

UNIVERZA V LJUBLJANI
PEDAGOŠKA FAKULTETA
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO
NARAVOSLOVNOTEHNIŠKA FAKULTETA

Študijski program: Kemija in biologija

**VPLIV SELENA NA FIZIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE LASTNOSTI
MALE VODNE LEČE**

DIPLOMSKO DELO

**THE EFFECT OF SELENIUM ON PHYSIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *Lemna minor***

GRADUATION THESIS

Mentorica: doc. dr. Mateja Germ

Kandidatka: Tina Okoren

Ljubljana, april 2013

Natura semina nobis scientiae dedit, scientiam non dedit.

Narava nam ni dala znanja, dala nam je njegovo seme.

Seneca

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Kemije in Biologije na Pedagoški fakulteti. Opravljeno je bilo na Katedri za ekologijo in varstvo okolja na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je 13. aprila 2012 odobrila predlagano temo diplomske naloge z naslovom Vpliv selena na fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče. Za mentorico je imenovala doc. dr. Matejo Germ.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Alenka Gaberščik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Mateja Germ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ivan Kreft

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 12. april 2013

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svojega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Tina Okoren

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	581.5:582.521.43:546.23(043.2)=163.6
KG	<i>Lemna minor</i> /selen/ETS/fotokemična učinkovitost/barvila
AV	OKOREN, Tina
SA	GERM, Mateja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16
ZA	Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta
LI	2013
IN	VPLIV SELENA NA FIZIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE LASTNOSTI MALE VODNE LEČE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 48 str., 5 pregl., 7 sl., 1 pril., 64 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Selen je element, ki je pri določenih koncentracijah lahko strupen. Z odpadnimi vodami selen prehaja v površinske vode in podtalnico, se nalaga v nekaterih vodnih rastlinah ter lahko povzroča zastrupitve vodnih in kopenskih organizmov. Zanimalo nas je, pri katerih koncentracijah selenita mala vodna leča najboljše uspeva in kako različne koncentracije selenita vplivajo na izbrane fiziološke in biokemijske lastnosti. Spremljali smo vrednosti dihalnega potenciala, fotokemično učinkovitost fotosistema II in vsebnosti fotosinteznih barvil (klorofila <i>a</i> in <i>b</i>) ter karotenoidov pri rastlinah, obravnavanih z različnimi koncentracijami selenita. Ugotovili smo, da dodatek selenita v koncentraciji 0,5 mg/L ne vpliva na izbrane fiziološke in biokemijske lastnosti preučevane rastline, medtem ko dodatek 1mg/L pozitivno vpliva na rast male vodne leče. Meritve so pokazale, da višje koncentracije selenita neugodno vplivajo na preučevano rastlino.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC 581.5:582.521.43:546.23(043.2)=163.6

CX *Lemna minor*/selenium/ETS/photochemical efficiency/pigments

AU OKOREN, Tina

AA GERM, Mateja (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16

PB University of Ljubljana, Faculty of Education, Biotechnical faculty

PY 2013

TI THE EFFECT OF SELENIUM ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *Lemna minor*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 48 p., 5 tab., 7 fig., 1 ann., 64 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Selenium is an element which can be toxic at certain concentrations. Selenium in wastewaters can contaminate surface water and groundwater, accumulate in certain aquatic plants and can lead to poisoning of aquatic and terrestrial organisms. We tried to establish which concentrations of selenite are beneficial for growth of common duckweed and how different selenite concentrations affect selected physiological and biochemical characteristics of common duckweed. We monitored respiratory potential, photochemical efficiency of photosystem II and the content of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* and *b*) and carotenoids in plants treated with different concentrations of selenite. The results showed that the addition of selenite 0.5 mg/L had no effect on the selected physiological and biochemical characteristics of the studied plant. However, the addition of 1 mg/L had a positive effect on the growth of common duckweed. Our results showed that higher concentrations of selenite had negative effect on the studied plant.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

As	arzen
Cu	baker
ETS	elektronski transportni sistem
FS II	fotosistem II
F_m	maksimalna fluorescenca klorofila <i>a</i> temotno adaptiranega vzorca
F_o	minimalna fluorescenca klorofila <i>a</i> temotno adaptiranega vzorca
F_v	variabilna fluorescenca klorofila <i>a</i> temotno adaptiranega vzorca
F_v/F_m	potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II
INT	jodo-nitro-tetrazolium-klorid
kar	karotenoidi
kl <i>a</i> , kl <i>b</i>	klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i>
NaOCl	natrijev hipoklorit
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat hidrogen
Pb	svinec
rpm	obrati na minuto
Se	selen
Te	telur
UV sevanje	ultravijolično sevanje

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	V
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO SLIK	IX
KAZALO TABEL	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SELEN.....	3
2.1.1 Vpliv selena na rastline.....	4
2.1.2 Prisotnost selena v vodnem okolju	5
2.1.3 Akumulacija selena v vodnih sistemih	6
2.1.4 Akumulacija selena v vodnih rastlinah.....	8
2.1.5 Fitoremediacija	9
2.2 MAKROFITI.....	10
2.2.1 Mala vodna leča (<i>Lemna minor</i>).....	11
3 MATERIALI IN METODE DELA	13
3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE.....	13
3.1.1 Priprava standardnih raztopin selenita.....	14

