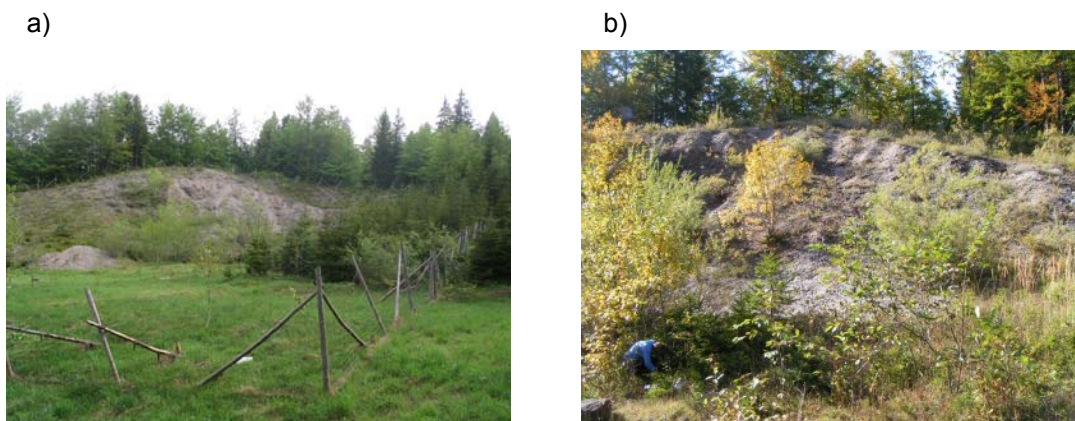
Vzorčni ploskvi na Pokljuki sta locirani ob lokalni cesti med naseljema Mrzli Studenec in Gorjuše (sl. 9). Ploskvi razen izpušnim plinom avtomobilov nista izpostavljeni neposrednemu onesnaževanju s kovinami. Matično kamnino predstavlja z rendzino prekriti triasni apnenec (Geografski atlas Slovenije, 1998).

Vzorčna ploskev P5 ($x = 424265$, $y = 132648,5$) leži ob južnem odcepu gozdne ceste, ki je od Mrzlega Studenca po lokalni cesti proti Gorjušam oddaljen 4,5 km. Nadmorska višina je okrog 1220 m. Organska plast je debela. Ive *S. caprea* rastejo z drugimi pionirskimi predstavniki (*Salix* spp., *Betula pendula*) na robu smrekovega gozda.

Vzorčna ploskev P6 ($x = 4251823$, $y = 131236$) je opuščeni lokalni peskokop, ki se nahaja zahodno od ceste tik pred naseljem Gorjuše. Nadmorska višina je okrog 1050 m. Tla prekriva tanka plast organskih snovi. Vegetacija je značilna pionirska (*Salix* spp., *Betula pendula*, travna ruša) (sl. 10a,b).



Slika 9: Vzorčni ploskvi (P5, P6) nabiranja vzorcev rizosferne zemlje in rastlinskih vzorcev ive *S. caprea* na neonesnaženem območju na Pokljuki (Julijske Alpe) (Vir: Bioportal..., 2006).



Slika 10: Ploskev P6 na neonesnaženem območju na Pokljuki spomladi (a) in jeseni (b). (foto b: M.Likar)

4.3.2 Vzorčenje tal in rastlinskega materiala

Na vzorčnih ploskvah v Žerjavu in na Pokljuki smo naključno izbrali pet grmov oziroma dreves ive *Salix caprea*, razen na vzorčni ploskvi P1, kjer smo izbrali štiri rastline. Ob vsaki rastlini smo vzeli vzorec rizosferne zemlje, vzorec korenin in vzorec listov. Vzorce tal in rastlinske vzorce v Žerjavu smo nabrali v juliju 2003, vzorce tal in rastlinske vzorce na Pokljuki pa v septembru 2003.

Zaradi velike naključne mozaičnosti tal, t.j. heterogenosti tal glede na vsebnost kovin znotraj majhnih vzorčnih površin v Žerjavu (Vogel-Mikuš in sod., 2005) smo za vzorce tal nabrali rizosferno zemljo. Tako smo dobili zanesljive podatke o pogojih, v katerih je rastlina rasla. Pri vsaki izbrani rastlini smo v oddaljenosti do 1 m od debla v globini 10-15 cm izkopali nekaj manjših korenin s pripadajočo rizosferno zemljo. Da smo se prepričali o pripadnosti vzorčene korenine k izbrani ivi *S. caprea*, smo korenini sledili do izraščanja ob deblu oziroma večje korenine, ki je pripadala tej rastlini. Vzorec listov za določeno rastlino je predstavljalo dvajset naključno nabranih, vizualno zdravih in popolnoma razvitih listov.

Nabrane vzorce tal smo sušili v sušilniku 24 h pri 60°C, nato smo jih presejali skozi sito z velikostjo por 630 µm gosto in shranili v čiste plastične posodice za nadaljnje analize. Shranjevali smo jih v temnem prostoru pri sobni temperaturi. Rastlinske vzorce korenin in listov ive *S. caprea* smo sušili v sušilniku 3 dni pri 40°C. Listov nismo spirali, iz korenin pa smo pred sušenjem pod tekočo vodo sprali preostalo zemljo.

4.4 ANALIZE TALNIH VZORCEV

4.4.1 Določanje pH

pH talnih vzorcev smo določili (PHM 28, Copenhagen) med pripravo vzorcev za ocenjevanje biodostopnih koncentracij kovin v talnih vzorcih z vodo. pH smo izmerili v filtratih z vodo (Öhlinger, 1995).

4.4.2 Določanje celokupne organske snovi

Organsko snov v tleh smo določali s kromovo metodo, povzeto po Kandeler (1995). Metoda je primerna za tla, ki vsebujejo do 8 % organske snovi in ni primerna za določanje organske snovi v humusnih gozdnih in travniških tleh. Princip je ta, da se organska snov v tleh oksidira s pomočjo mešanice 0,33 M $K_2Cr_2O_7$ in 96-98% H_2SO_4 . Krom Cr(III), ki se tvori in je ekvivalent organski snovi, smo določili kalorimetrično s pomočjo umeritvene krivulje.

Potrebno količino 0,33 M raztopine $K_2Cr_2O_7$ smo pripravili tako, da smo k 5,83 g $K_2Cr_2O_7$ (Alkaloid, Skopje) dolili 60 ml destilirane vode. Raztopino smo mešali, po potrebi segrevali, da se je $K_2Cr_2O_7$ popolnoma raztopil.

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili pet standardov. Standarde in vzorčne raztopine tal smo pripravljali v sterilnih 10ml bučkah v digestoriju. V bučke za standarde smo z analitsko tehtnico (Tehtnica, Sauter) zatehtali 0 g, 0,0058 g, 0,0116 g, 0,0174 g in 0,0232 g inozitola, v ostale bučke pa po 0,2 g prsti talnih vzorcev. V vsako bučko smo dodali 2 ml raztopine $K_2Cr_2O_7$ in 1,5 ml H_2SO_4 (Merck). Zaradi burne reakcije in kipenja ob dodatku H_2SO_4 smo v bučke najprej dodali 0,5 ml H_2SO_4 , nato pa po kapljicah še 1 ml. Raztopine smo pustili stati 2-3 h, potem pa smo do oznake 10 ml dodali ddH₂O, premešali in pustili stati čez noč.

Za fotometrično analizo smo 1 ml standardne oziroma vzorčne raztopine razredčili do 25 ml z ddH₂O in rahlo premešali. Absorpcijo standardnih oziroma razredčenih vzorčnih raztopin smo izmerili s spektrofotometrom (Hewlett Packard 8452A) pri 570 nm. Vrednosti mioinozitolnih standardov ustrezajo 0 %, 2 %, 4 %, 6 % in 8 % organske snovi v prsti. Iz umeritvene krivulje standarda smo po formuli

$$S \times 2 / SM = \% \text{ organske snovi} \quad \dots (1)$$

S = organska snov vzorca (%)

2 = faktor pretvorbe

SM = začetna masa posušene prsti

izračunali organsko snov v vzorcih izraženo kot % prsti.

Večina vzorčnih raztopin je vsebovala več kot 8 % organske snovi, zato smo le-te po potrebi redčili (2x, 5x, 10x, 15x) in faktor redčitve upoštevali pri izračunu % organske snovi.

4.4.3 Določanje vsebnosti amonijevega (NH₄-N) in nitratnega dušika (NO₃-N)

NH₄-N in NO₃-N smo določali na osnovi redukcije s kadmijem, pri čemer je potrebna predhodna ekstrakcija NH₄-N in NO₃-N z raztopino 2 M KCl iz tal (Dahnke, 1990).

Potrebno količino 2 M raztopine KCl smo pripravili tako, da smo 225 g KCl (Merck, Darmstadt, Nemčija) raztopili v 500 ml ddH₂O, nato pa smo z ddH₂O razredčili še do 1,5 l.

V čiste steklene čaše smo zatehtali 5 g prsti talnih vzorcev in dolili 50 ml raztopine kalijevega klorida 2 M KCl. Nato smo čaše pokrili s folijo, zatesnili z elastiko in pri sobni temperaturi eno uro stresali na stresalniku pri 180 rpm. Za kontrolo smo eno stekleno čašo napolnili le z 50 ml raztopine 2 M KCl in z njo ravnali enako kot s talnimi vzorci. Po stresanju smo čaše pustili stati čez noč, nato pa smo bistro raztopino nad usedlino previdno odpipetirali v 10ml epruvete. Vsebnost NH₄-N in NO₃-N v ekstrakcijski tekočini smo izmerili s spektrofotometrom Autoanalyzer II (Bran + Luebbe Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Pri tem smo sledili navodilom proizvajalca. Za vsak vzorec smo izmerili tri podvzorke in upoštevali povprečno vrednost.

4.4.4 Določanje rastlinam dostopnega fosfata (PO₄-P) v tleh

Biodostopni orto-fosfat (PO₄-P) smo določali z metodo ekstrakcije z natrijevim hidroegenkarbonatom 0,5 M NaHCO₃ pri pH 8,5 (Olsen in sod., 1982). Hidrogenkarbonat HCO₃⁻ se v kemijski reakciji pretvarja v CO₃²⁻, iz tega pa nastane CaCO₃. Rezultat je zmanjšana aktivnost kalcija in posledično povečana količina fosfatov v raztopini. Fosfor v kislem okolju 0,24 M H₂SO₄ reagira z amonijevim molibdatom, pri čemer askorbinska kislina v prisotnosti antimona deluje kot reducent. Nastali PO₄-P določimo

spektrofotometrično pri 882 nm. Metoda je primerna za določanje dostopnega orto-fosfata v rahlo kislih do bazičnih tleh.

4.4.4.1 Priprava steklovine in reagentov

Steklovino, ki smo jo uporabljali pri ekstrakciji in filtriranju smo oprali pod tekočo vodo, jo sprali z 0,5 M HCl in nato še 3-krat z ddH₂O. Steklovino smo sušili v sušilniku pol ure pri 105°C. Da smo izključili možnost kontaminacije z »zunanjim« orto-fosfatom, smo steklovino oprali tik pred uporabo. Za ekstrakcijo PO₄-P smo pripravili 0,5 M raztopino NaHCO₃ s pH 8,5, za spektrofotometrično določanje PO₄-P pa reagent A in reagent B. Za umeritveno krivuljo smo pripravili izhodni fosfatni standard s koncentracijo 100mg/l PO₄-P. Z nadaljnjim redčenjem le-tega z 0,5 M NaHCO₃ smo v sedem steklenih čaš pripravili 100 ml standardnih raztopin fosfatov z naslednjimi koncentracijami: 0,00 mg/l, 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 0,75 mg/l, 1,00 mg/l, 2,00 mg/l, 4,00 mg/l. Pripravo reagentov prikazuje tab. 2.

Tabela 2: Priprava reagentov za določanje fosfatov v tleh

RAZTOPINA	REAGENT	PROIZVAJALEC REAGENTA
- Raztopina za spiranje steklovine (0,5 M HCl)	125 ml 37% HCl + 2875 ml ddH ₂ O	Merck, Darmstadt; $\rho = 1,19$ kg/l Milipore Q-185, 18,2 M Ω /cm Riedel
- Ekstrakcijska raztopina (0,5 M NaHCO ₃ , pH = 8,5)	105,03 g NaHCO ₃ + 2 l ddH ₂ O umerimo z 2M NaOH na pH = 8,5, dopolnimo z ddH ₂ O do 2,5 l	Merck, Darmstadt, Nemčija Milipore Q-185, 18,2 M Ω /cm
- Raztopina za umerjanje pH ekst. raztopine (2M NaOH)	16 g NaOH + 200 ml ddH ₂ O.	Merck, Darmstadt, Nemčija
- Reagent A: pomešamo		
amonijev molibdat	0,9 g [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O] + 18,7 ml ddH ₂ O	Kemika, Zagreb Milipore Q-185, 18,2 M Ω /cm
antimon kalijev tartrat	0,0218 g [K(SbO) x C ₄ H ₄ O ₆ x ¹ / ₂ H ₂ O] +	Merck, Darmstadt, Nemčija Milipore Q-185, 18,2 M Ω /cm
žveplova kislina (5,76 M H ₂ SO ₄)	7,5 ml ddH ₂ O 24 ml H ₂ SO ₄ (96%) + 126 ml ddH ₂ O	Merck, Darmstadt, Nemčija Milipore Q-185, 18,2 M Ω /cm
- Reagent B:		
askorbinsko/molibdatni reagent	0,6072 g C ₆ H ₈ O ₆ 115 ml reagenta A	Kemika, Zagreb
- Izhodni fosfatni standard:		
pripravimo KH₂PO₄ (konc. 1000 mg/L PO ₄ -P)	0,1433 g KH ₂ PO ₄ + 100 ml ddH ₂ O in 10 ml zg. raztopine +	
in redčimo z 0,5 M NaHCO ₃ (= izhodni standard z konc.100mg/l PO₄-P)	90 ml 0,5 M NaHCO ₃	Riedel

Opomba: Pripravljen reagent A, ki ga shranjujemo v temni zaprti plastenki, je uporaben štiri mesece. Reagent B se pripravlja po potrebi pred uporabo.

4.4.4.2 Postopek ekstrakcije in analize fosfata

V čiste steklene čaše smo zatehtali po 2 g tal in jim dodali 40 ml ekstrakcijske raztopine 0,5 M NaHCO₃. Enak volumen 0,5 M NaHCO₃ smo dodali tudi v čaše s pripravljenimi določenimi koncentracijami standardnih raztopin fosfatov. Za negativno kontrolo smo uporabili prazno stekleno čašo, ki smo jo napolnili s 40 ml 0,5 M NaHCO₃. Vse te steklene čaše smo nato pokrili s plastično folijo, zatesnili z elastiko in pol ure stresali na stresalniku z 180 rpm pri sobni temperaturi. Sledilo je takojšnje filtriranje vseh suspenzij v nove steklene čaše. Uporabili smo filtrirni papir Schleicher&Schnell (Nemčija).

V 25ml čiste epruvete smo odpipetirali po 3 ml prefiltiranih talnih ekstraktov oziroma ekstraktov fosfatnih standardov. Vsakemu ekstraktu smo dodali 9 ml bidestilirane vode in 3 ml askorbinsko/molibdatnega reagenta (reagent B) ter premešali. Reagent B smo dodajali 10 minut pred spektrofotometrično meritvijo s spektrofotometrom (Philips PU 8630). Po umerjanju s fosfatnim standardom koncentracije 0,00 mg/l PO₄-P (absorbanca 0,000) smo določili absorbanco pri 882nm še za ostale raztopine fosfatnih standardov in talnih vzorcev. Vsako meritev smo opravili štiri krat. Iz umeritvene krivulje standardov smo določili koncentracije fosforja v ekstrakcijskih tekočinah za slepo probo in talne vzorce, nato pa smo po formuli

$$PO_4\text{-}P \text{ mg/kg v tleh} = (PO_4\text{-}P \text{ mg/l v ekstraktu} - \text{negativna kontrola}) \times 20 \quad \dots(2)$$

izračunali količino rastlinam dostopnega fosforja v talnih vzorcih, ki smo jo izrazili v mg kg⁻¹ prsti.

Talne vzorce, ki so presegli vrednosti absorbance fosfatnega standarda z najvišjo koncentracijo, smo po potrebi redčili in to upoštevali tudi pri končnem izračunu.

4.4.5 Določanje celokupnih koncentracij kovin v talnih vzorcih

Za analize talnih vzorcev in vzorcev korenin ter listov smo uporabili rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRFS). Prednosti te metode pred drugimi spektroskopskimi tehnikami so enostavna priprava vzorca, hitra (nekaj 100 do nekaj 1000 sekund) in hkratna analiza več elementov ter široko koncentracijsko območje analize (od nekaj ppm do nekaj %). Pomanjkljivost metode je močan vpliv nehomogenosti vzorca na zanesljivost meritev (Kump, 2005).

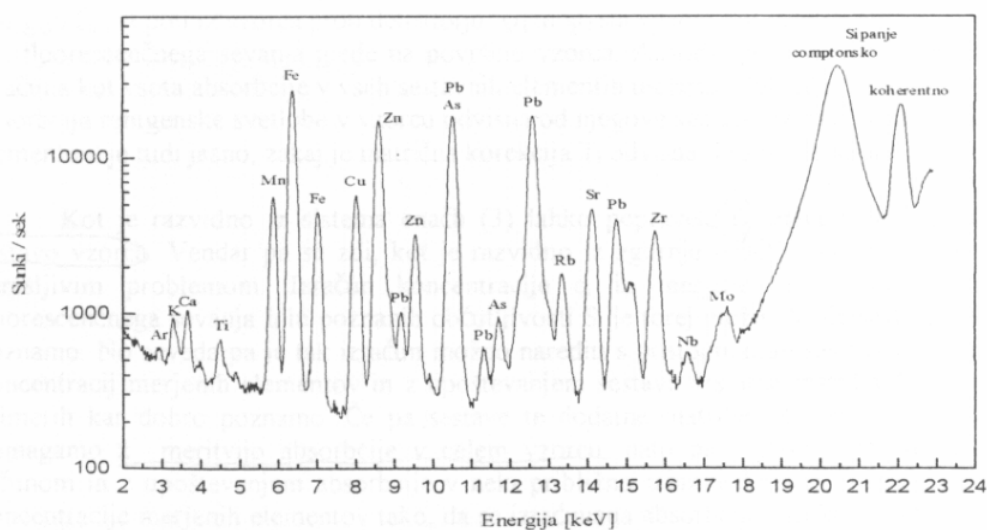
4.4.5.1 Rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRFS) – osnova tehnike

Osnova rentgenske spektrometrije je fizikalni proces rentgenske fluorescence, ki omogoča kvalitativno in kvantitativno analizo elementov (v našem primeru kovin Pb, Cd in Zn) v različnih vzorcih (Kump, 2005).

Predpogoj za merjenje rentgenske fluorescence je vzbujanje (ionizacija) atomov v osnovnem stanju v vzorcu, in sicer v močno vezanih stanjih elektronov lupin K in L. To dosežemo z monokromatskim radioizotopskim vzbujanjem s fotoni rentgenske svetlobe iz radioaktivnih izvorov (^{55}Fe , ^{241}Am , ^{109}Cd) (Nečemer in sod., 2003). Ob vzbujanju atomov s fotoni najpogosteje pride do fotoefekta – medsebojnega delovanja fotonov in vezanih elektronov v atomu. Če je energija fotona večja od vezavne energije elektrona v atomu, se foton absorbira. Del njegove energije se porabi za ionizacijo atoma, preostalo pa izbiti elektron (fotoelektron) obdrži kot kinetično energijo. Atom je v takem vzbujenem stanju nestabilen, saj mu na eni izmed lupin manjka elektron. Nadomestitev vrzeli z elektroni iz višjih lupin (M, K) pomeni vrnitev atoma v stabilno osnovno stanje, pri tem pa pride do rentgenske fluorescence (Kump, 2005). Proces rentgenske fluorescence prikazuje sl. 13.

Rentgenska fluorescenca je pojav izsevanja odvečne elektromagnetne energije vzbujenih (ioniziranih) atomov v vzorcu v obliki rentgenske svetlobe. To se zgodi v procesu relaksacije, to je prehodu vzbujenih (ioniziranih) atomov v osnovno stanje (Kump, 2005). Izsevana rentgenska svetloba je po energiji karakteristična za določen atom in to omogoča določitev elementarne sestave vzorca. Relaksacija vzbujenih atomov pa lahko poteče tudi drugače. Odvečna energija vzbujenega atoma se ne izseva, ampak se skoncentrira na mestu elektrona v manj vezanem stanju in ga odtrga od atoma. Proces se imenuje Augerjev proces, prosti elektron pa Augerjev elektron. Oba omenjena procesa relaksacije si konkurirata. Proces rentgenske fluorescence je malo verjeten pri atomih z nizkim atomskim številom, narašča z atomskim številom in je bolj verjeten za vzbujene elektrone v lupini K kot v lupini L. Zaradi tega rentgensko fluorescenčna analiza ni primerna za določanje elementov z nizkim atomskim (vrstnim) številom, kot so npr. C, O, F, Na, Mg, Al in Si (Kump, 2005).

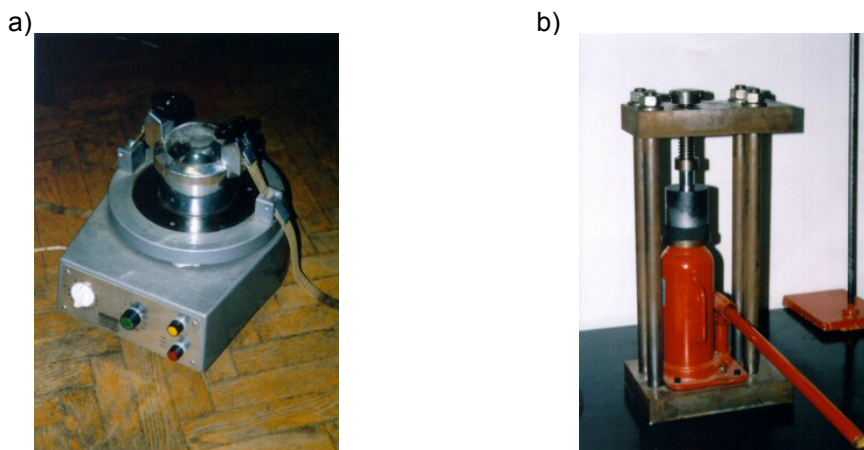
Uporabnost izsevane rentgenske svetlobe vzbujenih atomov za analizo elementov v vzorcu zahteva merjenje spektra fluorescenčne rentgenske svetlobe (sl. 11). Za to se uporabljajo rentgenski spektrometri, ki merijo tako energijo rentgenskih žarkov, kot tudi njihovo število, torej energijsko porazdelitev fluorescenčne rentgenske svetlobe (Kump, 2005). Število rentgenskih žarkov omogoča določitev koncentracije elementa v vzorcu.



Slika 11: Primer rentgensko fluorescenčnega spektra, merjenega na vzorcu zemlje pri vzbujanju z radioaktivnim izvorom ^{109}Cd . Na abscisni osi so nanešene energije, na ordinatni osi pa je označeno odgovarjajoče število izmerjenih rentgenskih fotonov v času. Vsebnosti elementov se izračunajo z uporabo dodatne meritve absorpcije v vzorcu (povzeto po Kump, 2005).

4.4.5.2 Priprava tabletk za metodo XRF

Za merjenje vsebnosti kovin z metodo XRF je potrebna posebna priprava vzorca – oblikovanje tabletk. Suhe in presejane vzorce tal smo v mehničnem mlinu (Fritsch, Idar-Oberstein, Nemčija) z volfram/karbidnim terilcem (sl. 12a) najprej zmelili v droben prah. Ker nehomogenost vzorca močno vpliva na točnost analize, je dobra priprava in homogenizacija vzorca izredno pomembna. Iz 0,4-1,2 g prahu vsakega vzorca smo s pomočjo nerjavečega modela za tabletko in hidravlične stiskalnice (Schneider, Mod.MU 100, 10.000 kPa) (sl. 12b) stisnili tabletko s površino 4,9 cm² ter jih stehali. Postopek je povzet po Nečemer in sod. (2003). Med pripravo tabletk iz različnih vzorcev smo uporabljan material čistili z etanolom in papirnatimi brisačami. Tako smo preprečili možnost kontaminacije med vzorci. Tabletko smo do meritev shranili v čistih plastičnih posodah.



Slika 12: Mehanični mlin (Fritsch, Idar-Oberstein, Nemčija) za mletje vzorcev (a) in hidravlična stiskalnica (Schneider, Mod.MU 100) za pripravo tabletk (b).