3.1.2	Priprava vzorcev	14
3.2	FIZIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE MERITVE	15
3.2.1	Merjene dihalnega potenciala.....	15
3.2.2	Merjenje vsebnosti barvil	16
3.2.3	Merjene fotokemične učinkovitosti FS II.....	17
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	17
4	REZULTATI.....	18
4.1	FIZIOLOŠKE MERITVE	18
4.1.1	Dihalni potencial	18
4.1.2	Fotokemična učinkovitost	21
4.2	BIOKEMIJSKE MERITVE	24
4.2.1	Vsebnost barvil.....	24
5	RAZPRAVA.....	29
5.1	DIHALNI POTENCIAL	29
5.2	FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST	31
5.3	VSEBNOST BARVIL.....	32
6	SKLEPI	34
7	POVZETEK.....	35
8	PRENOS PRIDOBLENEGA ZNANJA NA POUK V OSNOVNI ŠOLI.....	37
8.1	ANALIZA UČNIH NAČRTOV	37
8.1.1	Učna tema: Človek onesnažuje zrak, vodo in tla.....	37
8.1.2	Učna tema: Zgradba in delovanje rastlin.....	37
8.1.3	Učna tema: Prilagoditve rastlin na okolje.....	38
8.2	PRIMER UČNE PRIPRAVE	38
9	VIRI	41

Okoren, T. Vpliv selena na fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Program Kemija in Biologija, 2013

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

Slika 1: Prenos selena iz sedimenta po prehranjevalnih verigah.....	7
Slika 2: Vodna površina pokrita z malo vodno lečo.....	11
Slika 3: Mala vodna leča	12
Slika 4: Vzorci male vodne leče v rastni komori.....	15
Slika 5: Dihalni potencial, ocenjen s pomočjo meritev aktivnosti elektronskega transportnega sistema (ETS).....	20
Slika 6: Potencialna fotokemična učinkovitost (F_v/F_m).....	23
Slika 7: Mala vodna leča, obravnavana z različnimi koncentracijami selenita na koncu poskusa	28

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079).....	13
Tabela 2: Uporabljena razredčitvena vrsta za natrijev selenit.....	14
Tabela 3: Vsebnost klorofila <i>a</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{ sm}$) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.	25
Tabela 4: Vsebnost klorofila <i>b</i> ($\text{mg g}^{-1} \text{ sm}$) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.	26
Tabela 5: Vsebnost karotenoidov ($\text{mg g}^{-1} \text{ sm}$) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.	28

1 UVOD

Selen je element, ki je naravno prisoten v zemeljski skorji. V tleh je neenakomerno porazdeljen, kar je odvisno od izvora tal, od klimatskih razmer in človekovega poseganja v okolje. Je esencialen mikroelement za ljudi, živali in mikroorganizme, za rastline pa njegova esencialnost še ni dokazana. V sledovih je potreben za normalno rast in razvoj, povišane koncentracije pa lahko povzročajo strupene učinke in zastrupitev pri ljudeh in živalih.

Selen se v naravi pojavlja tudi v vodnem okolju. V površinskih vodah je selena malo, le nekaj $\mu\text{g/L}$, razen v redkih primerih, ko lahko pride do povišanih koncentracij. Ta je močno odvisna od antropogenih virov, ki onesnažujejo okolje. Onesnaženost voda s selenom je posledica onesnaževanja iz industrije, kmetijstva in raznih oblik proizvodnje in storitev urbanih okolij. Preko odpadnih voda selen prehaja v vodo in podtalnico, se akumulira v nekaterih vodnih rastlinah ter tako povzroča zastrupitve vodnih in kopenskih organizmov.

Onesnaženje voda s selenom je v zadnjih letih velik problem ponekod po svetu, zlasti v Severni Ameriki, Avstraliji in Novi Zelandiji, v Sloveniji pa vode s selenom niso onesnažene. Toksičnost selena za vodne sisteme je pritegnila veliko pozornosti, zato je potrebno najti ustrezen rešitev za njegovo odstranitev. Sposobnost vodnih rastlin, da akumulirajo in transformirajo anorganske oblike selena v organske, je mogoče izkoristiti za njegovo odstranjevanje iz odpadnih voda.

Mala vodna leča (*Lemna minor*) je razširjena v ribnikih, mlakah in mrtvicah po vsem svetu in predstavlja pomemben člen prehranjevalne verige za vodne ptice, ribe in druge živali. Zaradi enostavnosti gojenja in hitrega razmnoževanja, je primeren organizem za preučevanje različnih vplivov na rastline. Tako pri nas, kot tudi drugod po svetu, je narejeno le malo raziskav o vplivu selena na malo vodno lečo.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

O vplivu selenita na malo vodno lečo do sedaj ni bilo narejeno veliko raziskav.

Zanima nas, pri katerih koncentracijah selenita rastlina najbolj uspeva in kako selenit vpliva na njene fiziološke in biokemijske lastnosti.

Namen naloge je:

- ugotoviti vpliv selenita na nekatere fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče.
- ugotoviti, ali se odziv preučevane rastline razlikuje pri obravnavanju z različnimi koncentracijami selenita.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da bodo različne koncentracije selenita različno vplivale na fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče.
- Pričakujemo, da bodo nižje koncentracije selenita pozitivno vplivale na fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče, visoke koncentracije pa bodo povzročile propad rastlin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SELEN

Selen je kemijski element, ki se nahaja v šesti skupini periodnega sistema, med žveplom (S) in telurjem (Te). Spada med metaloide, ker ima lastnosti kovin in nekovin. Ima podobne kemijske lastnosti kot žveplo (Brenčič in Lazarini, 1995).

V naravi je prisotnih šest naravnih izotopov selena: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se in ^{82}Se (Brenčič in Lazarini, 1995). Selen lahko v anorganskih spojinah nastopa v različnih oksidacijskih stanjih: -2 (selenid), 0 (elementarni Se), +4 (SeO_3^{2-} , selenit), +6 (SeO_4^{2-} , selenat), prisoten pa je tudi v obliki hlapnih in nehlapnih organskih spojin (Uden in sod., 2004).

Selen je esencialen element, deluje kot antioksidant pri ljudeh in živalih, vendar je v visokih koncentracijah strupen, ker se začne vključevati na vezavno mesto žvepla v aminokislinah, kar povzroči spremembe v 3D strukturi proteinov in lahko moti delovanje encimov (Germ in sod., 2007).

V okolju je neenakomerno porazdeljen na kopnem, v vodi in zraku. Na porazdelitev selena vplivajo naravni procesi, kot so: vulkanske aktivnosti, preperevanje kamnin in s tem mineralna sestava tal, porazdelitev podzemnih voda, vnos in sproščanje selena iz rastlin, živali in mikroorganizmov (McNeal in Balistrieri, 1989).

Najdemo ga v zemeljski skorji, prsti, mineralih, sedimentih ter v sladki in morski vodi. V vodo prehaja topna oblika selena, predvsem iz kmetijskih in industrijskih virov (Fan in sod., 2002). Selenat in selenit sta mobilni obliki selena in prevladujeta v vodnih sistemih, medtem ko sta selenid in elementarni selen bolj prisotna v tleh in sedimentih (Zhang in Moore, 1996).

K povečani vsebnosti selena v naravnem okolju, prispeva več dejavnikov: izgorevanje goriv trdne oblike, namakanje površin, bogatih s selenom namenjenih kmetovanju, odlaganje odpadkov, nastalih pri predelavi premoga, izlivanje s selenom obremenjenih

voda v reke, jezera, itd. Vse te dejavnosti prispevajo k mobilizaciji in bioakumulaciji nevarnih koncentracij selena v naravnem okolju (Lemly, 1999).

2.1.1 Vpliv selena na rastline

Za višje rastline ni dokazano, da bi za svojo rast nujno potrebovale selen. Kljub temu, da esencialna vloga selena za višje rastline ni dokazana, bi lahko sklepali, da ima določeno biološko vlogo, saj imajo vsi organizmi, vključno z višjimi rastlinami, prisoten Se-cisteil-tRNA, ki dekodira triplet nukleotidov UGA, s katerim se selenocistein vgrajuje v proteine (Läuchli, 1993).

Rastline lahko dokazano selen privzemajo in ga kopičijo v svojih tkivih. Privzem selena je odvisen od kemijske oblike in koncentracije, pH prsti, kislosti, slanosti, vsebnosti CaCO_3 , koncentracije drugih ionov, s katerimi tekmuje selen za asimilacijo in sposobnosti rastlin za privzem in metabolizem selena. Privzem selena je pri nižjem pH višji. Pri selenitu se privzem znižuje pri pH, ki je nižji od 6, medtem ko se pri selenatu znižuje privzem preko celotnega pH območja (2,5-10) (Hyun in sod., 2006).

Količina akumuliranega selena je poleg vsebnosti in razpoložljivosti elementa v okolju, odvisna tudi od vrste rastline. Glede na sposobnost kopičenja selena v rastlinskih tkivih lahko ločimo (Ellis in Salt, 2003):

- neakumulirajoče rastline, ki vsebujejo manj kot 25 mg Se/kg suhe snovi (v tej skupini je večina rastlin).
- indikatorske rastline, ki kopičijo do 1000 mg Se/kg suhe snovi (rastline iz rodu *Aster*, *Brassica juncea*).
- akumulirajoče rastline, ki kopičijo in so strpne do 4000 mg Se/kg suhe snovi (rastline iz rodu *Astragalus*, *Stanleya*, *Neptunia*).

V visokih koncentracijah je selen rastlinam škodljiv, pri nizkih koncentracijah pa ima pozitivne učinke. Poveča lahko toleranco rastlin na UV stres, upočasnjuje staranje in pospešuje rast rastlin (Xue in sod., 2001). Raziskave so pokazale, da selen uravnava vodni status rastlin v obdobju suše (Kuznetsov in sod., 2003).