4.4.5.3 Opis meritve

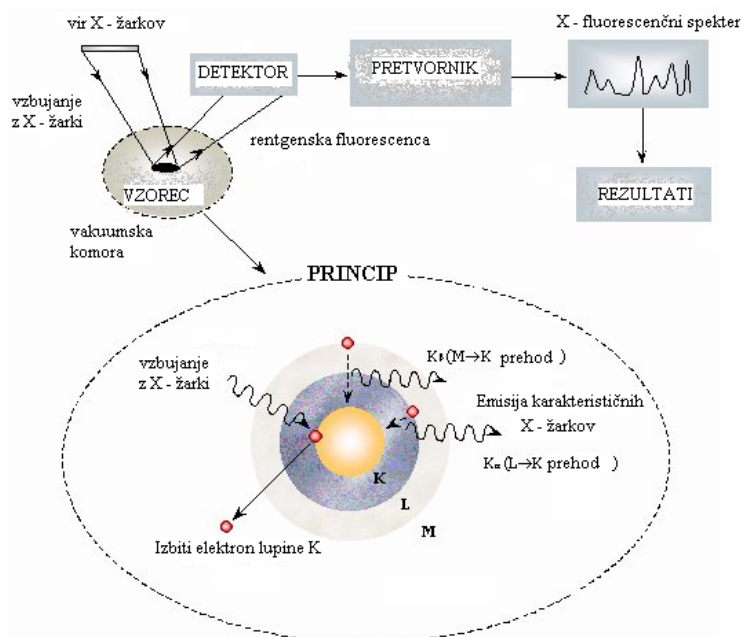
Rentgenska svetloba iz americijevega (^{241}Am , 750 MBq) ali kadmijevega (^{109}Cd , 300 MBq) obročastega radioizotopnega vira (Isotope Products Laboratories, U.S.A) je obsevala vzorec v vakuumski komori, se v vzorcu absorbirala in vzbudila fluorescenčno sevanje, katerega spekter smo izmerili z energijsko disperzijski spektrometrom (EDS). Le-ta je sestavljen iz:

- Si (Li) polprevodniškega detektorja (Canberra, Meriden, USA)
- spektroskopskega ojačevalca (Canberra, M 2024)
- analogno digitalnega pretvornika (Canberra, M 8075)
- večkanalnega analizatorja -MCA (Canberra, S100)

Energijska ločljivost spektrometra je 175 eV pri 5.9 keV (Nečemer in sod., 2003). Meritev spektra posameznega vzorca z ^{241}Am virom smo opravljali po 1000 sekund, meritev z ^{109}Cd izvorom pa 2000 sekund.

Za zbiranje kompleksnega spektra smo uporabili poseben računalniški program (Nečemer in sod., 2003).

Potek meritve vzorcev z XRFS je prikazano na sl. 13.



Slika 13: Prikaz meritve z XRFS in princip XRFS (prirejeno po: Theory, X-ray..., 2006).

4.4.5.4 Analiza spektra in kvantitativna analiza

Dobljene spektre smo analizirali s programom za analiziranje spektrov AXIL, za kvantitativno analizo pa smo uporabili programsko opremo QAES (Quantitative Analysis of Environmental Samples), ki je bila razvita na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Kvantitativna analiza temelji na izmerjeni absorpciji Mo (za vse vzorce, vzbujane z AM virom in za vzorce tal, vzbujane s Cd virom) oziroma Cu (za vzorce korenin in listov vzbujane s Cd virom), ki predstavlja matriko za obdelavo spektra. Poleg koncentracij kovin Pb, Cd in Zn smo določili še koncentracijo rastlinskih nutrientov K, Ca in Fe.

Za zagotovitev natančnosti elementarnih analiz z XRFS smo uporabili standardni referenčni material, Montana Soil NIST SRM 2711 in Spruce needles BCR-CRM-101, z znanimi koncentracijami mineralov.

4.4.6 Ocenjevanje izmenljivih frakcij kovin z FAAS

Izmenljive frakcije kovin v tleh smo ocenili z ekstrakcijo z ddH₂O (Öhlinger, 1995) in ekstrakcijo z amonijevim acetatom NH₄Ac (pH = 7) (Baker in sod., 1994). Slednja naj bi bila zelo dobro merilo dostopne frakcije kovin v tleh (Ernst, 1996). Vodne in acetatne frakcije smo zaradi velike občutljivosti metode analizirali s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS).

Atomska absorpcija je proces, pri katerem atom po absorpciji svetlobe dolžene valovne dolžine preide iz najbolj stabilne orbitalne konfiguracije, ki se imenuje osnovno stanje, v manj stabilno konfiguracijo – vzbujeno stanje. Pri metodi FAAS se vzorec v obliki aerosola v plamenu (mešanica zraka in acetilena) pretvori v paro atomov. Atomi absorbirajo svetlobo pri določeni valovni dolžini. Več kot se jih nahaja v svetlobnem žarku, večja je količina absorbirane svetlobe. Osnova za določanje neznanih koncentracij atomov kovin v rastlinskih vzorcih je zveza med količino absorbirane svetlobe in znano koncentracijo atomov v standardih (PerkinElmer Instruments, 2000).

Najprej smo vso potrebno steklovino temeljito oprali pod tekočo vodo, jo sprali z 0,2% HNO₃ in nato še z ddH₂O. Steklovino smo sušili v sušilniku pol ure pri 105°C in jo zaprto shranili do uporabe. Zaradi možnosti kontaminacije je pomembno steklovino očistiti tik pred poskusom.

0,2% HNO₃ smo pripravili tako, da smo v 1 l odpipetirali 3,1 ml 65% HNO₃ (Merck). Potrebno količino 1 M raztopine NH₄Ac (pH = 7) smo pripravili iz 23,90 g NH₄Ac (Merck), ki smo ga raztopili v 310 ml ddH₂O.

Ekstrakte vzorcev tal smo pripravili tako, da smo v steklene čaše zatehtali po 0,5 g suhe prsti in jim dodali po 10 ml 1M raztopine NH₄Ac. Dodatno čašo smo za kontrolo napolnili le z NH₄Ac. Enak postopek priprave smo izvedli še enkrat, le da smo tokrat namesto amonijevega acetata uporabili ddH₂O. Vse steklene čaše smo pokrili s plastično folijo, jih zatesnili z elastiko in jih pri sobni temperaturi (23°C) dve uri stresali na stresalniku (200 rpm). Nato smo vsak vzorec s pomočjo 5 ml brizgalk prefiltrirali skozi 0,44 µm filter (Milipore) v 20 ml epruvete. Le-te smo zatesnili s parafilmom in jih do meritev z AAS (Perkin Elmer Analyst 100) shranili v hladilniku.

4.5 ANALIZE RASTLINSKIH VZORCEV

4.5.1 Določanje celokupnih koncentracij kovin v rastlinskih organih z XRFS

Postopek priprave tabletk in izvajanja meritev je bil enak kot pri talnih vzorcih (glej poglavje 4.4.5). Pred mletjem v mehničnem mlinu je bila potrebna dodatna predhodna priprava rastlinskih vzorcev. Suhe vzorce korenin smo najprej narezali na majhne koščke. Rezilo smo med zamenjavo vzorca očistili z etanolom. Suhe vzorce listov v vrečkah pa smo predhodno fino strli s prsti. Razlika je bila tudi v trajanju mletja. Ker nehomogenost vzorca vpliva na meritve z XRFS, smo trpežne rastlinske vzorce mleli dlje časa (> 30 minut) kot vzorce rizosferne zemlje (8-15 minut). Pri analiziranju spektra rastlinskih vzorcev smo poleg koncentracij kovin Pb, Cd in Zn določili še koncentracijo treh rastlinskih nutrientov K^+ , Ca^{2+} in Fe^{2+} .

4.6 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo zaradi velike heterogenosti onesnaženosti tal v Žerjavu in posledično velike variabilnosti talnih vzorcev med in znotraj ploskev uporabili neparametrične analize. Razlike med celokupnimi, z NH_4Ac in vodo izluženimi koncentracijami kovin v tleh, ostalimi kemijskimi lastnostmi tal in koncentracijami kovin v rastlinskih organih (korenine, listi) med posameznimi ploskvami smo testirali s Kruskal-Wallis ANOVA testom ($p < 0,05$). Vrednosti bioakumulcijskih (BAI) in translokacijskih (TI) indeksov z onesnaženega in neonesnaženega območja smo med sabo primerjali z Mann-Whitney U testom ($p < 0,01$ ali $p < 0,05$). Korelacije med kemijskih lastnosti tal in celokupno ter z NH_4Ac izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn tleh, med kemijskimi lastnostmi tal in koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rastlinskih organih ter korelacije med celokupno koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh, koreninah, listih ive in koncentracijami nutrientov Ca, K in Fe v koreninah, listih ive smo določali s Spearmanovim korelacijskim koeficientom (r_s). Vsem regresijskim analizam smo določali determinacijski koeficient (R^2), ki pove, kolikšen del variabilnosti odvisne spremenljivke lahko razloži variabilnost neodvisne spremenljivke. Za grafičen prikaz odnosa med BAI in celokupno koncentracijo kovine v tleh in odnosa med TI in celokupno koncentracijo kovine v tleh smo podatke predhodno logaritemsko transformirali.

Za statistično analizo podatkov in njihove grafične predstavitev smo uporabili MS Excel 2002 ter programska paketa Statistica (Statsoft 6.0) in SigmaPlot 8.02.

5 REZULTATI

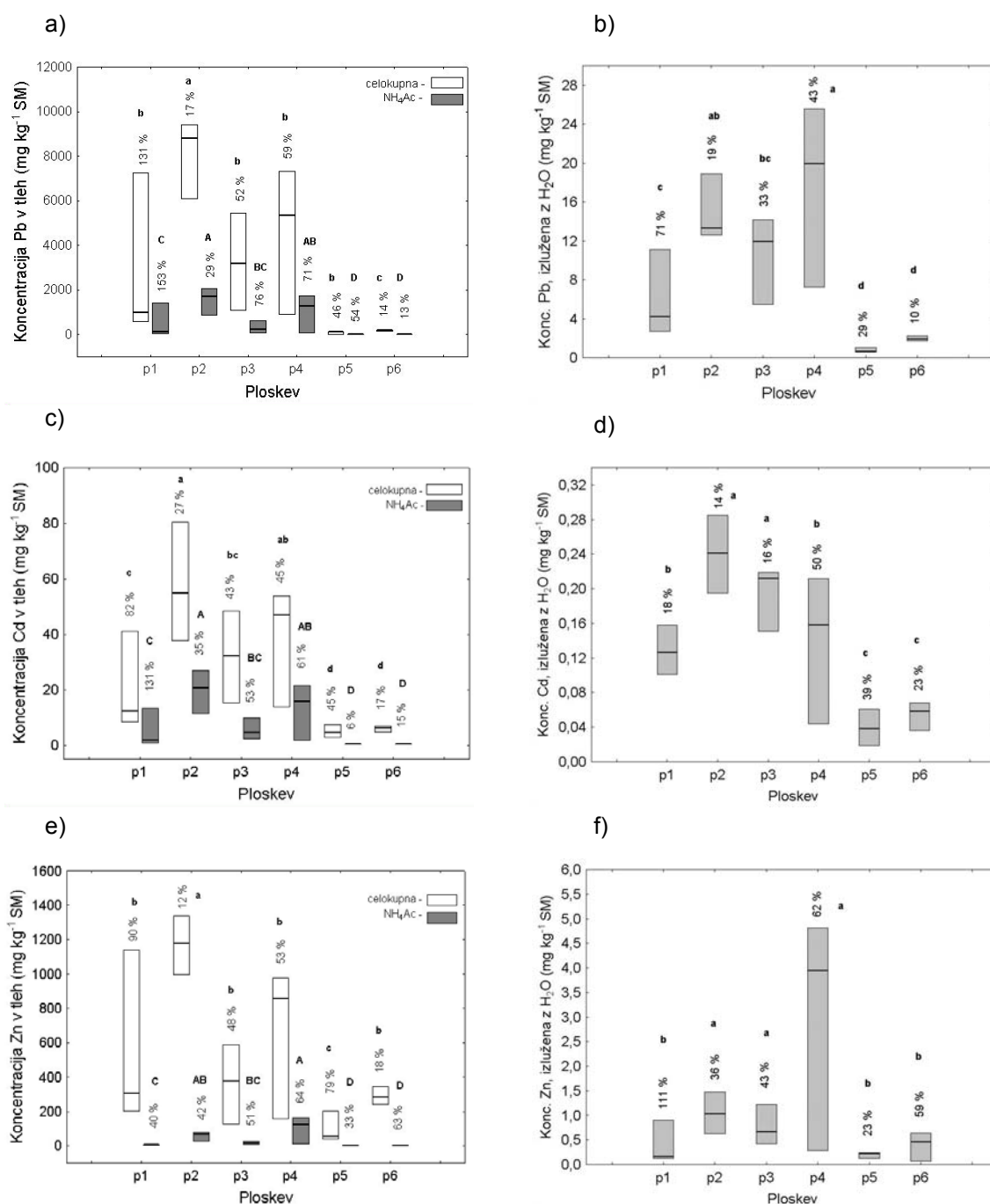
5.1 ANALIZE TAL

5.1.1 Celokupne in z amonijevim acetatom ter vodo ekstrahirane koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v tleh

V rizosfernih tleh ive *S. caprea* na onesnaženem območju v Žerjavu smo v primerjavi z vzorci rizosfernih tal z neonesnaženega območja na Pokljuki izmerili močno povečane celokupne koncentracije kovin Pb, Cd in Zn. Razlike so bile razen v primeru Zn značilne ($p < 0,05$) (sl. 14). Razponi izmerjenih celokupnih koncentracij kovin na onesnaženih tleh kažejo na preseženost zakonsko določenih kritičnih imisijskih vrednosti (tab. 3). Koncentracije prav tako, tudi v primeru Cd na neonesnaženih tleh na Pokljuki, znatno presegajo vrednosti za neonesnažena tla po svetu (tab. 3). Koncentracije talnih vzorcev s ploskev z različno oddaljenostjo od vira onesnaženja v Žerjavu ne kažejo trenda upadanja koncentracije kovin z večanjem oddaljenosti od dimnikov (sl. 14). Najbolj obremenjena s Pb, Cd in Zn je ploskev P2. Variabilnost koncentracij kovin v vzorcih s P1 je bila zelo velika (sl. 14). Natančnejši podatki o celokupnih koncentracijah kovin Pb, Cd in Zn so prikazani na sl. 14, tab. 3 in v prilogah A1, A2, A3 in B.

Tabela 3: Primerjava razponov izmerjenih koncentracij kovin v rizosfernih tleh ive *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu in neonesnaženega območja na Pokljuki z mejnimi, opozorilnimi in kritičnimi imisijskimi vrednostmi za kovine Pb, Cd in Zn podane v Ur. l. RS 68/96 in vrednostmi za neonesnažena tla po svetu (* Adriano, 2001). Vse vrednosti so podane v mg kg^{-1} suhe mase (SM) tal.

	Pb	Cd	Zn
Žerjav – naše meritve	592-10900	8,5-141	125-1840
Pokljuka – naše meritve	18-191	2,8-6,9	38,5-344
Mejna vrednost	85	1	100
Opozorilna vrednost	100	2	150
Kritična vrednost	530	12	380
Neonesnažena tla *	10-150	< 1	60-300



Slika 14: Celokupna (beli stolpci; XRFs) in z NH₄Ac izlužena (sivi stolpci; FAAS) (sl. a, c, e) ter z H₂O izlužena (sl. b, d, f) koncentracija kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive *S. caprea* na vzorčnih ploskvah P1-P6 (P1-P4 – onesnaženo, P5-P6 – neonesnaženo). Stolpci prikazujejo razpon (minimalna, maksimalna vrednost) izmerjenih vrednosti z medianami (črna linija v stolpcu). Vrednosti nad stolpci pomenijo koeficient variacije (KV %), črke (a,b,c,d – primerjava korenin, A,B,C,D – primerjava listov) pa označujejo statistično značilne razlike med ploskvami (Kruskal-Wallis ANOVA test), $p < 0,05$. $n = 4-5$. Različne črke označujejo ploskve, med katerimi obstajajo statistično značilne razlike.

Z vodno ekstrakcijo in ekstrakcijo z amonijevim acetatom (NH₄Ac) smo skušali oceniti rastlinam dostopno frakcijo kovin v vzorčnih tleh. Izmerjene koncentracije kovin Pb, Cd in Zn, izluženih z vodo ali z NH₄Ac so bile znatno nižje v primerjavi z celokupnimi koncentracijami kovin (sl.14, tab. 4), koncentracije v vodnih ekstraktih pa tudi očitno nižje od koncentracij kovin, izluženih z NH₄Ac (sl.14, tab. 4). V nadaljevanju zato pri analizah kovin v rastlinah koncentracij iz vodnih ekstraktov ne uporabljamo. Obe vrsti ekstraktov kovin kažeta, da so kovine Pb, Cd in Zn v splošnem bolj dostopne za rastline (vrednosti razponov koncentracij so višje) na onesnaženem območju in da koncentracije izluženih kovin padajo v vrstnem redu Cd > Pb > Zn (sl. 14, tab. 4). Tudi pri koncentracijah kovin, izluženih z NH₄Ac in z vodo, se v splošnem kaže velika variabilnost med vzorci iste vzorčne ploskve, z največjo variabilnostjo na P1 (sl. 1). Natančnejši podatki so podani v prilogah A1, A2, A3 in B.

Tabela 4: Razponi z vodo (H₂O) in amonijevim acetatom (NH₄Ac) izluženih koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu in z neonesnaženega območja na Pokljuki, izraženi v odstotkih ustrežajoče celokupne koncentracije kovine.

Ekstr. sredstvo	Razpon izlužene koncentracije kovine v tleh			
	ddH ₂ O		NH ₄ Ac	
	Žerjav	Pokljuka	Žerjav	Pokljuka
Pb (%)	0,14-0,79	0,51-5,95	6,3 - 28,9	1,5 - 14,2
Cd (%)	0,32-1,54	0,51-1,22	10,7 - 40,0	4,0 - 12,7
Zn (%)	0,05-0,56	0,07-0,44	0,4 - 16,8	0,3 - 4,7

Odnos med celokupno koncentracijo kovine v tleh in koncentracijo kovine, izluženo z NH₄Ac, smo raziskali z regresijsko analizo za preprosto potenčno, eksponentno, logaritemsko in linearno funkcijo. Analiza je pokazala, da odnos med celokupno koncentracijo kovine v tleh in koncentracijo kovine, izluženo z NH₄Ac, v primeru vseh treh kovin najboljše opiše linearna funkcija, odnos med celokupno koncentracijo kovine v tleh in z vodo izluženo koncentracijo kovine pa potenčna funkcija (tab. 5). Znatno nižji determinacijski koeficient (R^2) v primeru Zn pomeni, da variabilnost celokupne koncentracije Zn v tleh slabo razloži variabilnost koncentracije kovin, izlužene z NH₄Ac oz. z H₂O.

Tabela 5: Rezultati regresijskih analiz za odnos med celokupno in z amonijevim acetatom (NH₄Ac) izluženo oz. z vodo (H₂O) izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive *S. caprea*. n = 26-28, nz = neznačilno.

	Funkcija	R ²	p
Pb: celokupna - NH₄Ac	y = 0,191x - 54,84 ; linearna	0,89	p < 0,001
Cd: celokupna - NH₄Ac	y = 0,318x - 1,35 ; linearna	0,93	p < 0,001
Zn: celokupna - NH₄Ac	y = 0,063x - 3,97 ; linearna	0,45	p < 0,01
Pb: celokupna - H₂O	y = 0,161 x ^{0,52} ; potenčna	0,82	p < 0,001
Cd: celokupna - H₂O	y = 0,023 x ^{0,57} ; potenčna	0,85	p < 0,001
Zn: celokupna - H₂O	y = 0,016 x ^{0,67} ; potenčna	0,27	nz

5.1.2 Vpliv nekaterih kemijskih lastnosti tal na privzem kovin v rastlino

Na dostopnost kovin za rastline in s tem na obseg njihovega privzema pomembno vplivajo kemijske lastnosti tal. Nekateri izmerjeni kemijske lastnosti tal, podane ločeno za vzorčne ploskve, smo strnili v sumarično tabelo, ki je v prilogi B. pH tal je bil na onesnaženih in neonesnaženih ploskvah podoben – rahlo alkalen (mediana: 7,5-7,65), le talni vzorci s P4 so bili značilno različni (mediana: 7,38). Na onesnaženem območju je bila vsebnost organske snovi zelo visoka na P3 in P4 (do 52,4 % tal), najnižja pa na P1 (do 8,51 %). Med vsemi onesnaženimi ploskvami je bila na P1 izmerjena najnižja vsebnost dušika (p < 0,05), zelo nizka koncentracija fosfata (p < 0,05) in visoka koncentracija Ca in K (p < 0,05). Na najbolj onesnaženi ploskvi P2 so bile koncentracije fosfata in Fe najvišje (p < 0,05).

Natančnejše podatke o medsebojni povezanosti nekaterih kemijskih lastnosti tal z koncentracijami kovin Pb, Cd in Zn v tleh smo dobili z izračunom Spearmanovih korelacijskih koeficientov, ki so podani v tabeli 6. S koncentracijami Pb, Cd in Zn v tleh z visoko stopnjo statistične značilnosti pozitivno korelirata dušik (N-NH₄, N-NO₃) in fosfat (P-PO₄) v tleh (p < 0,001), negativno pa Ca. Za vsebnost organske snovi, pH, koncentracij K in Fe nismo našli statistično značilnih korelacij (tab. 6).

Tabela 6: Korelacije med nekaterimi kemijskimi lastnostmi tal in celokupno ter z NH_4Ac izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ive *S. caprea*. Podani so Spearmanovi korelacijski koeficienti z označeno pripadajočo statistično značilnostjo ($n = 29$).

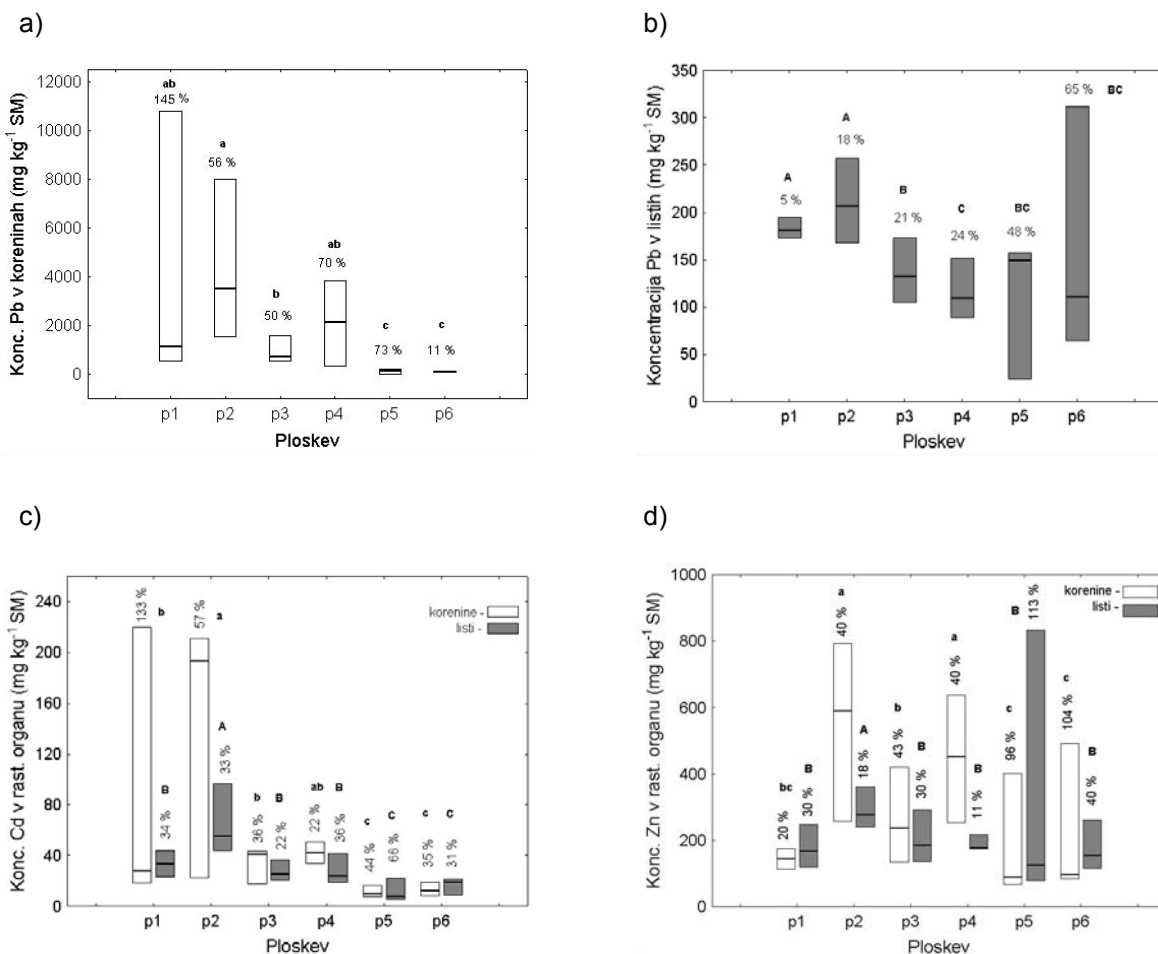
	Pb tla	Pb NH_4Ac	Cd tla	Cd NH_4Ac	Zn tla	Zn NH_4Ac
organska snov	nz	nz	nz	0,39*	nz	nz
N-NH_4	0,75***	0,72***	0,75***	0,80***	0,58**	0,80***
N-NO_3	0,60***	0,62***	0,62***	0,66***	nz	0,69***
P dostopni	0,68***	0,65***	0,78***	0,75***	0,63***	0,64***
pH (H_2O)	nz	nz	nz	nz	nz	nz
Ca	-0,59**	-0,59**	-0,64***	-0,64***	-0,48*	-0,54**
K	nz	nz	nz	nz	nz	-0,44*
Fe	nz	nz	nz	nz	nz	nz

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, nz – neznačilno, ostale korelacije so neznačilne

5.2 ANALIZE RASTLINSKIH ORGANOV

5.2.1 Koncentracije kovin v rastlinskih organih vrste *Salix caprea*

Koncentracije kovin Pb, Cd in Zn smo z metodo XRFS določali v koreninah in listih rastlin *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu in neonesnaženega območja na Pokljuki. Rezultate prikazuje sl. 15 in tab. 7.