Kljub temu, da je o toksičnosti selena znano veliko, je narejenih malo raziskav glede vpliva selena na plavajoče in potopljene vodne rastline, ki lahko odstranjujejo element iz onesnaženih vodnih sistemov (Mechora in sod., 2011). Po poročanju Mechora in sodelavcev (2011) je bilo med raziskavo dveh vodnih rastlin *Myriophyllum spicatum* L. in *Ceratophyllum demersum* L. ugotovljeno, da visoke koncentracije selena zmanjšajo fotokemično učinkovitost fotosistema II, nizke pa jo povečujejo. Selen ni imel vpliva na količino klorofila *a* in *b* v rastlini. Dokazano je bilo, da lahko obe rastlini kopičita velike količine selena v svojih tkivih.

2.1.2 Prisotnost selena v vodnem okolju

Selen v vodno okolje prehaja zaradi nekaterih človeških aktivnosti, kot sta kmetijska dejavnost in visokotehnološki industrijski procesi (Lemly, 2004).

Selenov dioksid, katerega vir je industrija, se z vodo pretvori v selenovo(IV) kislino. V morski vodi je selen prisoten predvsem v obliki selenita in selenata, v koncentraciji pod 1 $\mu\text{g/L}$. Raziskovalci predvidevajo, da se v prisotnosti planktona pretvori v organske selenove komponente ali pa se prek mikroorganizmov pretvori v anorganski in elementarni selen. Selen je prisoten tudi v talni vodi (Žnidarčič, 2011).

Prekomerno koncentracijo selena v vodnih sistemih povzročata predvsem dve človeški dejavnosti. Prva je predelava in izgorevanje fosilnih goriv pri proizvodnji električne energije. Pepel, ki nastaja pri izgorevanju premoga, povečuje kopičenje selena v vodnih sistemih (Lemly in sod., 1993). Pepel, obogaten s selenom, prehaja v vodno okolje ter tako povzroča kopičenje selena v visokih koncentracijah (Lemly, 2004). Druga večja dejavnost pa je namakanje tal bogatih s selenom, za rastlinsko predelavo v suhih in polsuhih območjih (Lemly in sod., 1993). Drugi onesnaževalci vodnega okolja so še naftna industrija, rudarska industrija in kmetijstvo (Lemly, 2004).

V površinskih vodah je selena malo, le nekaj $\mu\text{g/L}$, razen v redkih primerih, to je na območjih, izrazito bogatih s selenom, kjer ga voda vsebuje tudi več mg/L . Na takih območjih selen povzroča zastrupitve (Žnidarčič, 2011). Agencija za varovanje okolja ZDA je postavila kritično mejo toksičnosti selena, ki znaša 5 $\mu\text{g/L}$ (US EPA, 1998). V Sloveniji

se koncentracije selena v izbranih sladkih vodah gibljejo med 0,07-0,15 ng Se/g (Mechora in sod., 2011). Po poročanju Fournierja in sodelavcev (2010) je tipična koncentracija selena v sladkih vodah med 0,01 in 0,5 $\mu\text{g Se/L}$.

V vodnih sistemih se selen pojavlja v štirih oksidacijskih stanjih: elementarni selen (Se^0), selenit (Se^{+4}), selenat (Se^{+6}) in selenid (Se^{2-}) (Canton in Van Derveer, 1997). Oblika, v kateri se selen nahaja, je odvisna od redoks potenciala in pH. Oksidirani obliki selena, selenit in selenat, sta topni obliki in prevladujeta v vodnih sistemih. Zaradi njune topnosti, sta bolj dostopni za rastline (Carvalho in Martin, 2001) in potencialno toksični za vodne organizme. Selenit je bolj dostopen in 5-10 krat bolj strupen od selenata (Lemly in sod., 1993). Elementarni selen je stabilen, netopen in težko dosegljiv za rastline, zato je manj toksičen (US EPA 1987).

Selen se v vodnem okolju bioakumulira v rastlinah in preko prehranjevalnih spletov preide v ribe ter druge živali vodnih in obvodnih habitatov ter tako lahko povzroča njihovo zastrupitev (Lemly, 2004). Selen je strupen za vodne organizme že pri nizkih koncentracijah (US EPA 1987), za nekatere organizme je to že pri koncentraciji 2-5 $\mu\text{g Se/L}$ (Lemly, 2004).