Slika 15: Razponi z XRFS določenih koncentracij (mg kg⁻¹ SM) kovin Pb (2a, 2b), Cd (2c) in Zn (2d) v koreninah oz. listih ive *S. caprea* nabranih na vzorčnih ploskvah P1-P6 (P1-P4 – onesnaženo, P5-P6 – neonesnaženo). Stolpci prikazujejo razpon (minimalna, maksimalna vrednost) izmerjenih vrednosti z medianami (označena s črto). Vrednosti nad stolpci pomenijo koeficient variacije (KV %), črke (a,b,c,d – primerjava korenin, A,B,C,D – primerjava listov) pa označujejo statistično značilne razlike med ploskvami (Kruskal-Wallis ANOVA test), $p < 0,05$. $n = 4-5$. Različne črke označujejo ploskve, med katerimi obstajajo statistično značilne razlike.

Tabela 7: Razponi z XRFs določenih koncentracij (mg kg^{-1} SM) kovin Pb, Cd in Zn v koreninah oz. listih ive *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu in z neonesnaženega območja na Pokljuki s pripadajočimi koeficienti variacije (KV).

	Razpon koncentracije kovine pri <i>S. caprea</i> z Žerjava		Razpon koncentracije kovine pri <i>S. caprea</i> z Pokljuke	
	Korenine	Listi	Korenine	Listi
Pb	332 - 10800	88,8 - 257	22,3 - 203	24 - 312
Cd	17,5 - 220	19,1 - 96,8	7,3 - 18,8	5,8 - 22,2
Zn	114 - 793	120 - 361	67,1 - 491	79 - 834

V koreninah dreves z onesnaženega območja v Žerjavu smo izmerili najvišje koncentracije Pb, sledil jim je Zn, najnižje pa so bile koncentracije Cd (sl. 15, tab. 7). Koncentracije Pb, Cd in Zn so bile značilno višje v koreninah z vseh onesnaženih ploskev kot pa v koreninah z neonesnaženih ploskev (sl. 15; $p < 0,05$). Najvišje (statistično značilno $p < 0,05$, razen za Zn) so bile koncentracije Pb, Cd in Zn v koreninskih vzorcih z najbolj onesnažene ploskve P2. Visok koeficient variacije (KV) za Pb v koreninah s P1-P4 in za Cd v koreninah s P1 in P2 kaže na veliko lokalno variabilnost vzorcev (sl. 15). Presenetljiva je visoka variabilnost za Zn na neonesnaženih ploskvah.

Vrednosti razponov koncentracij kovin Pb, Zn in Cd v listih dreves iva *S. caprea* z onesnaženega območja so sledili vrstnemu redu $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cd}$. Le v primeru Cd smo izmerili značilno različne – višje koncentracije v listih rastlin z onesnaženega območja v primerjavi z listi dreves s Pokljuke (sl. 15; $p < 0,05$). Razlike koncentracij v listih vrb z onesnaženih in neonesnaženih ploskev za Pb in Zn niso bile značilne (sl. 15). Koncentracije v listih z onesnaženega območja so bile za Cd in Zn najvišje na najbolj onesnaženi ploskvi P2 (značilno, $p < 0,05$), za Pb pa na ploskvah P1 in P2 (značilno, $p < 0,05$) (sl. 15). Primerljiva koncentracija Pb v listih z najmanj (P1) in najbolj (P2) onesnažene ploskve je lahko rezultat zaprašenih neopranih listov iz bližnje okolice dimnikov. KV je za koncentracije kovin v listih z onesnaženega območja v splošnem za vse kovine manjši od KV za koncentracije v koreninah in je relativno nizek (sl. 15). Tudi v primeru listov je opazna visoka variabilnost za Zn na neonesnaženih ploskvah.

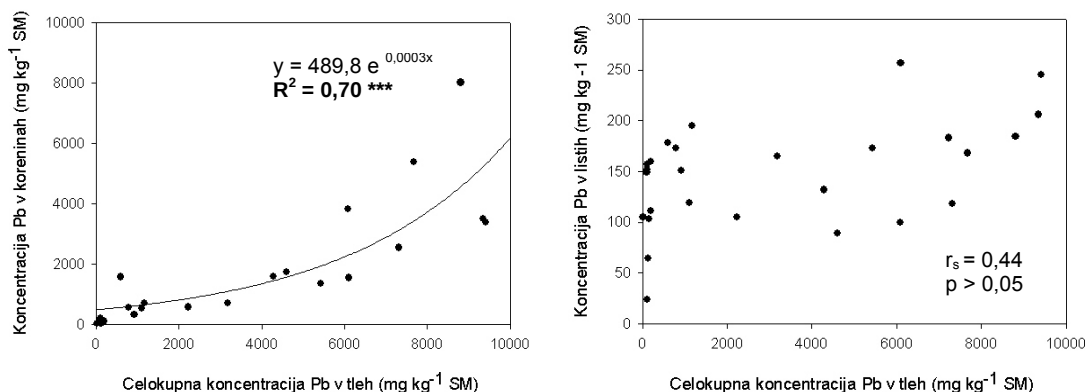
Natančnejši podatki o koncentracijah kovin v koreninah in listih so prikazani na sl. 15 in prilogah A1, A2, A3 in B.

5.2.2 Strategije privzema kovin v rastlinske organe

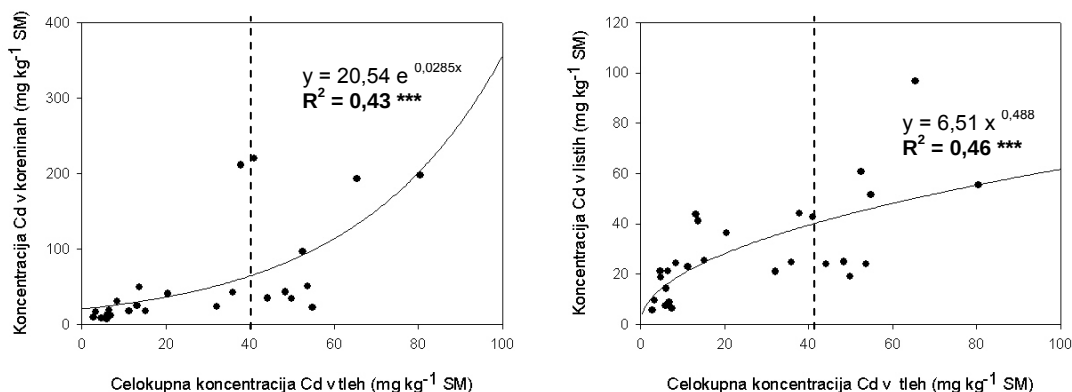
Strategijo privzema posamezne kovine v rastlino smo določali dvostopenjsko: iskanju korelacij (Spearmanov korelacijski koeficient = r_s), če so le-te bile značilne, je sledilo iskanje regresijskega modela, ki najbolje opiše odnos med celokupno koncentracijo kovine v tleh in njeno koncentracijo v rastlinskem organu (koreninah, listih). Podatkov "osamelcev" pri tem nismo upoštevali. Podatki meritev in "osamelci" za posamezen model so podani v prilogah A1, A2 in A3, korelacijski koeficienti pa v prilogi D.

Strategijo privzema smo določali tako na osnovi celokupnih (sl. 16) kot tudi na osnovi z NH_4Ac izluženih (sl. 17) koncentracij kovin v tleh. Regresijske krivulje, ki so najbolje opisale proučevan odnos so bile za posamezno kovino in rastlinski organ na osnovi celokupnih in na osnovi z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin v tleh istovrstne. Razlika je le v malo višjih determinacijskih koeficientih (R^2) v primeru proučevanega odnosa za Cd in Zn na osnovi koncentracij kovin, izluženih z NH_4Ac (sl. 16 in sl. 17).

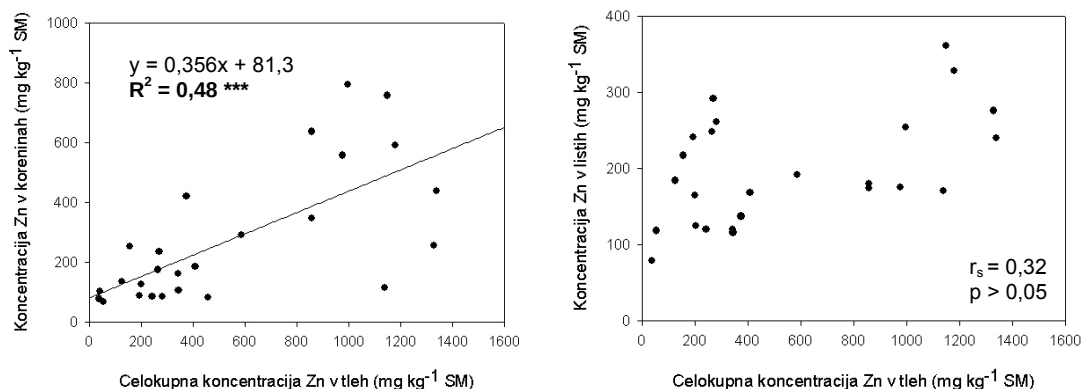
a)



b)



c)



Slika 16: Odnos med koncentracijo Pb (a), Cd (b), Zn (c) v rastlinskih organih (koreninah, listih) ive *S. caprea* in celokupno koncentracijo Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh ($n = 26-28$). Grafi brez regresije imajo neznačilen Spearmanov korelacijski koeficient (r_s). Črtna črta označuje približno mejo med manj (P1, P3) in zelo onesnaženimi ploskvami (P2, P4) na onesnaženem območju v Žerjavu. Koncentracije kovin so bile določene z metodo XRFs. Točko določa par podatkov dveh spremenljivk (koncentracija kovine v tleh in koncentracija kovine v rastlinskem organu) vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1).*** $p < 0,001$

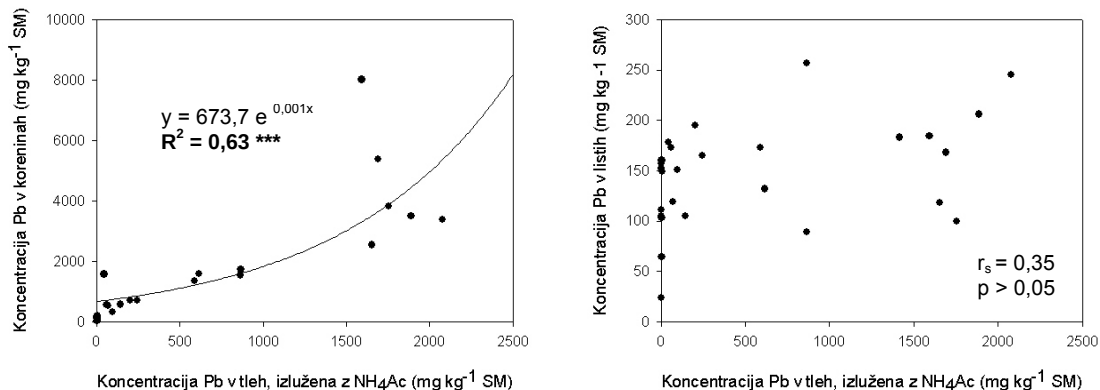
Koncentracija Pb v koreninah je eksponentialno naraščala s celokupno koncentracijo Pb v tleh ($R^2 = 0,70$), med koncentracijo Pb v listih in celokupno koncentracijo Pb v tleh pa nismo našli statistično značilne korelacije ($r_s = 0,40$; $p > 0,05$) (sl. 3a). To potrjuje tudi dejstvo, da se večina točk na sl. 16a (za liste) preko velikega koncentracijskega območja celokupne koncentracije Pb v tleh nahaja v relativno ozkem vodoravnem pasu (med 100 in 200 mg Pb kg⁻¹ v listih) kljub zelo velikim spremembam koncentracij Pb v koreninah (c. 500-5000 mg Pb kg⁻¹ v koreninah). To kaže na funkcijsko neodvisnost med koncentracijo Pb v tleh in koncentracijo Pb v listih *S. caprea*.

Odnos med celokupno koncentracijo Cd v tleh in koncentracijo Cd v koreninah je dobro opisal statistično značilen regresijski model eksponentne funkcije ($R^2 = 0,43$; $p < 0,001$), odnos med celokupno koncentracijo Cd v tleh in koncentracijo Cd v listih ive pa statistično značilen regresijski model potenčne funkcije ($R^2 = 0,48$; $p < 0,001$) (Sl. 16b). Celokupna koncentracija Cd v tleh okoli 35 mg kg⁻¹ SM (približna meja med manj (P1, P3) in zelo onesnaženimi ploskvami (P2, P4) v Žerjavu) se je izkazala za neko mejno točko, od katere naprej z naraščanjem koncentracije Cd v tleh koncentracija Cd v koreninah hitro narašča, koncentracija Cd v listih pa se le počasi zvišuje (sl. 16b).

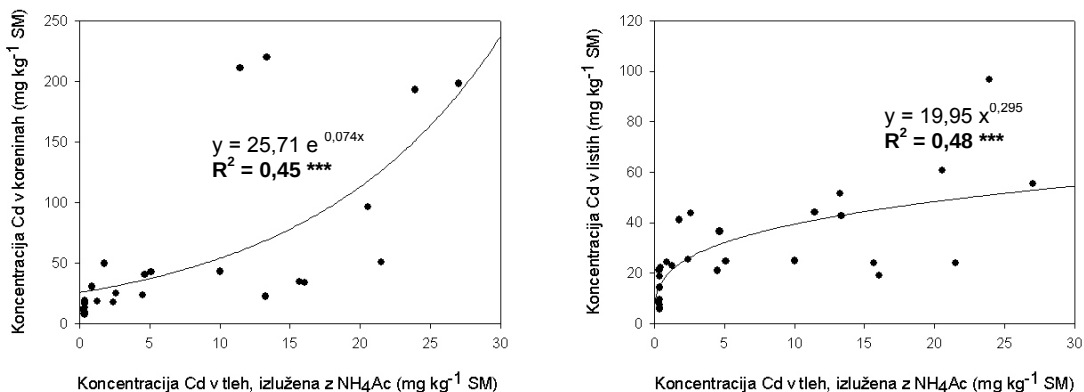
Koncentracija Zn v koreninah ive je statistično značilno linearno naraščala s celokupno koncentracijo Zn v tleh ($R^2 = 0,52$; $p < 0,001$), medtem ko med koncentracijo Zn v listih in

celokupno koncentracijo Zn v zemlji nismo našli statistično značilne korelacije ($r_s = 0,32$; $p > 0,05$) (sl. 16c).

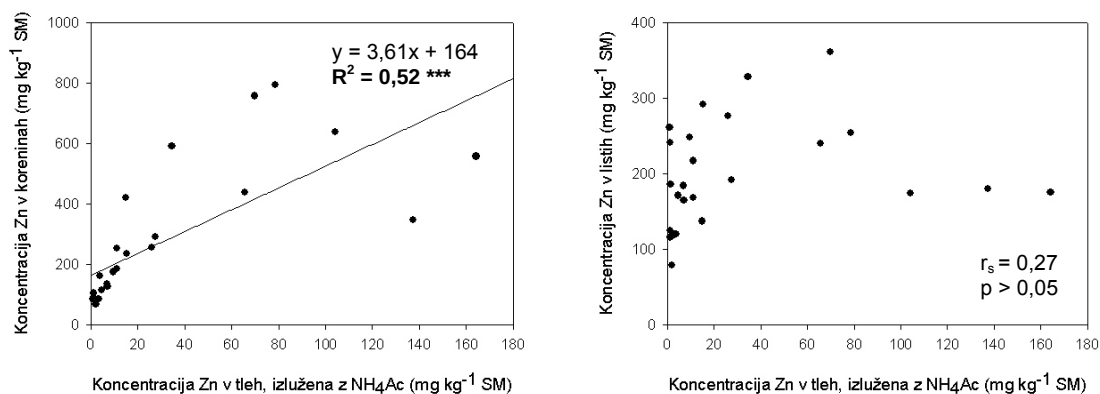
a)



b)



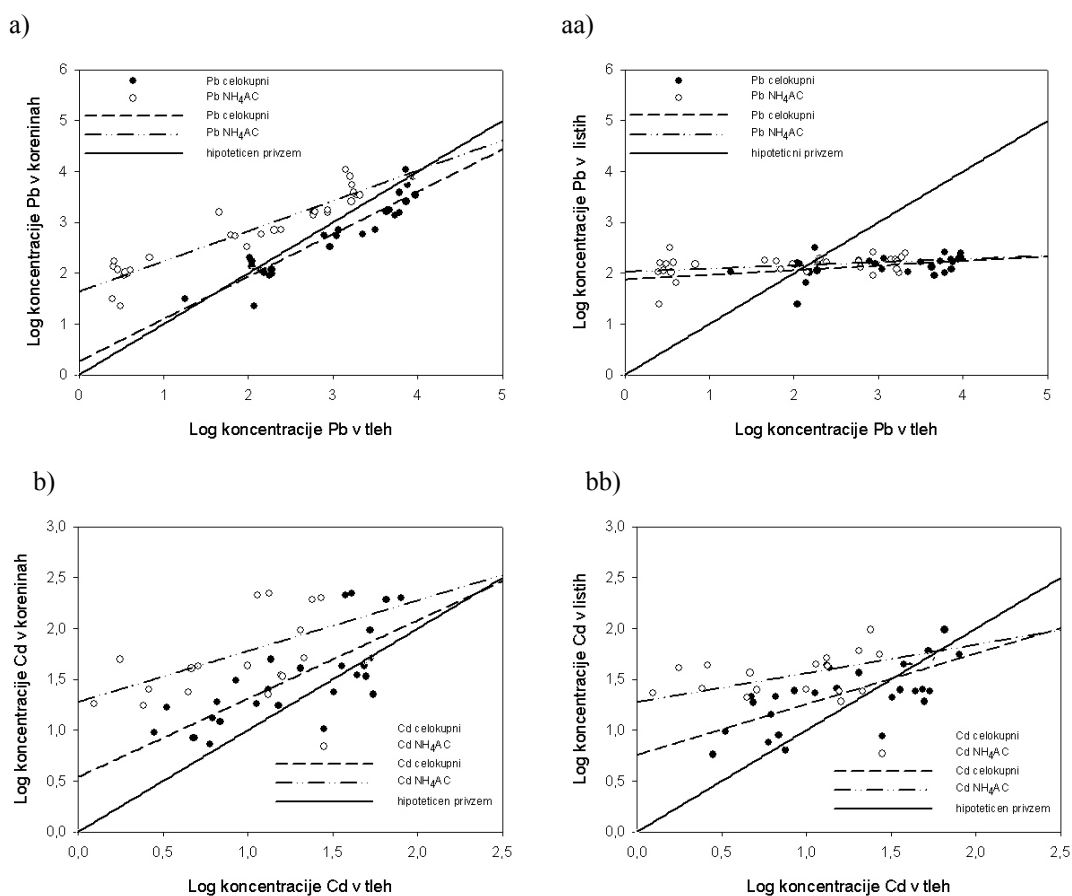
c)

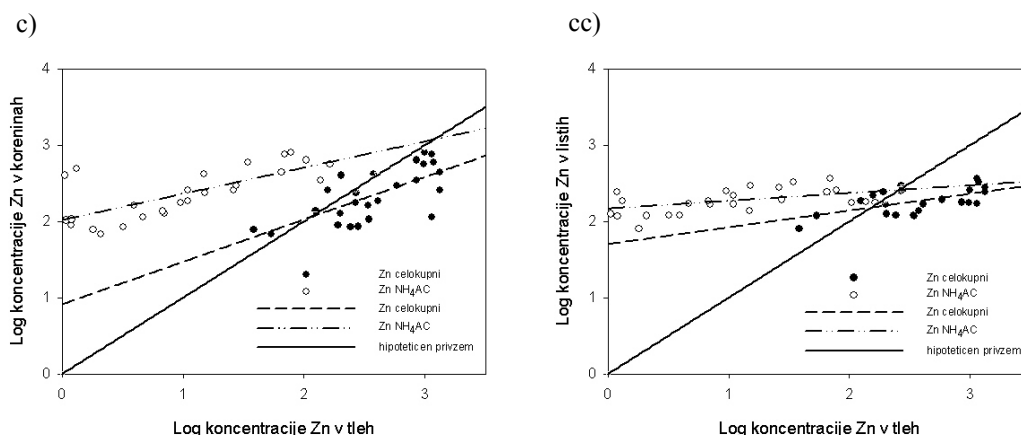


Slika 17: Odnos med koncentracijo Pb (a), Cd (b), Zn (c) v rastlinskem organu (koreninah, listih) ive *S. caprea*, določeno z metodo XRFS in koncentracijo Pb, Cd in Zn, izluženo z NH₄Ac, ki smo jo izmerili z FAAS (n = 26-28). Grafi brez regresije imajo neznačilen Spearmanov korelacijski koeficient (r_s). Točko določa par podatkov dveh spremenljivk (koncentracija kovine v tleh in koncentracija kovine v rastlinskem organu) vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1). *** $p < 0,001$.

5.2.3 Ovrednotenje uspešnosti ekstrakcijskega sredstva amonijevega acetata za oceno biodostopnosti kovin v tleh

Primernost z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin v tleh za oceno dostopnosti kovin rastlini smo skušali oceniti tako, da smo regresijske premice logaritmiranih vrednosti za odnos med koncentracijo kovine (celokupne, z NH_4Ac izlužene) v tleh in koncentracijo kovine v rastlinskem organu nestatistično primerjali s teoretično hipotetično premico z naklonom 45° . Ta premica predstavlja hipotetičen privzem kovine v rastlino, t.j. rastlina privzame iz tal ravno toliko kovine, kolikor je je koreninam na razpolago.





Slika 18: Primerjava regresijskih premic za odnos med logaritmiranimi vrednostmi koncentracije kovine (celokupne ali izlužene z NH_4Ac) v tleh in koncentracijo kovine v rastlinskem organu s hipotetično premico (neprekinjena črta) z naklonom 45° , ki predstavlja hipotetičen privzem kovine v rastlino (t.j. rastlina privzame iz tal ravno toliko kovine, kolikor je je koreninam na razpolago). Točko določa par podatkov dveh spremenljivk vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1).

Regresijske premice na osnovi celokupnih koncentracij kovin se z izjemo Pb v listih (sl. 18a-c in 18bb, cc) bolje približajo hipotetični premici za privzem kovine v rastlino kot pa regresijske premice na osnovi z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin. Od premice »hipotetičnega privzema« bolj odmaknjene regresijske premice v primeru z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin pomenijo, da ekstrakcija z NH_4Ac ni boljša za merilo dostopnosti kovin za rastlino kot je celokupna koncentracija kovine v tleh.

5.2.4 Porazdeljevanje kovin in sposobnost kopičenja kovin v rastlinskih organih vrste *Salix caprea*

5.2.4.1 Bioakumulacijski indeks (BAI)

Z izračunom bioakumulacijskih indeksov (BAI), t.j. razmerjem med koncentracijo kovin v koreninah/listih rastline in celokupno koncentracijo kovine v rizosfernih tleh oz. koncentracijo kovin v tleh, izluženo z NH_4Ac (BAI- NH_4Ac), smo dobili informacijo o relativnem privzemu oz. kopičenju kovin v koreninah/listih. BAI nam namreč pove, za kakšen faktor se razlikujejo koncentracije kovine v rastlinskih organih od koncentracije kovine v tleh. Podatki so podani v tab. 8.

Vrednosti BAI so bile višje za Pb, Cd in Zn v koreninah in listih rastlin z neonesnaženega območja, vendar so razlike bile značilne (Pb: $p < 0,01$; Cd, Zn: $p < 0,05$) le v primeru

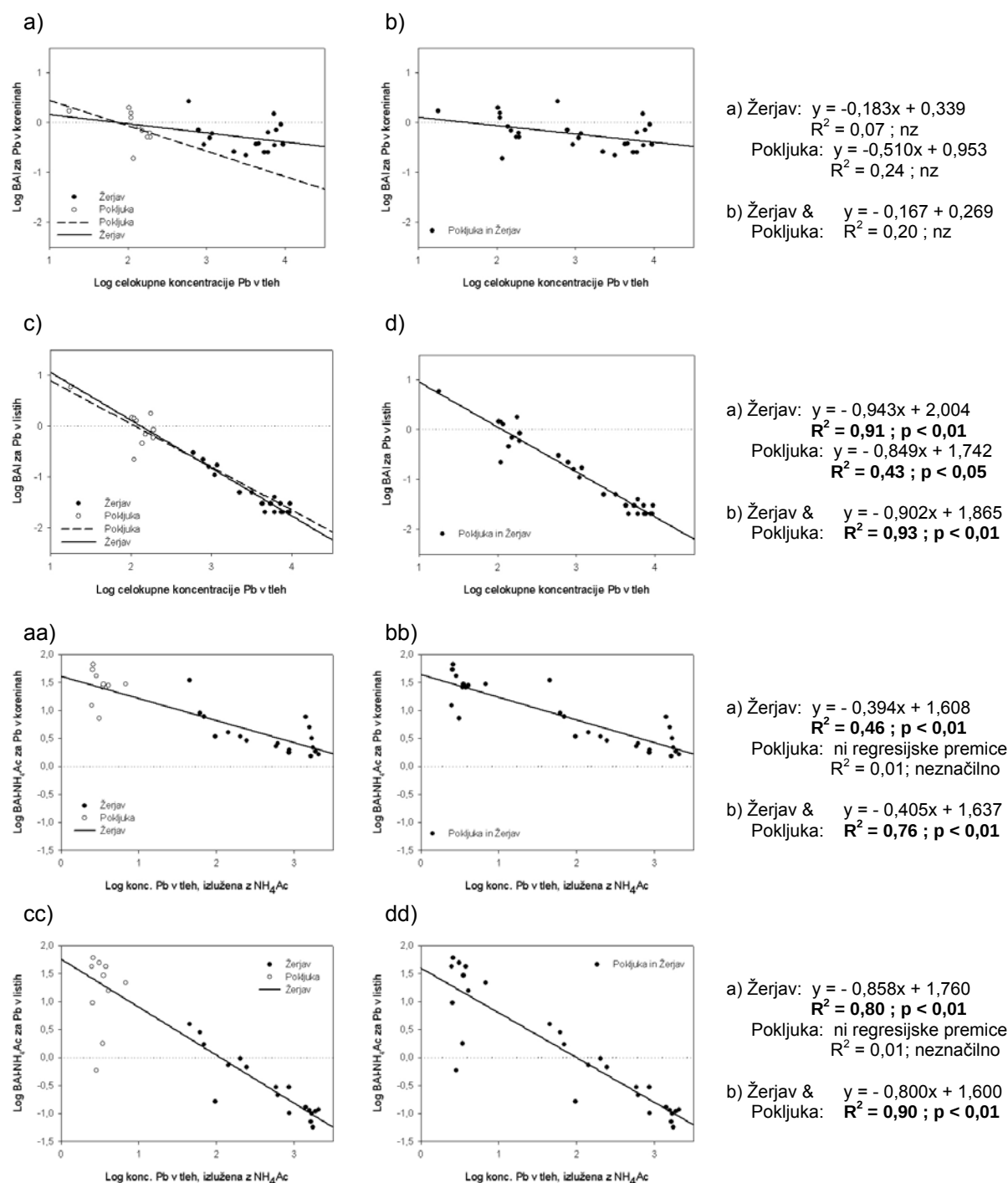
listov (tab. 8). Primerjava vrednosti BAI za določeno kovino v koreninah in med BAI za to kovino v listih na onesnaženem območju kaže višje vrednosti BAI za korenine tako za Pb, Cd in Zn, podobna primerjava za neonesnaženo območje pa višje vrednosti BAI za liste vseh treh kovin. Na onesnaženem območju so vrednosti BAI za kovine v koreninah in listih padali v smeri $Cd > Zn > Pb$. Enako velja tudi za vrednosti BAI za kovine v koreninah z neonesnaženega območja (tab. 8).

Tabela 8: Mediane, minimalne(min) in maksimalne (maks) vrednosti za bioakumulacijske indekse (BAI) kovin Pb, Cd in Zn izračunane ločeno za rastline ive *S. caprea* z onesnaženega rastišča v Žerjavu (n = 7-10) in neonesnaženega rastišča na Pokljuki (n = 18). KV označuje koeficient variacije (%). Mann-Whitney U test; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, nz – neznačilno.

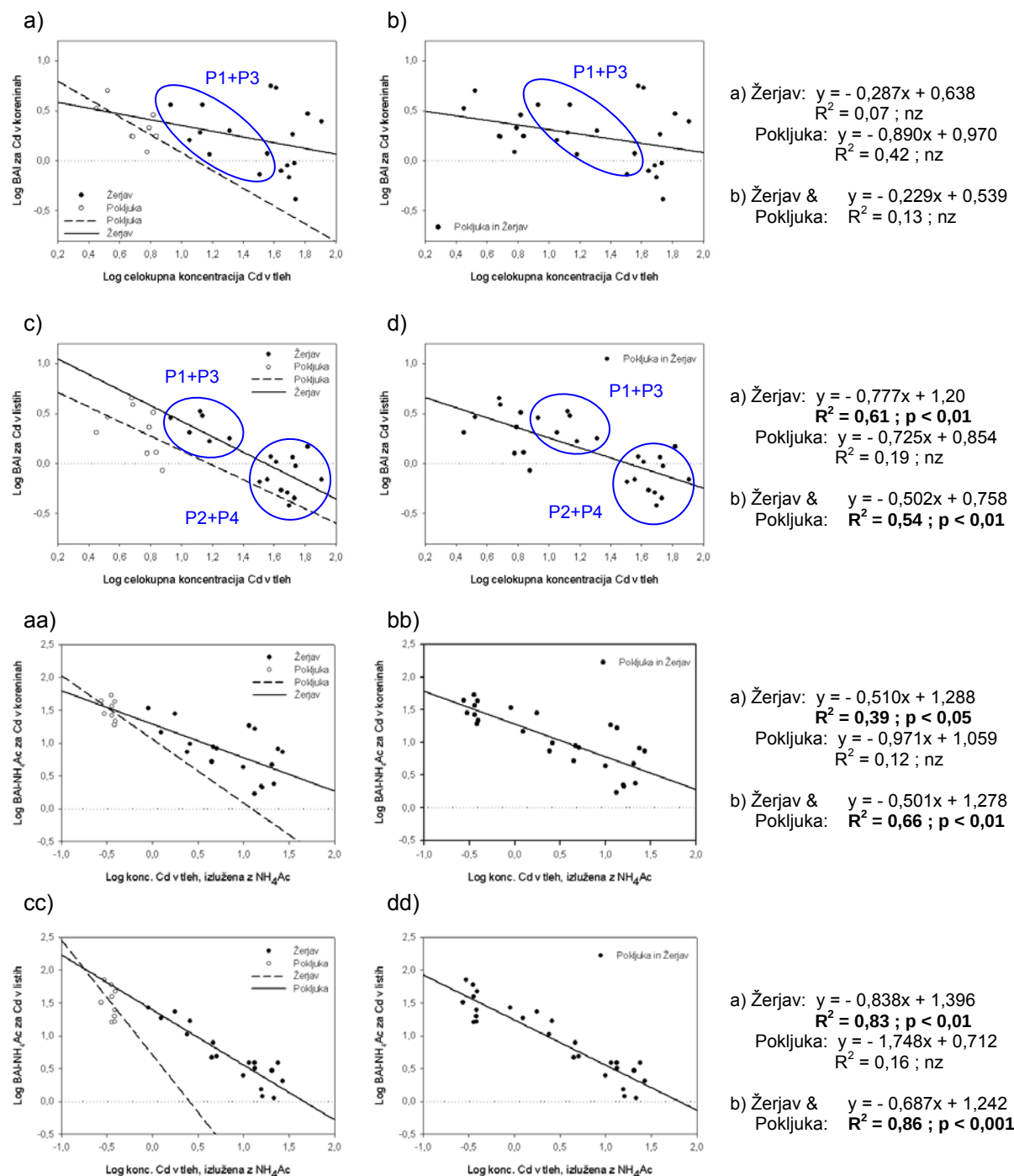
		ŽERJAV - onesnaženo				POKLJUKA - neonesnaženo				p
		Mediana	Min	Maks	KV %	Mediana	Min	Max	KV %	
Korenine	BAI Pb	0,38	0,22	2,65	94%	0,76	0,19	1,97	61%	nz
	BAI Cd	1,72	0,41	5,58	75%	1,94	1,22	5,00	50%	nz
	BAI Zn	0,54	0,10	1,61	57%	0,85	0,30	2,50	80%	nz
Listi	BAI Pb	0,03	0,02	0,30	112%	1,07	0,22	5,83	111%	**
	BAI Cd	1,10	0,38	3,32	68%	2,31	0,85	4,47	50%	*
	BAI Zn	0,32	0,15	1,47	85%	0,93	0,34	2,19	66%	*

Z regresijsko analizo smo ugotavljali vpliv povišanja celokupne talne koncentracije kovin na BAI oz. vpliv povišanja z NH_4Ac izlužene koncentracije kovin na BAI- NH_4Ac (sl. 19, 20, 21). Neposredna statistična primerjava naklonov regresijskih premic (sposobnosti kopičenja kovin) med rastlinami z onesnaženega in neonesnaženega območja zaradi dveh koncentracijsko povsem ločenih skupin podatkov ni možna. Da bi iz opravljenih meritev kljub temu dobili vsaj kako informacijo o trendih sposobnosti kopičenja kovin med rastlinami z onesnaženega in neonesnaženega območja, smo za vsako kovino v koreninah/listih naredili dvojno regresijsko analizo, za BAI oz. BAI- NH_4Ac ločeno z onesnaženega in neonesnaženega območja ter za BAI oz. BAI- NH_4Ac združeno z obeh območij, in regresijske linije nato med sabo nestatistično primerjali.

Sl. 19 a-d kaže, da so vrednosti BAI za Pb večine vzorcev korenin in listov dreves tako z onesnaženega kot neonesnaženega območja < 1 . Nakloni premic na sl. 19a,b in sl. 19c,d nakazujejo majhno odvisnost BAI za Pb v koreninah in veliko odvisnost BAI za Pb v listih od celokupne koncentracije Pb v tleh ($p < 0,01$ in $p < 0,05$). Primerjava premic na sl. 19c in sl. 19d nakazuje, da med populacijo dreves z onesnaženega in neonesnaženega območja verjetno ni razlik v sposobnosti privzema in kopičenja Pb v listih ive.



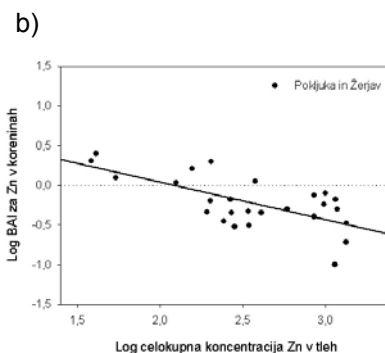
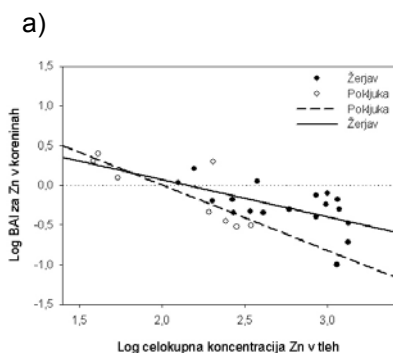
Slika 19: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Pb v tleh (sl. a-d) oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Pb v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH_4Ac frakcije ($BAI-NH_4Ac$) in z NH_4Ac izluženo koncentracijo Pb v tleh (Sl. aa-dd). Vrednosti so logaritemsko transformirane. Pikčasta črta označuje vrednost $BAI = 1$, neznačilno. Točko določa par podatkov dveh spremenljivk vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1). nz = statistično neznačilno.



Slika 20: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Cd v tleh (sl. a-d) oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Cd v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH₄Ac frakcije (BAI-NH₄Ac) in z NH₄Ac izluženo koncentracijo Cd v tleh (Sl. 20 aa-dd). Vrednosti so logaritemsko transformirane. Pikčasta črta označuje vrednost BAI = 1. Točko določa par podatkov dveh spremenljivk vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1). Točke v množici P1+P3 pripadajo manj onesnaženim, točke v množici P2+P4 pa zelo onesnaženim vzorčnim ploskvam z onesnaženega območja v Žerjavu. Log (35 mg Cd kg⁻¹ SM tal) = 1,54. nz = statistično neznačilno.

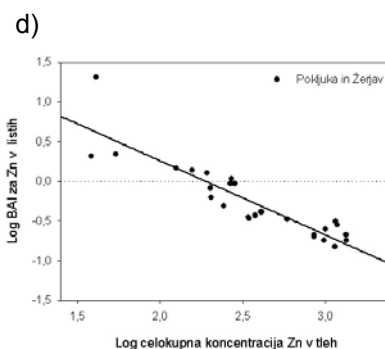
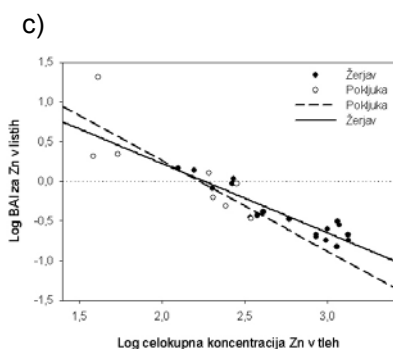
Kopičenje Cd v koreninah in listih rastlin je bolj učinkovito od Pb, saj je velik del vrednosti BAI vseh vzorcev > 1 (sl. 20 a-d). Odstopajo le BAI za Cd v listih rastlin z bolj onesnaženih ploskev v Žerjavu (P2, P4). BAI za liste rastlin z manj onesnaženih ploskev (P1, P3) v Žerjavu so se očitno oddelile od BAI za Cd v listih rastlin z bolj onesnaženih rastišč (sl. 20c,d), vendar razlike med BAI za liste s P1+P3 in BAI za liste s P2+P4 niso bile značilne ($BAI_{P1+P3} = 1,67$ (mediana), $BAI_{P2+P4} = 0,94$ (mediana); $p = 0,21$, Mann-Whitney U test). Med BAI za Cd v listih rastlin z onesnaženega območja se blizu koncentracije $35 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ SM}$ ($\log 35 = 1,54$) tal nakazuje neka meja. Primerjava regresijskih premic med sl. 20c in sl. 20d kaže na možno večjo sposobnost kopičenja Cd pri populaciji rastlin z onesnaženega območja (višje ležeča s premico za neonesnaženo območje vzporedna regresijska premica za Žerjav).

Na sl. 21 a-d leži večina vrednosti BAI za Zn vseh vzorcev korenin in listov pod vrednostjo $BAI = 1$. Regresijske premice so bile značilne za BAI v koreninah in za BAI v listih ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). Primerjava premic med sl. 21a in 21b ter sl. 21c in 21d nakazuje, da med populacijo dreves z onesnaženega in neonesnaženega območja verjetno ni razlik v sposobnosti privzema Zn.



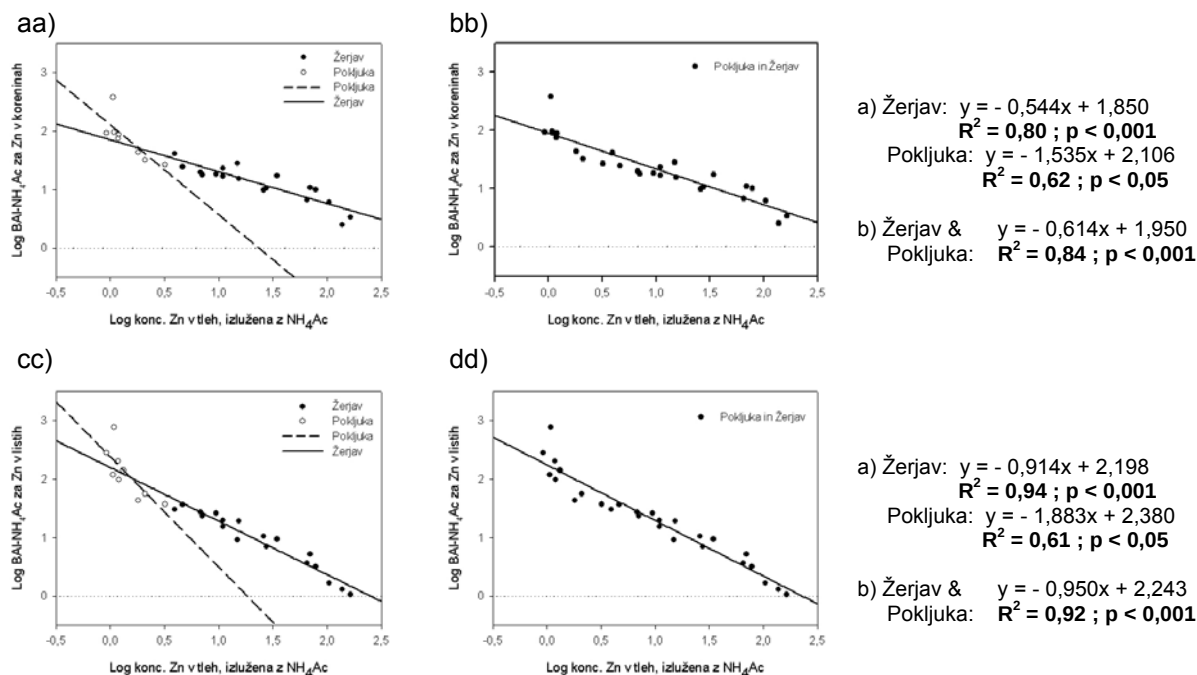
a) Žerjav: $y = -0,489x + 1,008$
 $R^2 = 0,34$; $p < 0,05$
 Pokljuka: $y = -0,83x + 1,652$
 $R^2 = 0,66$; $p < 0,05$

b) Žerjav & Pokljuka: $y = -0,474x + 0,986$
 $R^2 = 0,45$; $p < 0,01$



c) Žerjav: $y = -0,874x + 1,976$
 $R^2 = 0,86$; $p < 0,001$
 Pokljuka: $y = -1,142x + 2,54$
 $R^2 = 0,67$; $p < 0,05$

d) Žerjav & Pokljuka: $y = -0,934x + 2,125$
 $R^2 = 0,82$; $p < 0,001$



Slika 21: Odnos med bioakumulacijskimi faktorji, izračunanimi na osnovi celokupne koncentracije (BAI), in celokupno koncentracijo Zn v tleh (sl. a-d) oz. med bioakumulacijskimi faktorji za Zn v listih oz. koreninah, izračunanimi na osnovi NH₄Ac frakcije (BAI-NH₄Ac) in z NH₄Ac izluženo koncentracijo Zn v tleh (Sl. aa-dd). Vrednosti so logaritemsko transformirane. Pikčasta črta označuje vrednost BAI = 1. Točko določa par podatkov dveh spremenljivk vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1).

Regresijske analize za odnos med BAI in celokupno koncentracijo kovin v tleh so bile značilne ($p < 0,01$; $p < 0,05$), razen v primeru Pb in Cd za korenine ter Cd za liste s Pokljuke, vendar vsi grafi kažejo na splošen trend upadanja BAI z višanjem celokupne koncentracije kovin v tleh za vse kovine (Pb, Cd, Zn) tako v koreninah kot listih ive *S. caprea* (sl. 19, 20, 21). Podoben trend je viden tudi pri regresijskih analizah odnosa med BAI-NH₄Ac in z NH₄Ac izluženo koncentracijo kovin, kjer so vse analize bile značilne ($p < 0,05$ – $p < 0,001$). Vrednosti BAI-NH₄Ac so bile očitno višje od vrednosti BAI in z izjemo BAI-NH₄Ac za Pb v listih v vseh primerih > 1 . Tudi regresijske analize za odnos med bioakumulacijskim indeksom in koncentracijo kovine v tleh so z izjemo Pb v listih imele višjo stopnjo značilnosti in višji R^2 za vrednosti izračunane na osnovi z NH₄Ac izluženih koncentracij kovin (sl. 19 aa-dd, 20 aa-dd, 21 aa-dd).

5.2.4.2 Translokacijski indeks (TI)

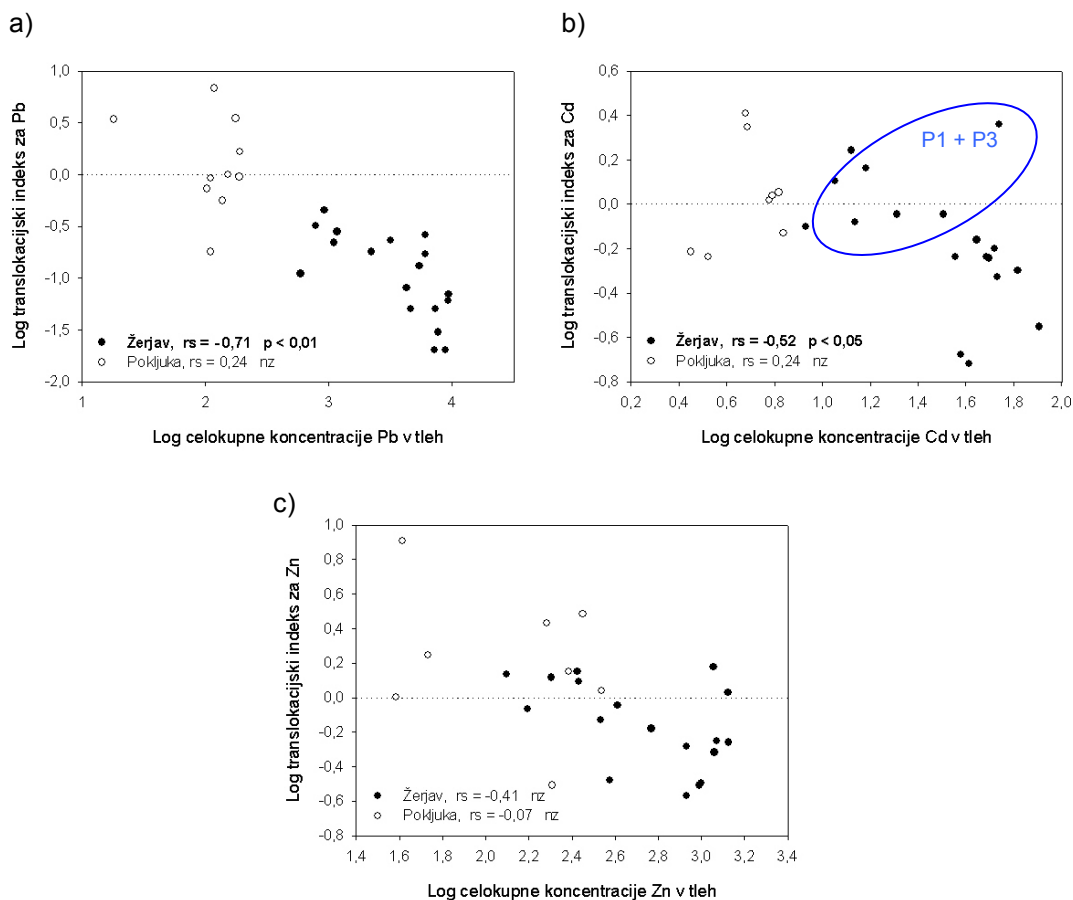
Informacijo o porazdeljevanju in transportu določene kovine po rastlini nam v neki meri daje razmerje med koncentracijo kovine v listih in koncentracijo kovine v koreninah, t. i. translokacijski indeks (TI). Vrednost translokacijskega indeksa > 1 pomeni učinkovit transport privzete kovine iz korenin v poganjke oz. liste, < 1 pa omejen transport v liste.

TI so bili višji za vse kovine Pb, Cd in Zn pri rastlinah z neonesnaženega območja, vendar je razlika bila značilna ($p < 0,01$) le v primeru Pb (tab. 9). Vrstni red za TI pri drevesih tako z onesnaženega kot z neonesnaženega območja je bil naslednji: $TI_{Zn} > TI_{Cd} > TI_{Pb}$.

Tabela 9: Mediane, minimalne (min) in maksimalne (maks) vrednosti za translokacijski indeks (TI) kovin Pb, Cd in Zn izračunane ločeno za rastline ive *S. caprea* z onesnaženega rastišča v Žerjavu ($n = 8-10$) in neonesnaženega rastišča na Pokljuki ($n = 18$). KV označuje koeficient variacije (%). Mann-Whitney U test; ** $p < 0,01$, nz – neznačilno.