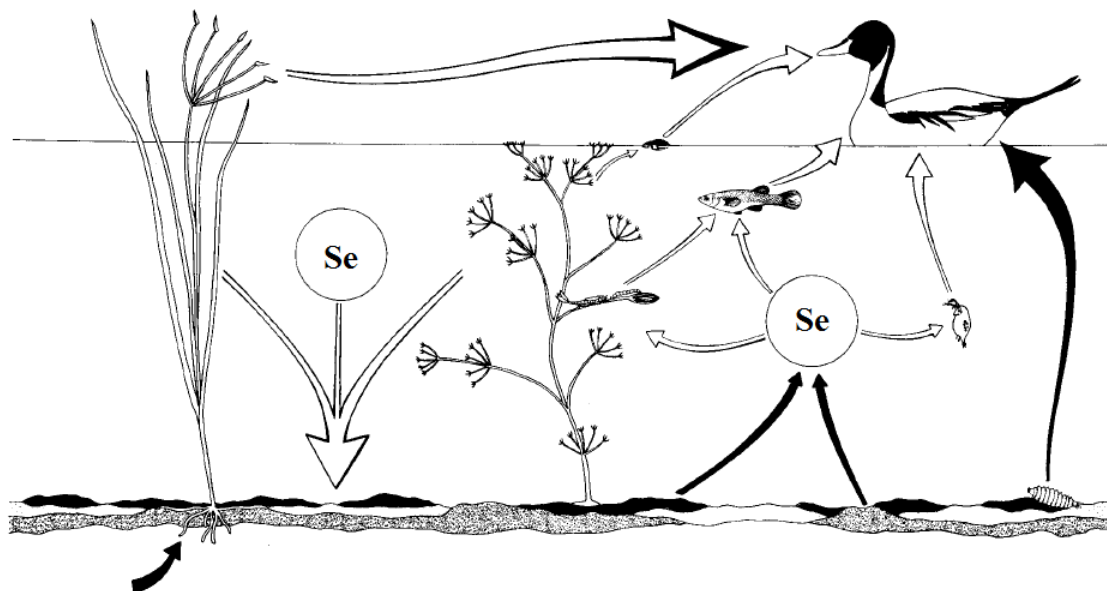
Prisotnost drugih potencialno antagonističnih elementov ali spojin (npr. Pb, Cu, As, sulfati) lahko zmanjša toksičnost selena (Lohner in sod., 2001).

2.1.3 Akumulacija selena v vodnih sistemih

Ob vstopu selena v vodni ekosistem se ta lahko (1) absorbira v organizme ali ga le ti zaužijejo, (2) lahko se poveže v kompleks na površini sedimenta ali (3) ostane prost v raztopini. Sčasoma večino selena absorbirajo organizmi ali pa se veže v sediment. Večina selena se po navadi akumulira v zgornjih plasteh sedimenta. Z biološkimi, kemijskimi in fizikalnimi procesi, se selen prenaša iz sedimenta, zato je ta le njegovo začasno skladišče (Lemly, 1999).

Tudi, ko površinske vode ne vsebujejo povečane koncentracije elementa, je pomembna njegova prisotnost v sedimentu. Pritrjene rastline s svojimi koreninami iz sedimenta črpajo selen in tako preko prehranjevalne verige prenašajo selen v druge organizme (Slika 1). Pri

dolgoročnem kroženju selena je ta pot najpomembnejša, saj so vodni organizmi izpostavljeni koncentracijam selena tudi, ko je njegova koncentracija v vodi nizka (Lemly in Smith, 1987).



Slika 1: Prenos selena iz sedimenta po prehranjevalnih verigah (Lemly in Smith, 1987).

Jezero Belews, v severni Karolini, je bilo več kot 10 let onesnaževano z odpadnimi vodami s premogom, kar je predstavljalo veliko nevarnost za tamkajšnje organizme. Selen, se je akumuliral v vodni prehranjevalni verigi ter povzročil težave pri razmnoževanju in deformacije rib. Po prenehanju izlivanja odpadnih voda v jezero, je bil selen še vedno prisoten v sedimentu. Tudi, ko je koncentracija selena v sedimentu padla za 65-75%, je bila še vedno dovolj visoka (1-4 $\mu\text{g/g}$), da je onesnaževala bentoške organizme ter tako hrano za ribe in vodne ptice. Okrevanje ekosistema je bilo počasno, saj so bili strupeni učinki selena vidni tudi 10 let po ustavitvi vnosa. Tako lahko selen še leta predstavlja pomembno nevarnost za ribe in vodne ptice (Lemly, 2002).

Prenos selena na višje prehranjevalne nivoje poteka preko akumulacije selena po bentoških prehranjevalnih verigah v sedimentu ali po prehranjevalnih verigah, ki se začnejo s fitoplanktonom. Strupene snovi, ki vsebujejo težke kovine ali selen, se po prehranjevalnih verigah prenašajo na višje trofične nivoje (Bañuelos in sod., 2002).

Porcella je s sodelavci (1991) opisal biološke poti, po katerih se selen prenaša v celinske vode. Pomembna točka vstopa selena v prehranjevalno verigo je najverjetneje fitoplankton. Druga možna pot je iz sedimenta skozi bentoške organizme. Pri obeh poteh se lahko selen preoblikuje v nove oblike ali preide na višje trofične nivoje prehranjevalne verige. Ob vsakem koraku se lahko koncentracija selena zmanjša.

Kroženje selena je podobno v vseh vodnih sistemih, njegova koncentracija pa je odvisna od vodnega habitata. V hitro tekočih vodah so fini organski sedimenti redki, saj se iz sistema ves čas izpirajo. V takšnih vodah je malo možnosti za onesnaženje površinske plasti sedimenta, primanjkuje pa tudi ukoreninjenih rastlin, ki akumulirajo selen v svojih tkivih. Vodni sistemi, ki bolj učinkovito akumulirajo selen, so plitve, počasne vode, ki imajo nizko stopnjo izpiranja organskih sedimentov. V takšnih sistemih je biološka produktivnost pogosto visoka in selen ima več možnosti za akumulacijo v rastlinah (Lemly, 1999).