	ŽERJAV - onesnaženo				POKLJUKA - neonesnaženo				p
	Mediana	Min	Maks	KV %	Mediana	Min	Maks	KV %	
TI_{Pb}	0,12	0,02	0,45	80%	0,98	0,18	6,82	104%	**
TI_{Cd}	0,66	0,19	2,29	67%	1,07	0,58	2,56	60%	nz
TI_{Zn}	0,70	0,27	1,50	53%	1,41	0,31	8,08	109%	nz

Odnos med TI za posamezno kovino in celokupno koncentracijo te kovine v tleh smo skušali določiti z iskanjem korelacij in raziskati z regresijsko analizo. Ločene regresijske analize za onesnaženo in neonesnaženo območje niso bile v primeru nobene kovine (Pb, Cd, Zn) značilne, log TI za Pb in Cd pa sta značilno korelirala z logaritmiranimi vrednostmi celokupne koncentracije Pb oz. Cd v tleh (Pb: $p < 0,01$; Cd: $p < 0,05$) (sl. 22). Sl. 22a zelo očitno kaže trend upadanja TI z naraščanjem celokupne koncentracije Pb v tleh, kar pa ne velja za TI za Cd na sl. 22b. Vzrok so vrednosti TI za Cd pri ivah z manj onesnaženih ploskev v Žerjavu (P1, P3). Ti TI se gibljejo v istem vrednostnem razponu translokacijskega indeksa kot TI pri drevesih z neonesnažega območja. Vrednosti TI za Cd pri rastlinah z manj onesnaženih ploskev v Žerjavu (P1+P3) so bile višje ($TI_{P1+P3} = 0,9$ (mediana)) od TI za Cd z bolj onesnaženih rastišč v Žerjavu (P2+P4) $TI_{P2+P4} = 0,57$ (mediana)), vendar razlike niso bile značilne ($p = 0,14$, Mann-Whitney U test).



Slika 22: Odnos med logaritmirano vrednostjo translokacijskega indeksa (TI) in celokupno koncentracijo kovine (a: Pb, b: Cd in c: Zn) v tleh, ki je bila izmerjena z metodo XRFS. TI je razmerje med koncentracijo kovine v listih in koncentracijokovine v koreninah ($n = 25-29$). Črtkana črta predstavlja vrednost $TI = 1$. Točko določa par podatkov dveh spremenljivk vzorca ene rastline (npr. P1V2-vzorec vrbe 2 iz ploskve P1).

5.3 VPLIV KEMIJSKIH LASTNOSTI TAL NA USPEŠNOST PRIVZEMA KOVIN V RASTLINO

Vpliv kemijskih lastnosti tal na privzem kovin Pb, Cd in Zn se lahko odraža v koncentracijah omenjenih kovin v rastlinskih organih. Poiskali smo značilne korelacije med nekaterimi kemijskimi lastnostmi tal in koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v koreninah in listih ive *S. caprea*. Pomembne značilne korelacije smo našli med kovinami Pb, Cd in Zn v rastlinskih organih (z izjemo Pb in Zn v listih) ter dušikom, fosfatom (pozitivna korelacija) in Ca v tleh (negativna korelacija) ($p < 0,001$; $p < 0,01$) (tab. 10).

Tabela 10: Korelacije med nekaterimi kemijskimi lastnostmi tal in koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v koreninah in listih ive *S. caprea*. Podane so vrednosti Spearmanovih korelacijskih koeficientov (r_s) z označeno pripadajočo statistično značilnostjo ($n = 29$).

	Pb KORENINE	Pb LISTI	Cd KORENINE	Cd LISTI	Zn KORENINE	Zn LISTI
org. snov (%)	nz		nz	nz	nz	nz
N-NH₄	0,69***	neznačilno	0,70***	0,59**	0,66***	nz
N-NO₃	0,52**		0,61**	0,53**	0,55**	0,35**
P dostopni	0,56**		0,60**	0,59**	0,60**	
pH (H₂O)	nz		nz	nz	nz	neznačilno
Ca	-0,51**		-0,51**	-0,51**	-0,56**	
K	nz		nz	nz	nz	
Fe	nz	0,45*	nz	0,38*	nz	

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, nz - neznačilno

5.4 VPLIV ONESNAŽENJA TAL S KOVINAMI Pb, Cd IN Zn NA KONCENTRACIJE NUTRIENTOV Ca, K in Fe V RASTLINI

Informacijo o vplivu povišanih koncentracij kovin Pb, Cd, Zn na privzem in s tem na koncentracijo nutrientov Ca, K in Fe v rastlinskih organih smo skušali dobiti z iskanjem značilnih Spearmanovovih korelacijskih koeficientov (r_s). Pomembne in statistično visoko značilne negativne korelacije smo našli samo med koncentracijami vseh kovin v tleh, koreninah in listih ive *S. caprea* (z izjemo Pb in Zn v listih) ter koncentracijami Fe v listih ($p < 0,001$; $p < 0,01$) (tab. 11). Korelacije med kovinami in Fe v koreninah so bile pozitivne, a nizke in neznačilne (priloga E). Ostale posamezno značilne korelacije (tab. 11) so verjetno rezultat naključij.

Tabela 11: Korelacije med celokupno koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh (tudi koncentracijo, ekstrahirane z NH_4Ac), koreninah, listih ive *S.caprea* in koncentracijami nutrientov Ca, K in Fe v koreninah, listih ive. Podane so vrednosti Spearmanovih korelacijskih koeficientov (r_s) z označeno pripadajočo statistično značilnostjo ($n = 29$).

	Ca KORENINE	Ca LISTI	K KORENINE	K LISTI	Fe KORENINE	Fe LISTI
Pb tla		-0,43*				-0,68***
Pb NH_4Ac						-0,66***
Pb korenine						-0,63***
Pb listi	neznačilno	neznačilno				nz
Cd tla			neznačilno	neznačilno	neznačilno	-0,68***
Cd NH_4Ac						-0,66***
Cd korenine						-0,68***
Cd listi						-0,63***
Zn tla						-0,58**
Zn NH_4Ac	0,41*	-0,51**				-0,60**
Zn korenine	0,55**	nz				-0,51**
Zn listi	nz	nz				nz

*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, nz - neznačilno.

6 RAZPRAVA

6.1 ANALIZE TAL

Rizosfera je dinamično mikrookolje, na katerega vpliva rastlina sama. Zanj so značilne številne povratne zanke medsebojnih interakcij med procesi v koreninah rastline, lastnostmi tal in dinamiko na korenine vezanih populacij mikroorganizmov (Wenzel in sod., 1999). Zato se koncentracije kovin v rizosferi lahko razlikujejo od koncentracij kovin v nerizosfernih tleh. V rizosfernih tleh ive *Salix caprea* v Žerjavu smo v primerjavi z neonesnaženim rastiščem izmerili značilno višje ($p < 0,05$) (razen v primeru Zn) in močno povečane celokupne koncentracije kovin Pb, Cd in Zn (tab. 3), ki so presegale z zakonom določene kritične imisijske vrednosti za tla. Te vrednosti so znatno nižje predvsem od koncentracij Pb (5600-51400 mg Pb kg⁻¹ SM) in Zn (868-269 mg Zn kg⁻¹ SM) v žerjavski nerizosfernih tleh (Regvar in sod., 2006). Koncentracije Cd so bile primerljive 49-148 mg Cd kg⁻¹. Vogel-Mikuš je s sodelavci (2004) v rizosfernih tleh hiperakumulatorske zelnote rastline *Thlaspi praecox* v Žerjavu izmerila do 67940 mg Pb kg⁻¹, 390 mg Cd kg⁻¹ in 5490 mg Zn kg⁻¹. Razlike med koncentracijami kovin v rizosfernih tleh *S. caprea* in *T. praecox* z istega onesnaženega območja so normalne. Yanqun s sodelavci (2004) namreč poroča, da so bile koncentracije Pb, Cd in Zn v rizosfernih tleh dreves na območju svinčevo-cinkove rudarske dejavnosti na Kitajskem 3-10 krat značilno nižje v primerjavi s koncentracijami v rizosfernih tleh grmov in zelišč. Razlog za to je mogoče v tem, da je drevo trajnica in lahko stalno (z izjemo vmesnih zimskih premorov) privzema kovine iz tal in jih kopiči v tkivu (Landberger in Greger, 1996). To velja predvsem za kopičenje Pb v koreninah.

Rastlinam dostopne kovine v tleh običajno predstavljajo le majhen del celokupne koncentracije kovin v tleh (Marschner, 1995, Blaylock in Huang, 2000). Naši rezultati kažejo, da to še posebej velja za koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v talni raztopini (z vodo ekstrahirane koncentracije kovin) (Leštan, 2002), ki so takoj razpoložljive za privzem v rastlino (Ernst, 1996). Potenčna funkcija med koncentracijo kovine v tleh in z vodo izluženo koncentracijo kovine kaže na omejeno kapaciteto talne raztopine za topnost kovin pri visokih koncentracijah kovin v tleh. Koncentracije izmenljivih (rastlinam dostopnih) in na karbonate vezanih kovin (z NH₄Ac ekstrahirane koncentracije kovin) (Leštan, 2002) so predstavljale le do 28,9 %, do 40 % oz. do 16,8 % celokupne koncentracije Pb, Cd oz. Zn v žerjavskih tleh. O podobnem vrstnem redu in slabi dostopnosti kovin Cd > Pb > Zn (do 61,7 % > do 44,8 % > do 17,3 %) za rastline v Žerjavu je poročala že Grčmanova (2001), ki piše o tem, da je večinski delež kovin vezan na karbonte in organsko snov. Prpić-Majić

(1996) pa omenja, da se Cd za razliko od Pb in Zn na tem onesnaženem območju v tleh nahaja v vodotopnih oblikah in ga rastline zato lahko privzemajo. Na karbonate vezane kovine sicer niso dostopne za rastline, vendar pa s privzemom kovinskih ionov in istočasnim izločanjem H^+ zaradi antiportnega privzema (Larcher, 1994) zakisajo rizosfero in tako povečajo dostopnost kovin v tleh.

Onesnaženost okolja zaradi rudarjenja in taljenja rude poveča delež izmenljive frakcije kovin v tleh in s tem njihovo dostopnost za rastline (Adriano, 2001). To kažejo tudi rezultati naših raziskav, saj so bili razponi z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin znatno višji na onesnaženem območju v primerjavi z neonesnaženo Pokljuko.

Ploskve z neonesnaženega območja na Pokljuki niso presegale zakonsko določenih kritičnih imisijskih koncentracij kovin v tleh (tab. 3) in jih torej upravičeno imenujemo za neonesnažene, vendar bi v prihodnosti pri podobnih raziskavah bilo za neonesnažene ploskve bolje izbrati neonesnažene ploskve v bližini Žerjava, kot je npr. izbrala Vidic s sodelavci (2006).

6.1.1 Vpliv nekaterih kemijskih lastnosti tal na privzem kovin v rastlino

Čeprav je pH najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na dostopnost kovin (Leštan, 2002), značilnih korelacij med pH in koncentracijami kovin v tleh nismo našli. Razlog je verjetno v veliki podobnosti pH (rahlo alkalen, mediana: 7,5-7,65) na vseh ploskvah. Ker je bil privzem kovin v rastline z različno onesnaženih ploskev različen, sklepamo, da verjetno največji vpliv pri privzemu kovin v ive v Žerjavu igra celokupna koncentracija kovin. pH rizosfernih tal bi zaradi aktivne izmenjave ionov preko rastlinskih korenin kljub karbonatnim tlem mogoče pričakovali nižji. Ker obstaja verjetnost, da je pri merjenju pH prišlo do sistemske napake, bi bilo meritve pH smiselno ponoviti z drugo metodo. Kljub začetnim domnevam, da vsebnost organske snovi zaradi opažene veliki variabilnosti med ploskvami (4,4-38,8 %) verjetno pomembno vpliva na privzem kovin v rastlino, pa korelacij med organsko snovjo v tleh in koncentracijami kovin v rizosfernih tleh, koreninah, listih rastlin nismo našli.

S koncentracijami Pb, Cd in Zn v tleh z visoko stopnjo statistične značilnosti pozitivno korelirata dušik ($N-NH_4$, $N-NO_3$) in fosfati v tleh ($p < 0,001$), negativno pa Ca^{2+} . Enak odnos se kaže tudi za koncentracije Pb, Cd, Zn v koreninah in Cd v listih. Razlago za to lahko mogoče najdemo pri Seregin in Ivanovu (2001), ki trdita, da Cd in Pb v večini primerov negativno vplivata na privzem anionov (NO_3^-), zato ostane koncentracija le-teh v

onesnaženih tleh povišana. Leštan tudi omenja, da nekateri anioni (npr. fosfati) lahko s težkimi kovinami (npr. Pb) tvorijo netopne soli. Za vsebnost organske snovi, pH, koncentracij K in Fe nismo našli statistično značilnih korelacij.

6.2 ANALIZE RASTLINSKIH ORGANOV

6.2.1 Koncentracije kovin Pb, Cd in Zn v rastlinskih organih vrste *S. caprea*

Več avtorjev poroča, da nekatere vrste rodu *Salix* in *Populus* lahko v svojih listih kopičijo znatne količine težkih kovin (Unterbrunner in sod., 2007), a je večina teh meritev bila opravljena na rastlinah – potaknjencih iz lončnih in poljskih poskusov ali celo iz hidroponike. Znano je, da so koncentracije kovin v primerjavi s poljskimi poskusi višje pri rastlinah iz lončnih poskusov (Rosselli in sod., 2003) ter da hidroponski in lončni poskusi ne dajejo pravih informacij o dejanskih koncentracijah kovin v listih rastlin rastočih v naravi (Dos Santos Utmazian in Wenzel, 2007). Unterbrunner in sodelavci (2007) so zato študirali privzem kovin pri odraslih drevesih rodu *Salix*, *Populus* in *Betula* iz različnih, s kovinami onesnaženih območij iz Srednje Evrope, s celokupnimi koncentracijami kovin 6,25-51,5 mg kg⁻¹ za Cd in 1950-8640 mg kg⁻¹ za Zn v tleh. Najvišje koncentracije Cd (do 116 mg Cd kg⁻¹) in Zn (4680 mg Zn kg⁻¹) na takih tleh so izmerili v listih ive *Salix caprea*. V svojih raziskavah so zajeli tudi ivo *S. caprea*, rastočo na onesnaženem območju v Mežici (0,8-678 mg Cd kg⁻¹ in 15-61600 mg Zn kg⁻¹ celokupno v tleh), pri kateri so v avgustu 2002 nabranih listih izmerili približno 10-80 mg Cd kg⁻¹ (z upoštevanjem osamelca do 95 mg Cd kg⁻¹) in 200-2800 mg Zn kg⁻¹ (Unterbrunner in sod., 2007). Primerljive koncentracije Cd smo izmerili tudi mi v listih dreves vrste *S. caprea* iz Žerjava (19,1-96,8 mg Cd kg⁻¹ SM), medtem ko je bil razpon koncentracij Zn v listih očitno nižji (120-361 mg Zn kg⁻¹) in se je prekrival z območjem med 200 in 300 mg Zn kg⁻¹ SM, v katerem je večina rastlin že občutljiva za povišane koncentracije Zn (Balsberg Pahlsson, 1989). V listih ive iz Žerjava smo določili koncentracijo Pb (88,8-257 mg Pb kg⁻¹ SM), ki je bila – verjetno tudi zaradi višjega pH tal v Žerjavu – nižja od koncentracije Pb (145-438 mg Pb kg⁻¹) pri ivi *S. caprea* iz Podkloštra (Arnoldstein) (Unterbrunner in sod., 2007). Pri ivi *S. caprea* iz Mežice pa povišanih koncentracij Pb v listih niso ugotovili (Unterbrunner in sod., 2007). Naši rezultati kažejo, da so bile koncentracije kovin Pb, Zn in Cd v listih dreves iva *S. caprea* z onesnaženega območja v splošnem višje od koncentracij kovin v listih dreves z neonesnaženega območja, a je razlika bila značilna ($p < 0,05$) le v primeru Cd. Tudi Rosselli in sod. (2003) pišejo o višjih koncentracijah kovin Cd in Zn pri drevesih z onesnaženega območja. Pri meritvah kovin v listih je lahko prišlo do napake, saj smo

merili koncentracije kovin v neopranih listih. V nadaljnjih poskusih je treba upoštevati dejstvo, da se na kosmatih listih, kot jih ima iva *S. caprea*, tudi iz zraka lahko veže znaten delež kovin (Singh in sod., 1997; Adriano, 2001).

Unterbrunner in sodelavci (2007) so pri vrsti *S. caprea* iz Podkloštra (Arnoldstein) opazili splošni trend koncentracij Cd in Zn v rastlinskih organih. Koncentracije Cd in Zn so naraščale v smeri: les < debele korenine (> 2 cm) < skorja oz. lubje < srednje korenine (2 mm-2 cm) < listi < tanke korenine (< 2 mm) (Unterbrunner in sod., 2007). Tudi naši rezultati koncentracij kovin v koreninah dreves z onesnaženega območja so bili velikokrat višji od izmerjenih koncentracij v listih istih dreves. V koreninah dreves iz Žerjava smo v primerjavi s koreninami dreves z neonesnaženega območja na Pokljuki izmerili značilno višje koncentracije kovin Pb, Cd in Zn (tab. 7).

Koncentracije kovine v rastlini so odvisne od koncentracije kovine v tleh (Baker in sod., 1994). Podatkov za običajne/normalne koncentracije kovin pri drevesih rodu *Salix* z neonesnaženih tal v literaturi nismo zasledili, zato smo naše rezultate koncentracij kovin v listih ive *S. caprea* z onesnaženega območja primerjali z znanimi podatki drugih rastlin (tab. 1). Koncentracije so v primeru Pb in Cd močno presegale normalne koncentracije v listih rastlin (Pb: do 50 krat, Cd: do približno 970 krat) v primeru Zn pa niso bile višje niti za faktor 4. Posamezna drevesa ive iz Žerjava so se s koncentracijami Cd v listih celo zelo približala meji za hiperakumulacijo ($> 100 \text{ mg Cd kg}^{-1}$) (Brooks, 2000; tab. 1). Zmanjšana rast grmov in dreves v Žerjavu kot bi pričakovali za odrasle lesne rastline (Vidic in sod., 2006) je tako lahko rezultat kopičenja visokih koncentracij in posledične strupenosti Cd. Adriano (2001) poroča namreč o močno zmanjšani rasti dreves pri $100 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ SM tal.

6.2.2 Strategije privzema, transport, porazdeljevanje in kopičenje kovin Pb, Cd in Zn pri vrsti iva *S. caprea*

Poznavanje strategije privzema določene kovine v rastlino, nadaljnjega transporta in porazdeljevanja kovine med tkivi ter končnega mesta za kopičenje te kovine v rastlini je ključnega pomena pri izbiranju rastlin, uporabnih za fitoremediacijo s kovinami obremenjenih območij.

V literaturi podatkov o strategijah privzema kovin Pb, Cd in Zn pri lesnih vrstah nismo zasledili. Unterbrunner in sodelavci (2007) so sicer iskali povezavo med z amonijevim acetatom izluženo koncentracijo kovin v tleh in koncentracijo Cd in Zn v listih vrste *S. caprea* z dveh različnih onesnaženih območij [Mežica, Podklošter (Arnoldstein)], a je niso

našli. Naše raziskave pa so za Pb pokazale očitno strategijo izključevanja, za Cd pa strategijo neizrazite akumulacije. Rastlina *S. caprea* ima nedvomno razvito strategijo privzema za esecialno kovino Zn, vendar na osnovi naših naših meritev nismo prepoznali nobene od treh strategij po Bakerju (1981).

Kopičenje kovine v rastlinskem tkivu smo raziskali z bioakumulacijskimi indeksi. Padajoče regresijske premice med logaritmiranimi vrednostmi celokupnih koncentracij kovin v tleh in BAI za kovino v rastlinskem tkivu v splošnem kažejo na zmanjšanje kopičenja kovin Pb, Cd in Zn z večanjem onesnaženosti tal. O podobnem pri vrsti *Salix viminalis* poročata tudi Landberger in Greger (1996), Unterbrunner in sod. (2007) pa pišejo o obratni logaritemski funkciji med BAI za Cd in Zn pri ivi *S. caprea* v listih in naraščajočo koncentracijo Cd/Zn v tleh. BAI v naših raziskavah so tudi pokazali, da se v splošnem na onesnaženem rastišču več kovin akumulira v koreninah, na neonesnaženem območju pa v listih, kar je najverjetneje povezano z zmanjšanjem/omejeno sposobnosti transporta velikih količin kovinskih ionov v nadzmenne dele. Višji BAI-NH₄Ac kažejo, da rastlina s koreninami bolje črpa kovine iz z NH₄Ac izlužene koncentracije kovin kot pa iz celokupnih koncentracije kovin v tleh.

Razmerje med koncentracijo kovin v poganjkih in koreninah (translokacijski indeks = TI) se uporablja kot merilo za transport kovin za primerjavo med različnimi rastlinami in njihovimi odgovori na kovine (Baker in Walker, 1990). Rezultati kažejo na splošno upadanje TI z večanjem koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v tleh (v primeru Pb in Cd so bile negativne korelacije tudi značilne), kar se ujema s spoznanji Bakerja in Walkerja (1990), ki sta pri nekaterih zelnatih rastlinah pri populaciji rastlin z onesnaženega območja določila značilno nižji TI za Zn, Pb in/ali Cd. Ta dejstva nakazujejo bolj učinkovit transport kovin med rastlinskimi tkivi pri rastlinah z manj onesnaženih ploskev.

6.2.2.1 *Svinec*

Odnos med koncentracijo Pb v koreninah ive in celokupno koncentracijo Pb tleh je dobro opisala eksponencialno naraščajoča visoko značilna regresijska krivulja ($R^2 = 0,70$, $p < 0,001$). Za odnos med med koncentracijo Pb v listih in celokupno koncentracijo Pb v tleh pa smo ugotovili statistično neznačilna korelacija ($r_s = 0,40$; $p > 0,05$) in neznačilna regresijo. Te ugotovitve kažejo na učinkovito izključevanje Pb iz nadzemnih delov rastlin na onesnaženem območju v Žerjavu. To potrjujejo tudi od 1 znatno manjše vrednosti BAI (korenine: 0,38, listi: 0,03 - mediane) in TI (0,12 - mediana), ki so med vsemi tremi kovinami bile tudi najnižje. Strategija izključevanja za ive z onesnaženega območja v

Žerjavu je verjetno taka, da večino privzetega Pb kopičijo oz. zadržijo v koreninah in ga zelo omejeno transportirajo v nadzemne dele (Rosselli in sod., 2003 po Khan, 2001). O podobno nizkih BAI (0,03-0,23) za Pb pri ivi *S. caprea* iz Podkloštra (Arnoldstein) piše tudi Unterbrunner s sodelavci (2007).

6.2.2.2 Kadmij

O kopičenju Cd pri rodu *Salix* poročajo različni avtorji, npr. Stoltz in Greger (2002) iz poljskih poskusov pri drevesih vrste *S. phylicifolia* in *S. borealis*, Landberger in Greger (1996) pa pri vrsti *S. viminalis* (ekotip št. 78980). Za različne vrste so določili tudi visoke BAI za Cd v listih (Dickinson in Pulford, 2005), npr. pri potaknjencih vrste *S. viminalis* med 4,8-27,9 (Klang-Westin in Eriksson, 2003), 1,4 (Verwaecke s sodelavci, 2003) oz. 0,83 (Rosselli in sod., 2003) pri isti vrsti z višjimi koncentracijami Cd v tleh, 1,8 za *S. cathayana* (Yanqun in sod., 2004). Unterbrunner in sod. (2007) so pri drevesih ive *S. caprea* z različnih območjih določili različne BAI. Iva *S. caprea* iz Podkloštra (Arnoldstein) je imela BAI za Cd v listih > 8 , iva *S. caprea* rastoča v Mežici pa zelo variabilen, in sicer 0,3-5 za Cd (mediana okoli 1) oz. je bilo 50 % BAI za Cd približno med BAI 0,5-1,5. Ti podatki so primerljivi z BAI za Cd določenih v naših raziskavah (0,19-2,29; mediana = 0,66).

Statistično značilen regresijski model eksponentne funkcije ($R^2 = 0,43$) za koncentracijo Cd v koreninah in značilen regresijski model potenčne funkcije ($R^2 = 0,48$) za koncentracijo Cd v listih v odnosu do celokupne koncentracije Cd v tleh kažeta na obnašanje rastlin vrste *S. caprea* za kovino Cd, ki je značilno za akumulacijski tip rastlin. To velja vsaj za rastline z manj onesnaženih ploskev (P1, P3) v Žerjavu. Opazili smo namreč, da je koncentracija okoli 35 mg Cd kg⁻¹ SM tal neka mejna koncentracija, višje od katere se koncentracije Cd v listih kljub naraščanju koncentracije Cd v koreninah le počasi zvišujejo. To je mogoče posledica popuščanja bariere zaradi strupenosti. Strupenost Cd za ivo pa je pri teh koncentracijah vprašljiva, saj Adriano (2001) o močno zmanjšani rasti dreves zaradi strupenosti Cd omenja šele pri koncentraciji 100 mg Cd /kg SM tal, vendar ne smemo pozabiti, da je fitotoksičnost Cd odvisna tudi od rastlinske vrste (Adriano, 2001). Akumulacija Cd v listih pri ivah z onesnaženega območja potrjuje tudi BAI (1,10), saj je mediana > 1 , čeprav se večji del Cd kopiči v koreninah (BAI = 1,72 – mediana). Relativno nizka akumulacija Cd v listih je rezultat slabega transporta Cd v nadzemne dele, saj je TI < 1 (mediana – 0,66). Če smo manj onesnažene (P1 in P3) in bolj onesnažene ploskve (P2 in P4) v Žerjavu obravnavali ločeno sta bili mediani za BAI za Cd v listih in TI na manj onesnaženih ploskvah bili višji, in sicer BAI_{P1+P3} = 1,67, TI_{P1+P3} = 0,9. Na

onesnaženem območju v Žerjavu za rastline z dobro akumulacijsko strategijo za Cd torej lahko imenujemo predvsem tiste z manj onesnaženih ploskev. Obstaja tudi možnost, da drevesa vrste *S. caprea* sploh niso razvila strategije za kopičenje Cd v listih, ampak je to le rezultat rastlinam dobro dostopnega Cd v Žerjavskih tleh, kot piše Grčman (2001), in relativno dobrega možnega transporta Cd v kompleksih z organskimi kislinami in aminokislinami (Greger, 1999; Seregin in Ivanov, 2001). Tudi Clemens in sod. (2002) omenjajo možnost kopičenja neesencialnih elementov (npr. Cd) zaradi nespecifičnosti sistema, odgovornega za privzem in porazdeljevanje ionov v rastlini. Vendar pa v prid razviti strategiji za rahlo akumulacijo Cd v listih rastlin z onesnaženega območja v Žerjavu kažejo še drugi rezultati. Npr.: samo v primeru Cd značilno višje koncentracije kovine v listih dreves z onesnaženega v primerjavi z rastlinami z neonesnaženega območja, primerjava med regresijskima premicama za odnos med BAI in celokupno koncentracijo Cd v tleh ločeno za rastline z onesnaženega in neonesnaženega območja. Po tej primerjavi so vrednosti BAI tako pri nizkih kot pri visokih celokupnih koncentracijah Cd v tleh višje pri ivah iz Žerjava. Tudi korelacije med kemijskimi lastnostmi tal in nutrienti ter koncentracijami kovin v listih so bile značilne samo za Cd.

Neposredna in statistično korektna primerjava sposobnosti kopičenja kovin Pb, Cd in Zn z regresijami za odnos med BAI in celokupno koncentracijo kovin v tleh je bila zaradi dveh koncentracijsko povsem ločenih skupin podatkov nemogoča. Da bi domneve o boljši sposobnosti kopičenja Cd pri rastlinah z onesnaženega območja potrdili, je v nadaljnjih raziskavah potrebno izvesti drugače zastavljene poskuse. Prva možnost je vzgoja potaknjencev v njihovi izvorni zemlji in delno navzkrižna presaditev, kar npr. pomeni presaditev dela potaknjencev z neonesnaženega območja nazaj na onesnaženo, del pa na onesnaženo območje, ter kasnejše meritve kovin v rizosfernih tleh in rastlinskih organih. Druga možnost je kontroliran lončni poskus, v katerem bi paralelno pripravili velikostni razpon koncentracij posamezne kovine v substratu, kot je bil v naših raziskavah. V eno paralelko bi posadili vzgojene potaknjence z neonesnaženega, v drugo pa potaknjence z onesnaženega območja. Ta poskusa sta teoretično možna in v primeru njune uspešnosti, bi bila primerjava sposobnosti kopičenja kovin pri rastlinah z onesnaženega in neonesnaženega mogoča, vendar bi se ob tem soočili z drugimi težavami, kot npr. neuspešna rast zaradi strupenosti kovin pri visokih koncentracijah za rastline z neonesnaženega območja, za naravne razmere nerealne koncentracije kovin v organih, drugačni BAI in TI. To nam pri vrednotenju vrste *S. caprea* za fitoremediacijo tal v Žerjavu ne bi pomagalo.

6.2.2.3 Cink

Pri nekaterih vrbah, npr. *S. phylicifolia* in *S. borealis*, *S. viminalis*, omenjajo sposobnost kopičenja Zn v listih (Stoltz in Greger, 2002; Landberger in Greger, 1996; Rosselli in sod., 2003 po Kayser in sod., 2000). Naše modelne rastline, podobno kot je opazil Rosselli s sodelavci (2003) v raziskavah pri vrsti *S. viminalis* (BAI za Zn = 0,37), ne moremo imenovati za akumulacijsko rastlino za Zn. Koncentracije Zn so bile pri rastlinah z onesnaženega območja povečane le v koreninah. Koncentracije Zn v listih so bile blizu znane normalne koncentracije za Zn v listih (70-100 mg kg⁻¹ SM) (Brooks, 2000; Yanqun in sod., 2004) in niso bile značilno različne med rastlinami z onesnaženega in neonesnaženega območja. Že ta dejstva nekako izključujejo sposobnost akumulacije Zn pri vrsti *S. caprea*, rastoči v Žerjavu. To podpirajo tudi rezultati ugotavljanja strategije privzema za Zn. Na podlagi statistično značilne linearne regresije ($R^2 = 0,52$; $p < 0,001$) za odnos med koncentracijo Zn v koreninah in celokupno koncentracijo Zn v tleh ter odsotnosti statistično značilne korelacije ($r_s = 0,32$; $p > 0,05$) med celokupno koncentracijo Zn v tleh in listih za ivo *S. caprea* namreč ne moremo za Zn določiti nobene od treh strategij privzema (Baker, 1981). Trendi koncentracij kovin v koreninah sicer kažejo na obnašanje, ki je značilno za rastline indikatorje, a ne smemo pozabiti, da zato, ker rastline ne morejo povsem preprečiti privzema katerega koli elementa iz tal, koncentracije elementov v koreninah rastlin odražajo kemijsko naravo tal, v katerih rastline rastejo (Larcher, 2003). Med koncentracijami kovin v tleh in koncentracijami kovin v listih nismo prepoznali značilnega odnosa oz povezave. Relativno nizek BAI za Zn v koreninah (mediana = 0,54) in BAI za Zn v listih (mediana = 0,32) dreves z onesnaženega območja dodatno izključujejo strategijo kopičenja za Zn, v primerjavi z Pb relativno visok TI (mediana = 0,70) pa strategijo izključevanja in kopičenja Zn v koreninah rastlin. Mediana TI za Zn je bila na onesnaženem in neonesnaženem območju najvišji od TI za kovine Pb, Cd, Zn. Najvišje TI za Zn so v svojih raziskavah ugotovili tudi drugi (Rosselli in sod., 2003 po Kabata Pendias in Pendias, 1984; Mertens in sod., 2001; Nissen in Lepp, 1997). To je nekako logično, saj je Zn esencialni mikronutrient, za katerega v rastlini verjetno obstajajo razviti transportni mehanizmi, z večjo afiniteto za vezavo Zn kot pa drugih težkih kovin. Stopnja transporta kovin v ksilemu je pospešena, če so ioni kompleksirani (npr. Cu, Zn, Cd) (Marschner, 1995). Obstaja možnost, da je neizrazito kopičenje Zn pri ivi tudi posledica nizke dostopnosti Zn v karbonatnih tleh zaradi adsorpcije Zn na CaCO₃ (Marschner, 1995), kar so pokazale tudi naše meritve koncentracij kovin, izlužene z NH₄Ac. BAI za Zn v listih pri ivi *S. caprea* je določal tudi Unterbrunner s sodelavci (2007). Pri rastlinah iz Mežice so rezultati bili zelo variabilni, a zelo podobni našim: 0,1-8

(mediana okoli 0,2) oz. 50 % vrednosti BAI med približno 0,2 in 0,7, rastline iz Podkloštra (Arnoldstein) pa so imele $BAI > 8$.

6.3 OVREDNOTENJE USPEŠNOSTI EKSTRAKCIJSKEGA SREDSTVA ZA OCENO BIODOSTOPNOSTI KOVIN V TLEH

Dejanske dostopnosti in privzema kovin v rastlino ne poznamo. Ovrednotenje uspešnosti ekstrakcijskega sredstva za oceno dostopnosti kovin za ivo *S. caprea* se je zato izkazalo za težavno. Načina za statistično korektno primerjavo, ali so koncentracije kovin izlužene z NH_4Ac boljše merilo dostopnosti kovin kot so celokupne koncentracije kovin v tleh, nismo našli, vendar pa nam neke podatke o uspešnosti NH_4Ac za oceno biodostopnosti kovin lahko da primerjava regresijskih premic z premico »hipotetičnega privzema« z naklonom 45° . Ta primerjava nakazuje, da z NH_4Ac izlužene koncentracije kovin niso boljše za oceno dostopnosti kovin za rastlino, saj so bile regresijske premice logaritmiranih vrednosti za odnos med celokupno koncentracijo kovine v tleh in koncentracijo kovine v rastlinskem organu bližje premici »hipotetičnega privzema« kot pa v primeru izlužene koncentracije kovine. To se ne sklada s tem, kar so o ekstrakciji z NH_4Ac poročali Ernst (1996) ter Wenzel in Jockwer (1999). Iz rezultatov se kaže še drug trend: regresijske premice za odnos med logaritmiranimi vrednostmi z NH_4Ac izluženimi koncentracijami kovin v tleh in koncentracijami kovin v rastlinskem organu ležijo nad regresijskimi premicami za odnos med logaritmiranimi vrednostmi celokupnih koncentracij kovin v tleh in koncentracijami kovin v rastlinskem organu. Tudi višje vrednosti bioakumulacijskih indeksov na osnovi z NH_4Ac izluženih koncentracij kovin ($BAI-NH_4Ac$) so bile v primerjavi z bioakumulacijskimi indeksi na osnovi celokupne koncentracije kovin (BAI) višje. O tem piše tudi Vogel-Mikuš s sod. (2004). Rešitev za boljše poznavanje dostopnosti kovine za rastlino v žerjavskih tleh bi namesto uporabe NH_4Ac bila metoda sekvenčnih (zaporednih) ekstrakcij, kjer z uporabo različnih reagentov z različnimi kemijskimi lastnostmi lahko določimo koncentracije kovin v različnih talnih frakcijah (kovine vezane na karbonate, na Fe okside...) (Leštan, 2002), za katere poznamo, ali so rastlini dostopne ali ne.

6.4 VPLIV ONESNAŽENJA TAL S KOVINAMI Pb, Cd IN Zn NA KONCENTRACIJE NUTRIENTOV Ca, K IN Fe V RASTLINI

Povišane koncentracije kovin v tleh lahko zaradi možnih interakcij s kationi v tleh (Greger, 1999) vplivajo na privzem in s tem na koncentracije nutrientov (Ca^{2+} , K^+ , Fe^{2+} ...) v rastlinskih tkivih (Seregin in Ivanov, 2001). V nalogi smo ugotovili le značilno negativno korelacijo med kovinami Pb, Cd in Zn v tleh, koreninah in listih ive *S. caprea* (izjema Pb

in Zn v listih) ter koncentracijami Fe v listih (tab. 11). To je lahko posledica zmanjšane privzema Fe^{3+} zaradi kompeticije s Cd in Pb (Seregin in Ivanov, 2001), saj Memon in sod. (2001) trdijo, da nekateri dvovalentni kovinski ioni (npr. Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+}) lahko vstopijo v celico s prenašalci za esencialne katione (npr. Fe^{2+} prenašalec). Izmerjene koncentracije Fe v listih so bile v primerjavi z ednim podatkom o kritični najmanjši koncentraciji Fe v listih 44-58 mg kg⁻¹ SM v Barker in sod. (2007) za lesno vrsto *Prunus persica* v rangu minimalnih koncentracij (priloga B). Nizke koncentracije Fe so lahko posledica kombinacije povišanih koncentracij kovin v tleh in karbonatnega tipa tal. Rastline s strategijo I za privzem Fe (dvokličnice) namreč kažejo veliko občutljivost na višji pH, visoko vsebnost organske snovi v karbonatnih tleh in tudi na visoke koncentracije kovin v tleh (Barker in sod., 2007).

6.5 UPORABNOST IVE *S. caprea* PRI FITOREMEDIACIJI

Fitoremediacija predstavlja tehnologijo, s pomočjo katere lahko z uporabo ustreznih rastlinskih vrst omilimo posledice onesnaženja predvsem z ponovno ozelenitvijo opustelih delov (fitostabilizacija) oz. pri manjši stopnji onesnaženja povrnemo rodovitnost tal (fitoekstrakcija) (Vogel-Mikuš, 2006). Vrbe *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu so se v karbonatnih tleh, s slabo dostopnostjo kovin in v sodelovanju z drugimi organizmi (mikoriznimi glivami, travami) izkazale splošno uporabne za fitoremediacijo.

Za stalno fitoekstrakcijo so potrebne trajne, za vzgojo enostavne na kovine tolerantne rastline, ki kopičijo kovine v nadzemnih poganjkih in proizvajajo veliko biomase. V realnosti noben od znanih hiperakumulatorjev *sensu stricto* (Baker, 2000), ki so prilagojeni na zmerne podnebne razmere, ne izpolnjuje kriterija velike proizvodnje biomase. Primerne za razvoj tehnologije čiščenja s kovinami onesnaženih tal s fitoekstrakcijo se kažejo hitro rastoče lesne vrste z visoko produkcijo biomase, ki se nagibajo h kopičenju kovin v nadzemnih delih rastline (Unterbrunner in sod., 2007). Po rezultatih naše raziskave lahko med take uvrstimo tudi drevesa *S. caprea* iz populacije rastoče na onesnaženem območju v Žerjavu. Ugotovili smo namreč, da te rastline v listih akumulirajo Cd, vendar akumulacija ni tako izrazita kot pri zelnatih rastlinah, npr. ranem mošnjaku *Thlaspi praecox* (Vogel-Mikuš in sod., 2004). Te rastline so se izkazale kot potencialno uporabne za fitoekstrakcijo, vendar samo na s Cd zmerno onesnaženih tleh. Ker je proizvedena letna biomasa, ki je v naših raziskavah nismo spremljali, pomemben faktor za oceno uspešnosti fitoekstrakcije, so za potrditev uporabnosti ive *S. caprea* za fitoekstrakcijo Cd na onesnaženem območju v Žerjavu v prihodnosti na tem področju potrebne dodatne študije.

Za ive iz Žerjava smo ugotovili, da izključujejo Pb in ga v velikih koncentracijah kopičijo v koreninah. Ta lastnost jih skupaj z značilnostjo bogatega koreninskega sistema, ki prodira globoko v tla (Kuzovkina in Quigley, 2005) uvršča med uporabne rastline za fitostabilizacijo zelo onesnaženih območij, ki poleg imobilizacije Pb v tleh prav tako preprečujejo erozijo in s tem razširjanje s kovinami onesnaženih tal.

7 SKLEPI

- Koncentracije kovin Pb, Cd in Zn z vrednostmi 592-10900 mg kg⁻¹ SM Pb, 8,5-141 mg kg⁻¹ SM Cd in 125-1840 mg kg⁻¹ SM Zn tudi po ekoloških sanacijah onesnaženega območja v Žerjavu še vedno presegajo zakonsko določene kritične imisijske vrednosti za kovine v tleh v Sloveniji.
- Koncentracije kovin Pb, Cd in Zn, izlužene z NH₄Ac, predstavljajo do 40 % , 28,9 % in 16,8 % celokupne koncentracije Cd, Pb oz. Zn v žerjavskih tleh. Koncentracije kovin, izlužene z NH₄Ac v primerjavi s celokupnimi koncentracijami kovin v tleh niso boljše merilo dostopnosti kovin za vrsto *S. caprea*, rastočo v Žerjavu
- Cd je v žerjavskih tleh najbolj dostopen za rastline, Zn pa najmanj.
- Koncentracije Pb (332 – 10800 mg kg⁻¹ SM Pb), Cd (17,5 - 220 mg kg⁻¹ SM Cd) in Zn (114 – 793 mg kg⁻¹ SM Zn) v koreninah rastlin ive *S. caprea* iz Žerjava so v primerjavi z rastlinami z neonesnaženega območja zelo povečane, medtem ko so koncentracije v listih bistveno nižje, in sicer 88,8 - 257mg kg⁻¹ SM Pb, 19,1 - 96,8 mg kg⁻¹ SM Cd, 120 - 361 mg kg⁻¹ SM Zn.
- Strategija privzema kovin pri ivi *S. caprea* iz Žerjava je za Pb izključevanje, za Cd pa neizrazita akumulacija. O strategiji za Zn iz rezultatov teh raziskav ne moremo sklepati.
- Bioakumulacijski in translokacijski indeksi kažejo, da se relativni privzem kovin v rastlino in njihov transport med koreninami in listi pri veliki koncentraciji kovine v tleh zmanjša.
- Med populacijama dreves z onesnaženega in neonesnaženega rastišča razen za Cd ni razvite različne sposobnosti za kopičenje kovin v rastlinskih organih.
- Vrsta *S. caprea* iz Žerjava se je zaradi akumulacijskih sposobnosti za Cd izkazala potencialno uporabna za fitoekstrakcijo predvsem s kovinami zmerno onesnaženih tal, zaradi izrazitega izključevanja Pb pa je uporabna za imobilizacijo in fitostabilizcijo Pb v zelo obremenjenih tleh.

- pH tal in vsebnost organske snovi v žerjavskih tleh ne vplivata na privzem kovin v rastline. Nitrati in fosfati pozitivno korelirajo, Ca pa negativno korelira s koncentracijami kovin v tleh in v koreninah oz. v primeru Cd tudi s koncentracijami kovin v listih vrste *S. caprea*.
- Povišane koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v onesnaženih tleh v Žerjavu so močno korelirale z zmanjšanimi koncentracije mikronutrienta Fe v listih rastlin.

8 POVZETEK

Onesnaženost tal s Pb, Cd in Zn v Žerjavu je posledica večstoletnega rudarjenja in taljenja Pb. Najpogostejša lesna vrsta na onesnaženem območju je pionirska rastlina iva *S. caprea*. Ker v literaturi veliko avtorjev piše o uporabnosti rodu *Salix* za fitoremediacijo s kovinami obremenjenih območij, smo v pričujoči nalogi z meritvami celokupnih koncentracij kovin z metodo rentgenske fluorescenčne spektrometrije (XRFS) v rizosfernih tleh in rastlinskih organih (korenine, listi) vrste *S. caprea* z onesnaženega območja v Žerjavu skušali raziskati privzem kovin Pb, Cd in Zn v rastlino, njihov transport in porazdeljevanje po rastlini ter kopičenje kovin v listih.

Z analizami tal smo ugotovili, da koncentracije kovin Pb, Cd in Zn z vrednostmi 592-10900 mg kg⁻¹ SM Pb, 8,5-141 mg kg⁻¹ SM Cd in 125-1840 mg kg⁻¹ SM Zn tudi po sanacijah onesnaženega območja v Žerjavu še vedno presegajo zakonsko določene kritične imisijske vrednosti za kovine v tleh v Sloveniji. Z amonijevim acetatom (NH₄Ac) izlužene in z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS) izmerjene koncentracije kovin, ki naj bi bile po Ernstu (1996) dobro merilo rastlinam dostopne frakcije kovin v tleh, so predstavljale do 40 %, 28,9 % in 16,8 % celokupne koncentracije Cd, Pb oz. Zn v žerjavskih tleh. Koncentracije kovin, izlužene z NH₄Ac v primerjavi s celokupnimi koncentracijami kovin v tleh niso boljše merilo za dostopnost kovin za vrsto *S. caprea* iz Žerjava. Amonacetetna ekstrakcija kovin je pokazala, podobno kot je za žerjavsko tla že poročala Grčmanova (2001), da je Cd za rastline dostopen najbolj, Zn pa najmanj.

Analize rastlinskih tkiv so pokazale, da so koncentracije Pb (332 – 10800 mg kg⁻¹ SM Pb), Cd (17,5 - 220 mg kg⁻¹ SM Cd) in Zn (114 – 793 mg kg⁻¹ SM Zn) v koreninah rastlin *S. caprea* iz Žerjava v primerjavi z rastlinami z neonesnaženega območja zelo povečane in za vse kovine značilno višje ($p < 0,05$), medtem ko so koncentracije v listih bistveno nižje (88,8 - 257 mg kg⁻¹ SM Pb, 19,1 - 96,8 mg kg⁻¹ SM Cd, 120 - 361 mg kg⁻¹ SM Zn), razlika pa je le v primeru Cd značilna ($p < 0,05$). Iz bioakumulacijskih (BAI) in translokacijskih (TI) indeksov ter regresijskih krivulj za strategijo privzema kovin pri ivi *S. caprea* iz Žerjava lahko zaključimo, da vrsta *S. caprea* iz Žerjava uspešno izključuje Pb in ga v veliki meri kopiči v koreninah (mediana BAI_{listi} = 0,03; mediana TI = 0,12), Cd pa predvsem na manj onesnaženih ploskvah zmerno/neizrazito akumulira v listih (mediana BAI_{listi} = 1,10; mediana TI = 0,66). Za Zn, ki je esecialna kovina, ima rastlina zagotovo razvito strategijo privzema, vendar na osnovi naših meritev nismo prepoznali nobene od treh strategij po Bakerju (1981). Na osnovi BAI in TI lahko trdimo, da se relativni privzem kovin v rastlino in njihov transport med koreninami in listi pri veliki koncentraciji

kovine v tleh zmanjša, kar pomeni, da se z večanjem onesnaženosti tal akumulacijska sposobnost rastline za kovino zmanjša. V našem primeru se je za Cd izkazala boljša akumulacija kovin približno do koncentracije 35 mg kg^{-1} SM Cd v tleh.

Med populacijama dreves z onesnaženega in neonesnaženega rastišča razen mogoče za Cd nismo našli razvite različne sposobnosti za kopičenje kovin v rastlinskih organih, a se je vrsta *S. caprea* iz Žerjava zaradi akumulacijskih sposobnosti za Cd vseeno izkazala potencialno uporabna za fitoekstrakcijo predvsem s kovinami zmerno onesnaženih tal. Za potrditev tega dejstva so v prihodnosti potrebne še študije letne proizvodnje biomase listov. Zaradi izrazitega izključevanja Pb so proučevana drevesa uporabna za imobilizacijo in fitostabilizcijo Pb v zelo obremenjenih tleh

Obseg privzema kovin v rastlino je odvisen od dostopnosti kovin, ki jo poleg celokupne koncentracije kovin v tleh določajo tudi kemijske lastnosti tal. V žerjavskih karbonatnih tleh nismo ugotovili vpliva pH tal in vsebnosti organske snovi na privzem kovin v rastline. Našli pa smo značilno pozitivno korelacijo med koncentracijo kovin v tleh z dušikom in fosfati oz. negativno korelacijo s Ca^{2+} v tleh ter koreninah (v primeru Cd tudi s koncentracijami kovin v listih).

Povišane koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v onesnaženih tleh v Žerjavu so močno korelirale z zmanjšanimi koncentracije mikronutrienta Fe v listih rastlin.

9 VIRI

- Adriano D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments – biogeochemistry, bioavailability and risks of metal. Springer Verlag, Berlin: 10-11, 264, 313, 349-410, 626-675.
- Alloway, B.J., 1990. Heavy metal in soils. London, Blackie, John Wiley & Sons: 339 str.
- Alvarez E., Fernandez Marcos M.L., Vaamonde C., Fernandez-Sanjurjo M.J. 2003. Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. The Science of the Total Environment 313: 185-197
- Analytical methods for atomic absorption spectrometry, 2000. PerkinElmer Instruments.
- Archer M.J.G., Caldwell R.A. 2004. Response of six Australian plant species to heavy metal contamination at an abandoned mine site. Water, Air, and Soil Pollution 157: 257-267.
- Arduini L., Godbold D.L., Onnis A., Stefani A. 1998. Heavy metal influence mineral nutrition of tree seedlings. Chemosphere 36 (4-5): 7
- Bačič T. 2003. Salix. V: N.Jogan (ur.): Razni določevalni ključ. Verzija 2.78. Samozaložba, Ljubljana. pp: 37-40.
- Baker A.J.M. 1981. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. Journal of Plant Nutrition 3: 643-654.
- Baker A.J.M. in Proctor J. 1990. The influence of cadmium, copper, lead and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. Plant Systematics and Evolution 173: 91-108.
- Baker A.J.M., Reeves R.D., Hajar A.S.M. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C Presl. (Brassicaceae). New Phytologist 127: 61-68
- Baker J.M., Walker P.L. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. V: Heavy metal tolerance in plants – Evolutionary aspects. Shaw J. (ur.). CRC Pres, Boca Raton, FL, USA: 155-177.
- Balsberg Pahlsson A. M. 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. A literature review. Water, Air and Soil Pollution 47: 287-319.
- Barceló J. in Poschenrieder C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress. A review. Journal of Plant Nutrition 13, 1: 1-37.
- Barker, A.V., Pilbeam D.J. 2007. Iron. V: Handbook of plant nutrition. Taylor & Francis Group, Boca Raton: 329-350
- Biportal. BioPortalov Kartni stroj. Center za kartografijo favne in flore. www.biportal.si (3.6.2006)
- Blaylock, M.J., Huang, J.W. 2000. Phytoextraction of metals. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (ur.), Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment. John Wiley & Sons Inc, New York, USA, str. 53-71.
- Briat J.F., Lebrun M. 1999. Plant responses to metal toxicity. Comp.R. Acad. Sci. Paris 322: 43-54.