2.1.4 Akumulacija selena v vodnih rastlinah

Selen se v obliki selenata in selenita in organskih spojin selena (npr. selenometionin) s pomočjo fizioloških procesov hitro absorbira iz vode v vodne rastline (Riedel in sod., 1991). Aktivno rastoča tkiva po navadi vsebujejo večje količine selena. Večina rastlin akumulira več selena v poganjkih in listih kot v koreninskem tkivu, obstajajo pa tudi izjeme (Germ in sod., 2007).

Swift (2002) je preučeval bioakumulacijo selena pri različnih vodnih rastlinah. Makrofite *Elodea* sp., *Potamogeton* sp., *Phalaris* sp. in *Lemna* sp. je izpostavil različnim koncentracijam selenita ter ugotovil, da te akumulirajo selen pri vseh koncentracijah. Vsebnost selenita v tkivih je bila najvišja poleti, med njihovo rastno sezono, medtem ko se je pozimi zmanjšala. Ugotovil je, da ima *Lemna* sp. najvišjo izmerjeno vsebnost selena v svojih tkivih pri vseh koncentracijah, kar je mogoče razložiti z njeno rastno obliko. *Lemna* sp. je plavajoča rastlina, ki je z listi in koreninami neposredno v vodi, kar ji omogoča zelo dobro akumulacijo selena. Po prenehanju dodajanja selena v vodo njegova vsebnost v tkivih še vedno narašča pri ukoreninjenih makrofitih (*Elodea* sp., *Potamogeton* sp., *Phalaris* sp.), pri plavajočih makrofitih (*Lemna* sp.) pa ostaja enaka. Ukoreninjeni

makrofiti namreč še vedno črpajo selen iz sedimenta s pomočjo svojega koreninskega sistema, tudi ko njegova koncentracija v vodi upade.

Dejstvo, da lahko vodne rastline akumulirajo selen, je zelo zanimivo, saj lahko na ta način popolnoma odstranijo selen iz onesnaženih voda (Terry in sod., 1992). Carvalho in Martin (2001) sta naredila raziskavo, kako odstranjujejo selen iz vode štiri vodne rastline: *Typha domingensis*, *Hydrilla verticillata*, *Crinum americanum* in *Lemna obscura*. Rezultati so pokazali, da so vse preiskovane rastline sposobne akumulacije selena iz vodnega okolja in da lahko pretvorijo anorganski selen v manj strupeno obliko. Opazila sta, da sta vrsti *Typha domingensis* in *Crinum americanum* bolj tolerantni na višje koncentracije selena kot ostali preučevani vrsti. Za zelo učinkovito se je izkazala vrsta *Lemna obscura*, ki bi bila lahko primerna rastlina za odstranjevanje selena iz onesnaženih vod.

2.1.5 Fitoremediacija

Selen je mogoče iz onesnaženih tal in vode odstraniti v procesu fitoremediacije. Fitoremediacija je tehnologija, pri kateri s pomočjo rastlin v povezavi z njihovo mikrobiološko aktivnostjo ekstrahira, akumulira in volatilizira selen (Pilton-Smits in sod., 1999).

Ko rastline uspešno akumulirajo in shranijo selen v svojih tkivih, je potrebno rastline požeti in jih tako varno odstraniti iz onesnaženega območja. Rastline, obogatene s selenom, se lahko uporabi za krmo živali tam, kjer je koncentracija selena v tleh nizka. Druga možnost uporabe s selenom bogatih rastlin je kot organsko gnojilo. Če rastline, obogatene s selenom, vsebujejo strupene elemente, kot je živo srebro in arzen, jih uporabljamo kot gorivo za pridobivanje elektrike (Carvalho in Martin, 2001).

Selen je lahko iz okolja odstranjen tudi v procesu fitovolatilizacije (Carvalho in Martin, 2001). Uporaba rastlin je tako zelo učinkovita, saj se selen popolnoma odstrani iz ekosistema in se v obliki relativno nestrupenih hlapov sprosti v atmosfero. Glavni produkt fitovolatilizacije je dimetilselenid (Dumont in sod., 2006).

Makrofiti lahko akumulirajo selen iz onesnaženih kmetijskih odpadnih voda (Lin in sod., 2002). Pri koncentraciji selena 100 mg/kg in manj so se za dokaj dobre odstranjevalce

selena iz vode (65-100%) izkazali nekateri makrofiti: *Typha domingensis*, *Lemna obscura*, *Hydrilla verticillata* in *Crinum americanum* (Carvalho in Martin, 2001). Pomembno vlogo pri odpravljanju selena iz odpadnih kmetijskih voda ima makroalga *Chara canescens* (Lin in sod., 2002). Selenit sprejemajo makrofiti hitreje in v večjih količinah kot selenat (Hamilton, 2004).

Čeprav so rastline, ki so hiperakumulatorji selena, učinkoviti pri odstranjevanju selena, je fitoremediacija pogosto omejena zaradi počasne rasti in nizke proizvodnje biomase. Učinkovitejša fitoremediacija je dosežena z uporabo hitro rastočih rastlinskih vrst z zmerno sposobnostjo kopičenja selena in visoko sposobnostjo proizvodnje biomase (LeDuc in sod., 2006).

2.2 MAKROFITI

Makrofiti so vodne rastline, dovolj velike, da so vidne s prostim očesom. Aktivno rastejo stalno ali sezonsko. Najdemo jih potopljene pod vodo, plavajoče na vodi ali rastoče iz vode (Chambers in sod., 2008). So ključni sestavni del vodnih ekosistemov. Njihova rast je odvisna tudi od vsebnosti hranil. Makrofiti vplivajo na izboljšanje stanja voda, zmanjšujejo koncentracijo delcev in koncentracijo hranil v vodnem stolpcu (Egertson in sod., 2004).

Pod vplivom vodnega okolja so makrofiti razvili različne prilagoditve (zmanjšan obseg opornega tkiva, aerenhim, heterofilija) (Gaberščik, 1997).

Na razporeditev in pogostost makrofitov vplivajo okoljski dejavniki. To dejstvo lahko izkoristimo za ugotavljanje sprememb v ekosistemu, saj so makrofiti zanesljivi indikatorji. S spreminjanjem vrstne sestave vodnih rastlin ali s spreminjanjem vplivov vodnih rastlin na druge organizme v ekosistemu, lahko opazujemo vplive okoljskih sprememb na ekosistem (Lacoul in Freedman, 2006)

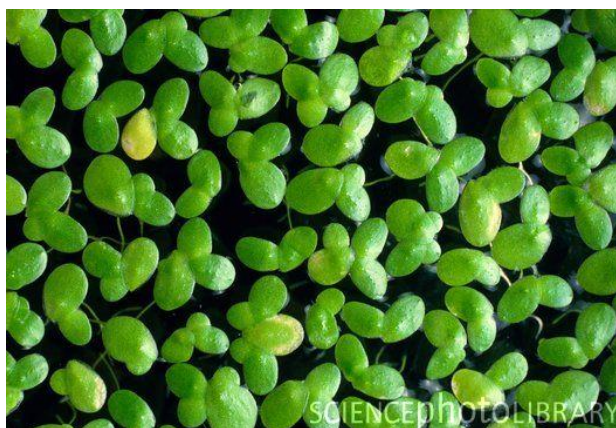
Dejavniki, ki vplivajo na rast vodnih rastlin, so naslednji (Lacoul in Freedman, 2006):

- Hidrološki dejavniki: vplivajo na časovne in prostorske spremembe vodne globine, lastnosti sedimenta, bistrost vode in kemijske lastnosti vode.
- Temperatura vode in sedimenta: vpliva na razporeditev makrofitov tako, da vpliva na fiziologijo rastlin, tvorbo semen, začetek sezonske rasti in začetek dormance.

- **Svetloba:** je kritični dejavnik za fotosintezo in globinsko razporeditev vodnih rastlin.
- **Substrat:** služi kot pritrjevalni substrat in vir hranil.
- **pH:** s pH vrednostmi višjimi od 7 je vrstna pestrost v vodi višja, v vodah z nižjimi vrednostmi pH (4-5,9) pa je zastopanost vodnih rastlin manjša.
- **Hranila:** produktivnost vodnih rastlin je omejena z zalogami fosforja in dušika, rastline pridobivajo raztopljena hranila iz vodnega stolpca in sedimenta.

2.2.1 Mala vodna leča (*Lemna minor*)

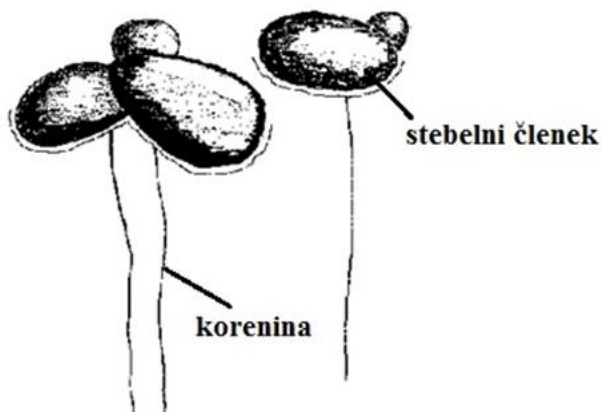
Mala vodna leča je plavajoči vodni makrofit, ki pripada družini vodolečevk (Lemnaceae). Te najdemo na površini sladkih in braktičnih vod. Družino sestavljajo štiri rodovi (*Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* in *Wolffiella*) (Zimmo, 2003). V Sloveniji je družina zastopana s tremi rodovi: vodna leča (*Lemna*), žabja leča (*Spirodela*) in vodna lečica (*Wolffia*) (Martinčič in sod., 1999). Vodolečevke so nežne, prosto plavajoče ali potopljene zeli, ki niso nikoli zakoreninjene (Martinčič in sod., 2007).



Slika 2: Vodna površina pokrita z malo vodno lečo. (<http://www.sciencephoto.com/media/16491/enlarge>)

Malo vodno lečo najdemo v vodnih jarkih, ribnikih in mlakah po vsej Sloveniji. Je 2 do 4 mm velika enokaličnica. Steblo je večinoma močno skrajšano, poganjki so podobni listom. Poganjki, ki jih imenujemo stebelni členi, so jajčaste oblike in na obeh straneh ploščati. Listi so močno reducirani. Vsak stebelni člen ima po eno korenino. Cvetovi so enospolni,

enodomni, brez cvetnega odevala. Nahajajo se po trije skupaj (večinoma po dva moška in en ženski cvet) v vdolbinici na stebelu. Imajo en prašnik in eno plodnico (Martinčič in sod., 1999). Rastlina cveti od maja do junija (Martinčič in sod., 2007). Razmnožuje se spolno in vegetativno. V naših podnebnih razmerah se mala vodna leča razmnožuje le vegetativno (Krajnčič, 1974).