- Brooks R.R. 2000. Geobotany and hyperaccumulators. V: Plants that hyperaccumulate heavy metals. Their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. Brooks R. R. (ur.). Second edition. NY, USA, CAB International: 55-93.
- Brus R. 2004. Drevesne vrste na Slovenskem, Mladinska knjiga, Ljubljana: 320-321.
- Clemens, S., Palmgren M.G., Kramer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends in Plant science 7 (7): 309-31
- Cohen C.K., Fox T.C., Garvin D.F., Kochian L.V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. Plant Physiology 116: 1063-1072
- Dahnke W.C. 1990. Testing soils for available nitrogen. V: Soil testing and plant analysis. Westerman R.L. (ur.) Soil Sci. Soc. Am. Book series 3 ASA Madison WI: 120-140.
- Delisle G., Champoux M., Hounde M. 2001. Characterization of oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. Plant Cell Physiology 42: 324-333
- Dickinson N.M., Pulford I.D. 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. Environment International 31: 609-613.
- Dos Santos Utmazian M.N., Wenzel W.W. 2007. Cadmium and zinc accumulation in willow and poplar species grown on polluted soils Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences 170: 265-272
- Družkovič B. 1985. Spremembe rastlinskih populacij v okolici topilnice svinca. Biološki vestnik 33, 2: 23-38.
- Eltrop L., Brown G., Joachim O., Brinkmann K. 1991. Lead tolerance of *Betula* and *Salix* in the mining area of Mechernich / Germany. Plant and Soil 131: 275-285
- Ernst W. H. O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soil by plants. Applied Geochemistry 11: 136-167.
- Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H. 1992. Metal tolerance in plants. Acta Botanica Neerlandica 41: 229-248
- Fajmut A. 1978. Vpliv načina dela metalurških agregatov rudnikov svinca in topilnice Mežica in meteoroloških pogojev na onesnaženje zraka v Gornji Mežiški dolini. Magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, FNT, Oddelek za montanistiko. Ljubljana, 34-36 in 153-156.
- Farago M.E. 1981. Metal tolerant plants. Coordination Chemistry Reviews 36: 155-182
- Fugaš M., Hršak J., Souvent P. 1984. The effect of a new emission control system on lead, zinc and cadmium concentrations in the environment of a lead smeltery. Staub-Reinhalt Luft 44: 273-275.
- Garbisu C., Alkorta I. 2001. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. Bioresource Technology 77: 229-236
- Geografski atlas Slovenije: država v prostoru in času. 1998. Ljubljana, Mladinska knjiga: str. 360
- Greger M. 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. V: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (ur.) Springer Verlag, Berlin

- Grčman H. 2001. Fitoekstrakcija onesnaženih tal s kontrolirano mobilizacijo težkih kovin. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. 99 str.
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Biology* 53: 1-11.
- History. MPI reciklaža d.o.o. Metalurgija, plastika, inženiring.
<http://www.rm-mpi.si/vsebina.php?name=zgodovina> (15.5.2007)
- Ivanov V.B., Bystrova E.I., Seregin I.V. 2003. Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (3): 398-406.
- Jiries A.G., Nasir F.A., Beese F. 2002. Pesticide and heavy metal residue in wastewater, soil and plants in wastewater disposal site near Al-Lajoun valley, Karak/Jordan. *Water, Air, and Soil Pollution* 133: 97-107.
- Kabata-Pendias A. in Pendias H. 1984. Trace elements in soils and plants. Boca Raton, Florida, USA; CRC Press, Inc.: 315 str.
- Kahle H. 1993. Responses of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 21-27.
- Kandeler E. 1995. Organic matter by wet combustion. V: *Methods in Soil Biology*. Schinner F., Kandeler E., Margesin R. (ur.) Springer Verlag, Berlin: 397-398.
- Khan A. G., Kuek C., Chaudhry T.M., Khoo C.S., Hayes W.J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207.
- Kayser A., Wenger K., Keller A., Attinger W., Felix H.R., Gupta S.K., Schulin R. 2000. Enhancement of phytoextraction of Zn, Cd, and Cu from calcareous soil: The Use of NTA and Sulfur Amendments. *Environmental Science Technology* 34: 1778-1783
- Keller C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeckl M., Sennhauser M. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil* 249: 67-81
- Klang-Westin, E. and Eriksson, J.: 2003, 'Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils', *Plant Soil* 249: 127-137.
- Kugonič N. 1999. Pedološka analiza tal v Žerjavu. V sklopu projekta Simbiotske interakcije gliv in rastlin na onesnaženem področju v Žerjavu. Regvar M., Batič F., Vodnik D., Kugonič N., Turk B. (avtorji).
- Kugonič, N., Kopušar, N., 2000. Garden soil and vegetable pollution assessment of the Upper Meža valley. *Phyton (Austria)* 40: 117-121.
- Kump P. 2005. Rentgenska fluorescenca. *Kemija v šoli* 17: 9-16.
- Kuzovkina, Y. A., Quigley M. F., 2005. Willows beyond wetlands: uses of *Salix* L. species for environmental projects. *Water, Air, and Soil Pollution* 162: 183-204.
- Landberger T., Greger M. 1996. Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry* 11: 175-180.

- Larcher W. 2003. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. 4th edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 513 str.
- Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. J. Environ. Qual. 31: 109-120
- Leštan D. 2002. Ekopedologija. Študijsko gradivo za študente opredelilnega izbirnega študija Ekopedologije, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 277 str.
- Levy C., Joner E.J. 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. V: Trace metals in the rhizosphere. Bobran R. G., Wenzel W. W., Lombi E. (ur.) Florida, USA, CRC Press: 165-185.
- Marschner H. 1995. Ion uptake of individual cell and roots: Short distance transport. V: Mineral nutrition of higher plants. Marschner H. (ur.) London, UK, Academic Press.: 6-77.
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B. in Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije. Tretja izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana: 845 str.
- Martinez C.E., Motto H.L. 1999. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. Environmental Pollution 107: 153-158.
- Meda A.R., Scheuermann E.B., Prechsl U.E., Erenoglu B., Schaaf G., Hayen H., Weber G., von Wiren N. 2007. Iron acquisition by phytosiderophores contributes to cadmium tolerance. Plant Physiology 143: 1761-1773
- Memon A.R., Aktoprakligul D., Zdemur A., Vertii A., Bütak T. 2001. Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants. Turk J Botany 25: 111-121.
- Mršić N. 1997. Živali naših tal. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana: 44-53.
- Nečemer M., Kump P., Rajčević M., Jačimovič R., Budič B., Ponikvar M. 2003. Determination of sulfur and chlorine in fodder by X-ray fluorescence spectral analysis and comparison with other analytical methods. Spectrochimica Acta. Part B 58: 1367-1373.
- Nissen L.R. in Lepp N. W. 1997. Baseline concentrations of Cu and Zn in shoot tissues of a range of Salix species. Biomass and Bioenergy 12 (2): 115-120
- Öhlinger R. 1995. Acidity. V: Methods in soil biology. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (ur.) Springer Verlag, Berlin: 396
- Olsen S. R., Sommers L.E. 1982. Phosphorus. A.L. Paget al. (eds.) Methods of soil analysis. Part 2. Agron.Mongr.9. 2nd edition. ASA and SSSA, Madison, WI: 403-430.
- Pačnik, L., 2002. Uvod (Zvezek 1). V: Primerjalna študija onesnaženosti okolja v Zgornji Mežiški dolini med stanji v letih 1989 in 2001. Končno poročilo. Ribarič Lasnik, C., Eržen, I., Kugonič, N., Pokorny, B., Končnik, D., Svetina, M., Justin, B., Druks, P., Bole, M., Rošar Drev, A., Vetrih, M., Flis, J., Kotnik, K., Mausar, R., Pačnik, L., Savinek, K. Velenje, ERICo Velenje. 32 str.
- Prpić-Majjić D. 1996. Iztraživanje olova, kadmija i cinka u dolini rijeke Meže. Zagreb, Institut za medicinska iztraživanja i medicinu rada: 1-6, 27-55, 127-136.
- Pulford I.D., Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. Environmental International 29: 529-540

- Punshon T., Dickinson N. 1997. Acclimation of *Salix* to metal stress. *New Phytologist* 137: 303-314
- Raskins I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., Salt E.A. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current opinion in biotechnology* 5: 285-290.
- Regvar M., Batič F., Vodnik D., Debeljak N., Kugonič N., Turk B., Likar M., Vogel-Mikuš K., Piltaver A., Golobinek V., Smith J. 2001. Simbiotske interakcije gliv in rastlin na onesnaženem območju v Žerjavu. *Zaključno poročilo 1999-2000*.
- Regvar M., Vogel K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal succession at a metal polluted site – indications for the direction of phytostabilisation? *Environmental pollution* 144: 976-984
- Rosseli W., Keller C., Boschi K., 2003. Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil* 256: 265-272.
- Ross S.M. 1996. Toxic metals: Fate and distribution in contaminated ecosystems V: The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. (ur. Ross, S.M.) John Wiley & Sons Ltd.
- Ross S.M., Kaye K.J. 1996. The meaning of metaltoxicity in soil plant system. V: The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. (ur. Ross, S.M.) John Wiley & Sons Ltd.
- Robinson B.H., Mills T.M., Petit D., Fung L.E., Green S.R., Clothier B.E. 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implication for phytoremediation. *Plant Soil* 227: 301-306.
- Qian J., Shan X., Wang Z., Qiang T. 1996. Distribution and plant availability of heavy metals in different particle-size fractions of soil. *The Science of the Total Environment* 187: 131-141
- Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995. Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology* 13: 468-474.
- Saxena P.K., KrishnaRaj S., Dan T. Perras M.R., Vettakkorumakankav N.N. 1999. Phytoremediation of heavy metal contaminated and polluted soils. V: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (ur.) Springer Verlag, Berlin: 304-329
- Seregin I.V. in Ivanov V.B. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 48: 523-544.
- Singh R.P., Tripathi R.D., Sinha S.K., Maherwari R., Srivastava H.S. 1997. Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 34 (11): 2467-2493
- Soils 101-Introduction to soils. College of Agricultural Sciences, Department of crop and soil science, Crops-Soils-Turf. <http://cropsoil.psu.edu/Courses/SOILS101/Soils101.html> (6.5.2006)
- Souvent P. 1992. Svinec, metalurgija in okolje. *Rudarsko metalurški zbornik* 39, 3-4: 447-469.
- Stoltz, E., Greger, M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 47: 271-280.
- Taiz L., Zeiger E. 2002. Plant physiology. 3rd edition. The Benjamin / Cummings Publishing Company. Inc. Reywood City, California.

Theory, X-ray fluorescence (XRF). University of Minnesota.

<http://mxp.physics.umn.edu/s04/Projects/s04/theory.htm> (3.4.2006)

Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to *Nramp* genes. PNAS 97 (9): 4991-4996

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

Uredba o vnosu nevarnih snovi in rastlinskih hranil v tla; Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Uradni list RS št. 68/96.

Vandecasteele B., De Vos B., Tack F.M.G. 2002. Cadmium and Zinc uptake by volunteer willow species and elder rooting in polluted dredged sediment disposal sites. The Science of the Total Environment 299: 191-205.

Vashegyi A., Mezosi G., Barta K., Farsang A., Dormány G., Bartha B., Pataki S., Erdei L. 2005. Phytoremediation of heavy metal pollution: A case study. Acta Biologica Szegediensis 49 (1-2): 77-79.

Vervaeke P., Luyssaert S., Mertens J., Meers E., Tack F.M.G., Lust N. 2003. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. Environmental Pollution 126: 275-282

Vidic in sod. T., Jogan N., Drobne D. in Vilhar B. 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Žerjav, Slovenia. Environ. Science Technology 40 (13): 4119-4125.

Vogel-Mikuš K., 2006. Privzem Zn, Cd in Pb ter arbuskularna mikoriza pri ranem mošnjaku *Thlaspi praecox* Wulfen (Brassicaceae). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. 124 str.

Vogel-Mikuš K., Drobne D., Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia. Environmental Pollution 133, 2: 233-242.

Wenzel W.W., Jockwer F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. Environmental Pollution 104: 145-155.

Wenzel W.W., Lombi E., Adriano D.C. 1999. Biogeochemical processes in the rizosphere: role in phytoremediation of metal-polluted sites. V: Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (ur.) Springer Verlag, Berlin: 273-303.

Wenzel W.W., Wieshammer G., Sommer P., Unterbrunner R., Puschenreiter M., Dos Santos M.N. 2005. Phytoremediation of metal contaminated soil using trees (*Salix/Populus sp.*): Prospects and limitations. University of natural resources and applied life sciences Vienna, Department of forestry and soil sciences.

http://proland.iung.pulawy.pl/materials/wp2/day_2/10_wieshammer_soilrem_2004.pdf (10.4.2006)

Wilkinson D.M. in Dickinson N.M. 1995. Metal resistance in trees: The role of mycorrhizae. Oikos 72 (2): 298-300

Witting R. 1993. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. V: Plants as biomonitors. Markert B. (ur.) Weinheim, New York, Basel Cambridge: 3-27

Yanqun Z., Yuan L., Schvartz C., Langlade L., Fan L. 2004. Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead zinc area, China. Environmental International 30: 567-576

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Marjani Regvar za pomoč in nasvete pri oblikovanju pisnega izdelka diplomske naloge.

Doc. dr. Barbari Vilhar hvala za številne koristne nasvete, prof. dr. Alenki Gabersčik pa za hiter pregled naloge.

Matevžu se zahvaljujem za pomoč pri izvedbi praktičnega dela naloge, za začetne statistične lekcije pri obdelavi podatkov in za fotografije, ki sem jih sama pozabila narediti. Mileni za tehnično pomoč, Pauli za pomoč pri meritvah z AAS in posredovanju literature, Katarini pa za vse odgovore na moja vprašanja.

Hvala vsem CKFF-jevcem za spodbudo, prijaznost in za vse, kar ste me naučili. To znanje je nepogrešljivo. Katja, hvala za wordove lekcije tik pred zdajci.

Hvala dr. Petru Kumpu in dr. Marijanu Nečemru z Inštituta Jožef Štefan, da sta omogočila izvedbo meritev z XRF, Katedri za zoologijo za uporabo AAS, Katedri za mikrobiologijo pa za spektrometrične meritve oblik dušika in fosfatov v tleh.

Najlepše se zahvaljujem tudi tebi Petra, za pomoč in družbo pri izdelovanju tabletk in meritvah z XRFS.

Posebna hvala gre tudi Janji. In hvala vsem ostalim, ki sem jih pozabila omeniti, pa bi jih morala.

Mojca hvala, da si mi pomagala in me prenašala v času mojega študija.

Svojima staršema posvečam tole diplomo. Brez vaju tega dela ne bi bilo. Hvala, da sta mi omogočila študij in mi ves čas stala ob strani. Hvala za vse, kar sta mi dala. In za potrpežljivo prenašanje skrbi, ki sem vama jih nalagala s potepanjem po terenu.

Priloga A1:

Rezultati meritev celokupnih koncentracij Pb v rizosferni zemlji, koreninah in listih ive *S. caprea*, z amonijevim acetatom in vodo izluženih koncentracij Pb v tleh (preračunano tudi na delež celokupne koncentracije) ter vrednosti bioakumulacijskih (BAI, BAI-NH₄Ac) in translokacijskih indeksov (TI). Vse meritve so izražene v mg kg⁻¹ SM (suhe mase), razen BAI, TI, ki so brez enot in stolpcev v tabeli, ki so izraženi v %. Vzorec P4V4, ki je zapisan s sivo barvo, je osamelec in ga pri analizah nismo upoštevali.

	Ploskev	Vrba	Pb tla	Pb NH ₄ Ac	Pb NH ₄ Ac / Pb tla	Pb H ₂ O	Pb H ₂ O / Pb tla	Pb kor	Pb list	TI Pb	BAI Pb kor	BAI-NH ₄ Ac Pb kor	BAI Pb list	BAI-NH ₄ Ac Pb list
ŽERJAV	p1	2	1170	203,1	17,36%	2,72	0,23%	697	195	0,28	0,6	3,43	0,17	0,96
	p1	4	592	45,32	7,66%	2,79	0,47%	1570	178	0,11	2,65	34,64	0,3	3,93
	p1	6	7230	1415	19,57%	11,12	0,15%	10800	183	0,02	1,49	7,63	0,03	0,13
	p1	7	788	61,7	7,83%	5,61	0,71%	549	173	0,32	0,7	8,90	0,22	2,80
	p2	1	8810	1593	18,08%	17,14	0,19%	8010	184	0,02	0,91	5,03	0,02	0,12
	p2	2	7670	1692	22,06%	12,64	0,16%	5380	168	0,03	0,7	3,18	0,02	0,10
	p2	3	9350	1889	20,20%	13,31	0,14%	3500	206	0,06	0,37	1,85	0,02	0,11
	p2	4	6100	863,6	14,16%	13,14	0,22%	1540	257	0,17	0,25	1,78	0,04	0,30
	p2	5	9410	2078	22,08%	18,88	0,20%	3390	245	0,07	0,36	1,63	0,03	0,12
	p3	1	2230	143,3	6,43%	8,835	0,40%	575	105	0,18	0,26	4,01	0,05	0,73
	p3	2	1104	69,8	6,32%	5,488	0,50%	542	119	0,22	0,49	7,77	0,11	1,70
	p3	4	5430	589,1	10,85%	13,31	0,25%	1350	173	0,13	0,25	2,29	0,03	0,29
	p3	5	4280	614,9	14,37%	14,14	0,33%	1580	132	0,08	0,37	2,57	0,03	0,21
	p3	6	3180	245,3	7,71%	11,95	0,38%	712	165	0,23	0,22	2,90	0,05	0,67
	p4	1	6080	1755	28,87%	21,46	0,35%	3830	100	0,26	0,63	2,18	0,02	0,06
	p4	2	7320	1654	22,60%	25,58	0,35%	2540	118	0,05	0,35	1,54	0,02	0,07
	p4	3	4600	867,3	18,85%	18,43	0,40%	1730	88,8	0,05	0,38	1,99	0,02	0,10
	p4	4	10900	1343	12,32%	45,82	0,42%	299	120	0,4	0,03	0,22	0,01	0,09
	p4	5	922	97,17	10,54%	7,264	0,79%	332	151	0,45	0,36	3,42	0,16	0,16
POKLJUKA	p5	1	103	6,856	6,66%	0,626	0,61%	203	149	0,73	1,97	29,61	1,45	21,73
	p5	2	118	3,086	2,62%	0,607	0,51%	22,3	152	6,82	0,19	7,23	1,29	49,25
	p5	3	110	2,546	2,31%	0,963	0,88%	136	24	0,18	1,24	53,42	0,22	9,43
	p5	4	110	2,593	2,36%	0,571	0,52%	171	157	0,92	1,55	65,95	1,43	60,55
	p5	5	18	2,487	14,21%	1,041	5,95%	30,6	105	3,43	1,7	12,30	5,83	42,22
	p6	1	189	2,847	1,51%	2,108	1,12%	117	111	0,95	0,62	41,10	0,59	0,59
	p6	2	191	3,779	1,98%	2,239	1,17%	96,6	160	1,66	0,51	25,56	0,84	42,34
	p6	3	176	3,437	1,95%	1,86	1,06%	89,3	312	3,49	0,51	25,98	1,77	1,77
	p6	4	152	3,534	2,33%	1,749	1,15%	103	103	1	0,68	29,15	0,68	29,15
	p6	5	138	4,072	2,95%	1,891	1,37%	114	64,1	0,56	0,83	28,00	0,46	15,74

Priloga A2:

Rezultati meritev celokupnih koncentracij Cd v rizosferni zemlji, koreninah in listih ive *S. caprea*, z amonijevim acetatom in vodo izluženih koncentracij Cd v tleh (preračunano tudi na delež celokupne koncentracije) ter vrednosti bioakumulacijskih (BAI, BAI-NH₄Ac) in translokacijskih indeksov (TI). Vse meritve so izražene v mg kg⁻¹ SM (suhe mase), razen BAI, TI, ki so brez enot in stolpcem v tabeli, ki so izraženi v %. Vzorec P4V4, ki je zapisan s sivo barvo, je osamelec in ga pri analizah nismo upoštevali.

	Ploskev	Vrba	Cd tla	Cd NH ₄ Ac	Cd NH ₄ Ac / Cd tla	Cd H ₂ O	Cd H ₂ O / Cd tla	Cd kor	Cd list	TI Cd	BAI Cd kor	BAI-NH ₄ Ac Cd kor	BAI Cd list	BAI-NH ₄ Ac Cd list
ŽERJAV	p1	2	13,2	2,60	19,70%	0,12	0,92%	25,1	43,8	1,75	1,9	9,65	3,32	16,85
	p1	4	8,5	0,90	10,65%	0,13	1,54%	30,6	24,3	0,79	3,6	33,85	2,86	26,88
	p1	6	41,1	13,37	32,53%	0,16	0,38%	220	42,7	0,19	5,35	5,35	1,04	3,19
	p1	7	11,3	1,24	10,99%	0,10	0,89%	18,1	23	1,27	1,6	14,57	2,04	18,52
	p2	1	37,8	11,46	30,32%	0,20	0,52%	211	44,2	0,21	5,58	18,41	1,17	3,86
	p2	2	65,5	23,93	36,53%	0,27	0,41%	193	96,8	0,5	2,95	8,07	1,48	3,86
	p2	3	80,5	27,02	33,57%	0,29	0,35%	198	55,4	0,28	2,46	7,33	0,69	2,05
	p2	4	54,9	13,26	24,15%	0,24	0,44%	22,4	51,4	2,29	0,41	1,69	0,94	3,88
	p2	5	52,6	20,56	39,09%	0,24	0,45%	96,3	60,6	0,63	1,83	4,68	1,15	2,95
	p3	1	32,1	4,48	13,97%	0,21	0,66%	23,4	21	0,9	0,73	5,22	0,65	4,68
	p3	2	15,2	2,41	15,88%	0,17	1,13%	17,5	25,4	1,45	1,15	7,25	1,67	10,52
	p3	4	48,5	10,01	20,64%	0,22	0,44%	43	24,9	0,58	0,89	4,30	0,51	2,49
	p3	5	20,5	4,66	22,72%	0,15	0,74%	40,5	36,5	0,9	1,98	8,69	1,78	7,84
	p3	6	35,9	5,11	14,24%	0,22	0,61%	42,4	24,8	0,58	1,18	8,30	0,69	4,85
	p4	1	53,8	21,52	40,00%	0,21	0,39%	50,8	24	0,47	0,94	2,36	0,45	1,12
	p4	2	44,2	15,69	35,50%	0,15	0,33%	34,7	23,9	0,69	0,79	2,21	0,54	1,52
	p4	3	49,9	16,07	32,20%	0,17	0,34%	33,8	19,1	0,57	0,68	2,10	0,38	1,19
	p4	4	141,0	38,83	27,54%	0,74	0,53%	22,1	20,2	0,91	0,16	0,57	0,14	0,52
	p4	5	13,7	1,77	12,88%	0,04	0,32%	49,5	41,1	0,83	3,61	28,05	3	23,29
POKLJUKA	p5	1	2,8	0,36	12,73%	0,02	0,67%	9,4	5,75	0,61	3,33	26,18	2,04	2,04
	p5	2	7,5	0,39	5,17%	0,04	0,51%		6,37				0,85	16,42
	p5	3	6,0	0,38	6,40%	0,04	0,59%	7,27	7,56	1,04	1,22	18,98	1,26	19,74
	p5	4	3,3	0,39	11,66%	0,04	1,14%	16,6	9,62	0,58	5	42,89	2,9	24,86
	p5	5		0,43		0,06			22,2					
	p6	1	4,8	0,30	6,26%	0,06	1,22%	8,32	21,3	2,56	1,75	27,92	4,47	71,48
	p6	2	4,9	0,39	8,11%	0,06	1,19%	8,4	18,7	2,23	1,73	21,32	3,85	47,46
	p6	3	6,2	0,36	5,84%	0,04	0,58%	13,1	14,3	1,09	2,12	36,29	2,31	39,61
	p6	4	6,6	0,35	5,39%	0,07	1,04%	18,8	21,2	1,13	2,86	53,11	3,23	59,89
	p6	5	6,9	0,27	3,99%	0,07	0,99%	12	8,88	0,74	1,75	43,80	1,29	32,41

Priloga A3:

Rezultati meritev celokupnih koncentracij Zn v rizosferni zemlji, koreninah in listih ive *S. caprea*, z amonijevim acetatom in vodo izluženih koncentracij Zn v tleh (preračunano tudi na delež celokupne koncentracije) ter vrednosti bioakumulacijskih (BAI, BAI-NH₄Ac) in translokacijskih indeksov (TI). Vse meritve so izražene v mg kg⁻¹ SM (suhe mase), razen BAI, TI, ki so brez enot in stolpcev v tabeli, ki so izraženi v %. Vzorca P4V4 in P6V3, ki sta zapisana s sivo bravo, sta osameleca in ju pri analizah nismo upoštevali.

	Ploskev	Vrba	Zn tla	Zn NH ₄ Ac	Zn NH ₄ Ac / Zn tla	Zn H ₂ O	Zn H ₂ O / Zn tla	Zn kor	Zn list	TI Zn	BAI Zn kor	BAI-NH ₄ Ac Zn kor	BAI Zn list	BAI-NH ₄ Ac Zn list
ŽERJAV	p1	2	266,0	9,51	3,57%	0,16	0,06%	175	248	1,42	0,66	18,41	0,93	26,09
	p1	4	342,0	3,95	1,16%	0,17	0,05%	162	120	0,74	0,47	41,00	0,35	30,37
	p1	6	1140,0	4,66	0,41%	0,91	0,08%	114	171	1,5	0,1	24,47	0,15	36,70
	p1	7	201,0	7,06	3,51%	0,12	0,06%	126	165	1,31	0,63	17,84	0,82	23,36
	p2	1	998,0	78,71	7,89%	1,03	0,10%	793	254	0,32	0,79	10,07	0,25	3,23
	p2	2	1150,0	69,82	6,07%	1,12	0,10%	757	361	0,48	0,66	10,84	0,31	5,17
	p2	3	1180,0	34,53	2,93%	0,66	0,06%	590	328	0,56	0,5	17,09	0,28	9,50
	p2	4	1330,0	26,10	1,96%	0,62	0,05%	257	276	1,07	0,19	9,85	0,21	10,57
	p2	5	1340,0	65,50	4,89%	1,48	0,11%	437	240	0,55	0,33	6,67	0,18	3,66
	p3	1	375,0	14,97	3,99%	0,68	0,18%	420	137	0,33	1,12	28,06	0,37	9,15
	p3	2	125,0	6,80	5,44%	0,42	0,33%	135	184	1,36	1,08	19,84	1,47	27,04
	p3	4	586,0	27,57	4,70%	1,22	0,21%	292	192	0,66	0,5	10,59	0,33	6,96
	p3	5	270,0	15,27	5,66%	0,58	0,22%	236	292	1,24	0,45	15,46	1,08	19,12
	p3	6	409,0	11,01	2,69%	0,66	0,16%	186	168	0,9	0,45	16,89	0,41	15,26
	p4	1	978,0	164,30	16,80%	4,81	0,49%	557	175	0,31	0,57	3,39	0,18	1,07
	p4	2	857,0	104,30	12,17%	4,04	0,47%	637	174	0,27	0,74	6,11	0,2	1,67
	p4	3	857,0	137,50	16,04%	3,84	0,45%	347	180	0,52	0,4	2,52	0,21	1,31
	p4	4	1840,0	114,50	6,22%	10,33	0,56%	128	126	0,98	0,07	1,12	0,07	1,10
	p4	5	157,0	11,01	7,01%	0,29	0,18%	253	217	0,86	1,61	1,61	1,38	1,38
POKLJUKA	p5	1	54	2,11	3,90%	0,22	0,41%	67,1	118	1,76	1,24	31,88	2,19	56,06
	p5	2	192	1,19	0,62%	0,24	0,12%	88,9	241	2,71	0,46	74,89	1,26	203,03
	p5	3	38,5	1,82	4,71%	0,13	0,32%	78,1	79	1,01	2,03	43,03	2,05	43,53
	p5	4	203	1,06	0,52%	0,22	0,11%	401	125	0,31	1,98	377,55	0,62	117,69
	p5	5	41,2	1,09	2,64%	0,18	0,44%	103	834	8,08	2,5	94,67	20,42	766,54
	p6	1	344	1,20	0,35%	0,51	0,15%	106	116	1,09	0,31	88,33	0,34	96,67
	p6	2	243	3,23	1,33%	0,64	0,26%	84,9	120	1,41	0,35	26,33	0,49	37,21
	p6	3	457	1,49	0,33%	0,30	0,07%	81,4	1910	23,46	0,18	54,74	1,88	1284,47
	p6	4	282	0,92	0,33%	0,42	0,15%	85,2	261	3,06	0,3	92,31	0,93	282,77
	p6	5		1,32		0,07		491	186	0,38				140,80

Priloga A4:

Rezultati meritev kemijskih lastnosti tal (pH, vsebnosti organske snovi, amonijevega (N-NH₄) in nitratnega (N-NO₃) dušika, dostopnega fosforja (P)) ter rastlinskih nutrientov Ca, K in Fe v tleh, koreninah in listih *S. caprea*. Organska snov je izražena v %, pH je brez enot, vrednosti v stolpcih označenih z * so podani v mg kg⁻¹ SM (suha masa), vse ostale vrednosti pa v g kg⁻¹ SM.

	Ploskev	Vrba	Org. snov	N-NH ₄ *	N-NO ₃ *	P dostopni*	pH	Ca tla	K tla	Fe tla	Ca kor	K kor	Fe kor	Ca list	K list	Fe list*
ŽERJAV	p1	2	6,3	19,7	2,2	25,4	7,77	191	8,48	6,66	12,4	0,57	0,361	11,10	11,40	70,00
	p1	4	1,6	12,4	0,8	9,3	7,57	194	9,44	9,11	22,3	2,90	1,440	9,90	11,70	41,40
	p1	6	8,5	28,4	0,9	33,8	7,57	183	9,20	17,70	8,11	16,00	0,167	12,90	10,40	22,50
	p1	7	2,5	8,6	0,5	11,1	7,55	210	6,49	5,88	15,6	6,19	0,727	15,00	6,68	95,30
	p2	1	15,9	70,5	4,8	112,0	7,73	199	4,67	6,95	25,1	26,70	0,756	14,90	16,50	46,90
	p2	2	11,6	34,0	1,8	184,8	7,65	175	7,68	10,90	19,2	8,65	2,500	13,20	11,80	58,10
	p2	3	13,6	40,3	3,3	128,1	7,58	159	4,23	14,30	13,7	0,57	0,536	15,90	8,41	46,50
	p2	4	25,0	56,8	3	225,4	7,82	130	9,61	22,80	7,39	2,73	1,230	9,95	11,20	25,20
	p2	5	21,6	43,8	2,7	103,0	7,55	159	3,29	13,50	15,6	2,39	0,958	12,30	11,10	32,70
	p3	1	42,0	64,9	5,6	90,5	7,63	160	2,51	5,49	16,5	0,57	0,381	8,30	7,11	51,70
	p3	2	24,7	25,8	1,7	60,7	7,48	183	0,91	3,15	12,5	2,39	0,423	10,10	7,14	49,60
	p3	4	52,4	68,5	3,9	55,9	7,13	144	2,66	7,61	13,5	1,56	0,463	6,58	5,26	19,90
	p3	5	20,3	33,7	3,3	51,7	7,63	189	3,41	3,92	14,5	0,88	0,470	7,30	2,89	51,50
	p3	6	38,8	65,1	5,3	71,4	7,60	142	2,86	9,24	15,5	3,52	0,617	9,74	7,08	43,60
	p4	1	22,9	38,8	1,9	60,1	7,30	204	4,15	2,40	10,9	3,49	0,183	12,10	5,68	26,70
	p4	2	32,9	113,0	3,8	97,7	7,68	178	2,33	3,45	27,2	2,30	0,508	8,09	9,80	30,50
	p4	3	28,1	54,3	1,5	71,4	7,32	167	3,13	5,08	10,8	5,10	0,375	6,82	9,98	56,10
	p4	4	79,4	480,0	5,8	120,4	6,87	45	3,89	18,40	7	4,27	0,090	5,80	7,50	19,10
	p4	5	19,7	57,0	5,3	35,6	7,43	144	4,04	12,70	13,1	2,66	0,389	10,40	10,60	20,40
POKLJUKA	p5	1	17,0	7,4	1,4	31,4	7,37	186	8,65	10,80	4,61	1,75	0,442	23,70	15,10	171,00
	p5	2	12,3	9,9	1,1	21,3	7,50	199	5,01	7,96	8,02	2,87	0,596	24,00	9,18	89,90
	p5	3	18,1	10,3	1	25,4	7,73	233	6,36	9,99	11	5,87	0,448	32,70	6,27	184,00
	p5	4	22,9	12,8	0,9	37,4	7,47	183	6,68	10,40	11,7	4,36	0,916	21,30	11,00	162,00
	p5	5	30,1	11,9	1,4	75,6	7,63	239	3,73	10,70	12,9	4,64	1,010	28,10	6,15	77,00
	p6	1	7,0	4,5	0,2	13,5	7,60	337	5,02	2,45				3,37	5,25	127,00
	p6	2	21,2	8,6	0,6	33,2	7,53	309	5,30	4,17	5,99	2,28	0,294			
	p6	3	8,7	5,3	0,5	18,3	7,47	344	2,06	3,05	19,1	1,45	0,410			
	p6	4	5,7	4,9	0,3	38,0	7,80	382	18,10	0,13				25,90	7,51	148,00
	p6	5	5,3	3,3	0,5	5,7	7,77				12,4	2,67	0,284	25,50	14,80	

Priloga B:

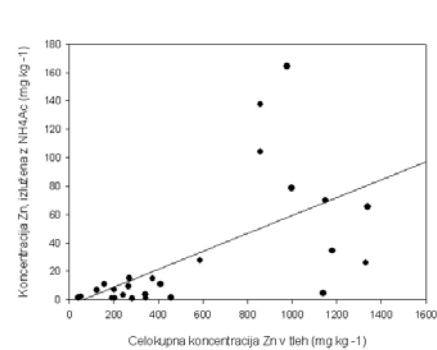
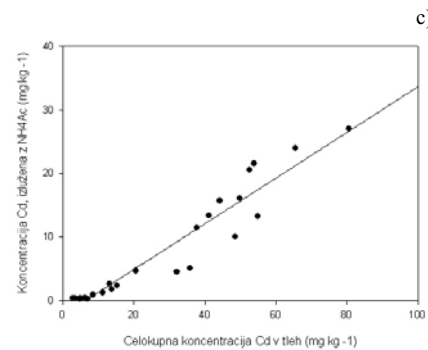
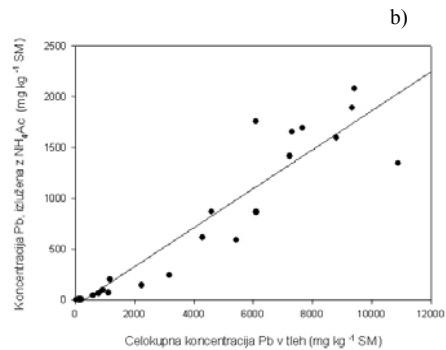
Razponi vrednosti (min-max) celokupnih koncentracij kovin Pb, Cd in Zn v rizosferni zemlji, koreninah in listih ive *S. caprea*, z amonijevim acetatom (NH₄Ac) in vodo (H₂O) izluženih koncentracij kovin v tleh, nekaterih kemijskih lastnosti tal in koncentracij nutrientov Ca, K in Fe v rastlinah na vzorčnih ploskvah P1-P6 (P1-P4 – onesnaženo, P5-P6 – neonesnaženo). V oklepajih so podane vrednosti median. Črke označujejo statistično značilne razlike med ploskvami (Kruskal-Wallis ANOVA test), p < 0,05. n = 4-5

	Vzorčna ploskev					
	ŽERJAV			POKLJUKA		
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Pb tla (mg kg ⁻¹ SM)	592-7230 (979) ^b	6100-9410 (8810) ^a	1104-5430 (3180) ^b	922-7320 (5340) ^b	17,5-118 (110) ^b	138-191 (176) ^c
Pb NH₄Ac (mg kg ⁻¹ SM)	45,32-1415 (132,4) ^c	863,6-2078 (1692) ^a	69,8-614,9 (245,3) ^{bc}	97,17-1755 (1260) ^{ab}	2,49-6,86 (2,59) ^d	2,85-4,07 (3,53) ^d
Pb H₂O (mg kg ⁻¹ SM)	2,72-11,12 (4,2) ^c	12,64-18,88 (13,31) ^{ab}	5,48-14,14 (11,95) ^{bc}	7,26-25,58 (19,95) ^a	0,57-1,04 (0,63) ^d	1,75-2,24 (1,89) ^d
Pb kor (mg kg ⁻¹ SM)	549-10800 (1133,5) ^{ab}	1540-8010 (3500) ^a	542-1580 (712) ^b	332-3830 (2135) ^{ab}	22,3-203 (136) ^d	89,3-117 (103) ^d
Pb list (mg kg ⁻¹ SM)	173-195 (180,5) ^a	168-257 (206) ^a	105-173 (132) ^b	88,8-151 (109) ^c	24-157 (149) ^{bc}	64,1-312 (111) ^{bc}
Cd tla (mg kg ⁻¹ SM)	8,49-41,4 (12,25) ^c	37,8-80,5 (54,90) ^a	15,2-48,5 (32,1) ^{bc}	13,7-53,8 (47,05) ^{ab}	2,82-7,51 (4,65) ^d	4,76-6,87 (6,18) ^d
Cd NH₄Ac (mg kg ⁻¹ SM)	0,90-13,37 (1,92) ^c	11,46-27,02 (20,56) ^a	2,41-10,01 (4,66) ^{bc}	1,77-21,52 (15,88) ^{ab}	0,36-0,43 (0,39) ^d	0,27-0,39 (0,35) ^d
Cd H₂O (mg kg ⁻¹ SM)	0,1-0,16 (0,13) ^b	0,2-0,29 (0,24) ^a	0,15-0,22 (0,21) ^a	0,04-0,21 (0,16) ^b	0,02-0,06 (0,04) ^c	0,04-0,07 (0,06) ^c
Cd kor (mg kg ⁻¹ SM)	18,1-220 (27,85) ^b	22,4-211 (193) ^a	17,5-43 (33,36) ^b	33,8-50,8 (42,1) ^{ab}	7,27-16,60 (9,4) ^c	8,32-18,8 (12,0) ^c
Cd list (mg kg ⁻¹ SM)	23,0-43,8 (33,5) ^b	44,2-96,8 (61,68) ^a	21,0-36,5 (24,9) ^b	19,1-41,1 (23,95) ^b	5,75-22,2 (7,56) ^c	8,88-21,3 (18,7) ^c
Zn tla (mg kg ⁻¹ SM)	201-1140 (304) ^b	998-1340 (1180) ^a	125-586 (375) ^b	157-978 (857) ^b	38,5-203 (54) ^c	243-344 (282) ^b
Zn NH₄Ac (mg kg ⁻¹ SM)	3,95-9,50 (5,86) ^c	26,10-78,71 (65,50) ^{ab}	6,80-27,57 (14,97) ^{bc}	11,01-164,30 (120,90) ^a	1,06-2,11 (1,19) ^d	0,92-3,22 (1,26) ^d
Zn H₂O (mg kg ⁻¹ SM)	0,12-0,91 (0,17) ^b	0,62-1,48 (1,03) ^a	0,42-1,22 (0,63) ^a	0,29-4,81 (4,04) ^a	0,13-0,24 (0,22) ^b	0,07-0,64 (0,42) ^b
Zn kor (mg kg ⁻¹ SM)	114-175 (144) ^{bc}	257-793 (590) ^a	135-420 (236) ^b	253-637 (452) ^a	67,1-401 (88,9) ^c	84,9-491 (95,6) ^c
Zn list (mg kg ⁻¹ SM)	120-248 (168) ^b	240-361 (276) ^a	137-292 (184) ^b	174-217 (177,5) ^b	79-834 (125) ^b	116-261 (153) ^b
pH (H ₂ O)	7,55-7,76 (7,57) ^{ab}	7,55-7,82 (7,65) ^a	7,13-7,63 (7,6) ^b	7,3-7,68 (7,38) ^c	7,37-7,73 (7,5) ^b	7,47-7,8 (7,6) ^{ab}
Organska snov (%)	1,60-8,51 (4,42) ^d	11,6-24,96 (15,91) ^c	20,33-52,37 (38,78) ^a	19,72-32,92 (25,49) ^{ab}	12,33-30,1 (18,06) ^{bc}	5,3-21,21 (6,97) ^d
NH₄-N (mg kg ⁻¹ SM)	8,6-28,4 (16,1) ^{bc}	34-70,5 (43,8) ^a	25,8-68,5 (64,9) ^a	38,8-113 (55,6) ^a	7,4-12,8 (10,3) ^b	3,3-8,6 (4,9) ^c
NO₃-N (mg kg ⁻¹ SM)	0,5-2,2 (0,9) ^b	1,8-4,8 (3) ^a	1,7-5,6 (3,9) ^a	1,5-5,3 (2,9) ^a	0,9-1,4 (1,1) ^b	0,2-0,6 (0,5) ^c
P dostopni (mg kg ⁻¹ SM)	9,31-33,79 (18,27) ^d	103,04-225,43 (128,1) ^a	51,70-90,50 (60,66) ^b	35,58-97,67 (65,73) ^b	21,25-75,58 (31,40) ^c	5,73-37,97 (18,27) ^{cd}
Ca tla (g kg ⁻¹ SM)	183-210 (192,5) ^b	130-199 (159) ^c	142-189 (160) ^c	144-204 (172,5) ^c	183-239 (199) ^b	309-382 (340,5) ^a
Ca kor (g kg ⁻¹ SM)	8,11-22,3 (14,0) ^{abc}	7,39-25,1 (15,6) ^a	12,5-16,5 (14,5) ^{ab}	7,0-27,2 (10,9) ^{bc}	4,61-12,9 (11,0) ^c	5,99-19,1 (12,4) ^c
Ca list (g kg ⁻¹ SM)	9,9-15,0 (12,0) ^b	9,95-15,9 (13,2) ^b	6,58-10,1 (8,3) ^c	5,8-12,1 (8,09) ^c	21,3-32,7 (24,0) ^a	3,37-25,9 (25,5) ^b
K tla (g kg ⁻¹ SM)	6,49-9,44 (8,84) ^a	3,29-9,61 (4,67) ^b	0,91-3,41 (2,66) ^c	2,33-4,15 (3,59) ^c	3,73-8,65 (6,36) ^{ab}	2,06-18,10 (5,16) ^b
K kor (g kg ⁻¹ SM)	0,57-16 (4,54) ^a	0,57-26,7 (2,73) ^a	0,57-3,52 (1,56) ^b	2,30-5,10 (3,49) ^a	1,75-5,87 (4,36) ^a	1,45-2,67 (2,28) ^b
K list (g kg ⁻¹ SM)	6,68-11,7 (10,9) ^{ab}	8,41-15,5 (11,2) ^a	2,89-7,14 (7,08) ^c	5,68-10,6 (9,8) ^b	6,15-15,1 (9,18) ^b	5,25-14,8 (7,51) ^b
Fe tla (g kg ⁻¹ SM)	5,88-1,77 (7,89) ^b	6,95-22,80 (13,50) ^a	3,15-9,24 (5,49) ^c	2,40-12,70 (4,27) ^c	7,96-10,80 (10,40) ^{ab}	0,13-4,17 (2,75) ^d
Fe kor (g kg ⁻¹ SM)	0,17-1,44 (0,54) ^b	0,54-2,50 (0,96) ^a	0,38-0,62 (0,46) ^c	0,09-0,51 (0,38) ^b	0,44-1,01 (0,59) ^b	0,28-0,41 (0,29) ^b
Fe list (mg kg ⁻¹ SM)	22,5-95,3 (55,7) ^b	25,2-58,1 (46,5) ^{bc}	19,9-51,7 (49,6) ^{bc}	19,1-56,1 (26,7) ^c	77-184 (162) ^a	127-148 (137,5) ^a

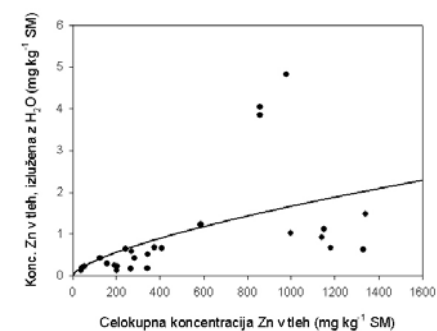
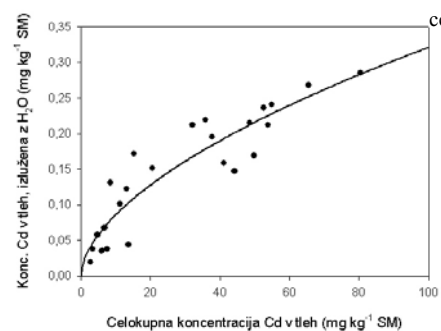
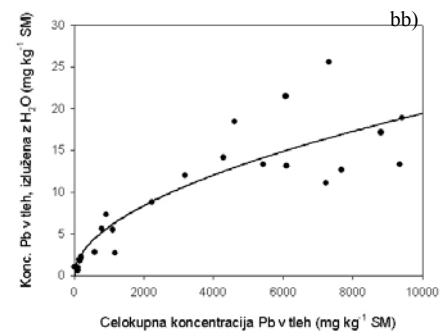
Priloga C:

Regresijske analize za odnos med celokupno in z amonijevim acetatom (NH_4Ac) izluženo oz. z vodo (H_2O) izluženo koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosferni zemlji ive *S. caprea*. n = 26-28, nz = neznačilno.

a)



aa)



Sl.	Regresijska analiza odnosa	Funkcija	R2	p
a)	Pb: celokupna – NH_4Ac	$y = 0,191x - 54,84$; linearna	0,89	$p < 0,001$
b)	Cd: celokupna - NH_4Ac	$y = 0,318x - 1,35$; linearna	0,93	$p < 0,001$
c)	Zn: celokupna - NH_4Ac	$y = 0,063x - 3,97$; linearna	0,45	$p < 0,01$
aa)	Pb: celokupna - H_2O	$y = 0,161 x 0,52$; potenčna	0,82	$p < 0,001$
bb)	Cd: celokupna - H_2O	$y = 0,023 x 0,57$; potenčna	0,85	$p < 0,001$
cc)	Zn: celokupna - H_2O	$y = 0,016 x 0,67$; potenčna	0,27	nz

Priloga D:

Natančnejši podatki k primerjavi regresijskih premic za odnos med logaritmiranimi vrednostmi koncentracije kovine (celokupne ali zlužene z NH_4Ac) v tleh in koncentracijo kovine v rastlinskem organu z namišljeno premico (neprekinjena poudarjena črta) z naklonom 45° , ki predstavlja dejanski (idealen) privzem kovine v rastlino.

Sl. 18	Regresijska analiza odnosa	Funkcija	R^2	p
a)	Pb: log celokupni – log korenine	$y = 0,834x + 0,266$	0,86	$p < 0,001$
	Pb: log NH_4Ac – log korenine	$y = 0,595x + 1,640$	0,87	$p < 0,001$
aa)	Pb: log celokupni – log listi	$y = 0,090x + 1,873$	0,12	nz
	Pb: log NH_4Ac – log listi	$y = 0,063x + 2,025$	0,12	nz
b)	Cd: log celokupni – log korenine	$y = 0,770x + 0,539$	0,62	$p < 0,001$
	Cd: log NH_4Ac – log korenine	$y = 0,499x + 1,279$	0,66	$p < 0,001$
bb)	Cd: log celokupni – log listi	$y = 0,498x + 0,758$	0,54	$p < 0,001$
	Cd: log NH_4Ac – log listi	$y = 0,283x + 1,275$	0,52	$p < 0,001$
c)	Zn: log celokupni – log korenine	$y = 0,556x + 0,913$	0,49	$p < 0,001$
	Zn: log NH_4Ac – log korenine	$y = 0,344x + 2,017$	0,54	$p < 0,001$
cc)	Zn: log celokupni – log listi	$y = 0,219x + 1,700$	0,33	$p < 0,01$
	Zn: log NH_4Ac – log listi	$y = 0,102x + 2,166$	0,21	$p < 0,05$

Priloga E:

Raziskovanje korelacij s Spearmanovim korelacijskim koeficientom (r_s) za odnos med celokupno (tot) oz. z amonijevim acetatom (NH_4Ac) izluženo koncentracijo kovin v tleh ter koncentracijo kovin v rastlinskem organu (koreninah - kor, listih - list) ive *S. caprea*. n = 26-28, nz = neznačilno.

Odnos	r_s	p
Pb tot – Pb kor	0,89	$p < 0,001$
Pb tot – Pb list	0,44	nz
Pb NH_4Ac – Pb kor	0,91	$p < 0,001$
Pb NH_4Ac – Pb list	0,32	nz
Cd tot – Cd kor	0,81	$p < 0,001$
Cd tot – Cd list	0,75	$p < 0,001$
Cd NH_4Ac – Cd kor	0,83	$p < 0,001$
Cd NH_4Ac – Cd list	0,74	$p < 0,001$
Zn tot – Zn kor	0,71	$p < 0,001$
Zn tot – Zn list	0,32	nz
Zn NH_4Ac – Zn kor	0,73	$p < 0,001$
Zn NH_4Ac – Zn list	0,27	nz

Priloga F:

Korelacije med celokupno koncentracijo kovin Pb, Cd in Zn v rizosferni zemlji (tudi koncentracijo, ekstrahirane z NH_4Ac), koreninah, listih ive *S. caprea* in koncentracijo nutrienta Fe v koreninah *S. caprea*. Podane so vrednosti Spearmanovovih korelacijskih koeficientov. Vse korelacije so bile neznačilne ($p > 0,05$).

	Fe KORENINE
Pb tla	0,11
Pb NH_4Ac	0,03
Pb korenine	0,10
Pb listi	0,35
Cd tla	0,19
Cd NH_4Ac	0,13
Cd korenine	0,18
Cd listi	0,29
Zn tla	0,17
Zn NH_4Ac	0,01
Zn korenine	0,16
Zn listi	0,31