Slika 3: Mala vodna leča. (<http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckpix.htm>)

V primerjavi z drugimi rastlinami, ima vodna leča nizko vsebnost vlaken (5%), saj ne vsebuje strukturnega tkiva, ki služi za podporo listom (Zimmo, 2003).

Mala vodna leča se hitro prilagodi različnim vodnim razmeram, zato je uporabna pri pridobivanju in kopičenju škodljivih snovi iz vode. Znano je, da lahko kopiči težke kovine, zato jo uporabljajo v eksperimentalne namene, pri raziskovanju strupenih kovin v vodnem ekosistemu (Azeez in Sabbar, 2012). Zaradi svoje relativno preproste zgradbe, majhnosti, hitre rasti in vegetativnega razmnoževanja, je primerna za laboratorijske in terenske raziskave (Smith in Kwan, 1989).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 RASTLINSKI MATERIAL IN RASTNE RAZMERE

Poskuse izpostavitve male vodne leče (*Lemna minor* L.) selenu smo izvedli na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete na Katedri za ekologijo in varstvo okolja.

Malo vodno lečo smo predhodno nabrali v kanalih Ljubljanskega barija in jo gojili v posodah z vodo. Rastline smo pred prestavitvijo v rastno komoro splahnili z 0,01 M NaOCl, s čimer smo preprečili rast alg. Pripravili smo 18 kristalizirk, v katere smo nalili po 250 ml Steinbergovega ravnega gojišča, pripravljene po ISO standardih (Tabela 1). Kristalizirke, v katere smo prenesli malo vodno lečo, smo postavili na temno podlago v rastno komoro in jim po 7-ih dneh dodali različne koncentracije Se(IV).

Tabela 1: Sestava Steinbergovega gojišča (ISO/CD 20079)

Makroelementi	mg/L
KNO ₃	350
Ca(NO ₃) ₂ x H ₂ O	295
KH ₂ PO ₄	90
K ₂ HPO ₄	12
MgSO ₄ x 7H ₂ O	100
Mikroelementi	µg/L
H ₃ BO ₃	120
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	180
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	44
MnCl ₂ x 4H ₂ O	180
FeCl ₃ x 6H ₂ O	760
EDTA	1500

3.1.1 Priprava standardnih raztopin selenita

Za testne koncentracije smo izbrali 0,5, 1, 2, 5, 10 mg/L Se(IV). Pripravili smo založno raztopino natrijevega selenita (Na_2SeO_3).

Pri pripravi koncentracije Se(IV) 0,5 mg/L smo 0,5 mL založne raztopine natrijevega selenita razredčili v 999,5 mL Steinbergovega gojišča, tako da smo dobili 1 L standardne raztopine Se(IV). Po enakem postopku smo pripravili ostale koncentracije Se(IV) (Tabela 2). Za kontrolo smo uporabili samo Steinbergovo gojišče, brez dodanega Se(IV). Standardne raztopine Se(IV) smo pripravljali tedensko.

Tabela 2: Uporabljena razredčitvena vrsta za natrijev selenit

koncentracija (mg Se(IV)/L)	Steinbergovo gojišče (mL)	Založna raztopina (mL)
0,5	999,5	0,5
1	999	1
2	998	2
5	995	5
10	990	10

Za vsako obravnavanje smo pripravili 3 ponovitve.

3.1.2 Priprava vzorcev

V kristalizirkah smo pripravili po tri paralelke vzorcev male vodne leče za vsako obravnavanje s Se(IV) ter tri paralelke s kontrolno raztopino, brez dodanega Se(IV). Mali vodni leči v kristalizirki smo dodali 250 ml rastnega gojišča z želeno koncentracijo Se(IV). Kristalizirke smo pokrili s plastično folijo, da smo preprečili prekomerno izhlapevanje vode iz medija. Postavili smo jih na temno podlago v rastno komoro s temperaturo $22\pm 1^\circ\text{C}$. Vzorce smo naključno porazdelili v tri vrste, saj svetloba ni bila na vseh delih

komore enaka. Vzorcem male vodne leče smo tedensko menjali sveže pripravljena rastna gojišča z ustreznimi koncentracijami Se(IV).



Slika 4: Vzorci male vodne leče v rastni komori.

3.2 FIZIOLOŠKE IN BIOKEMIJSKE MERITVE

Merili smo izbrane fiziološke in biokemijske parametre: dihalni potencial s pomočjo meritev aktivnosti elektronskega transportnega sistema (ETS), fotokemično učinkovitost FS II ter vsebnost fotosinteznih barvil. Meritve smo opravljali tedensko. Za vsako koncentracijo Se(IV) smo opravili 7 vzorčenj. Meritve so potekale od 3.11. do 15.12. 2011.

Po tretjem in šestem tednu smo rastline, obravnavane s koncentracijo 10 mg Se(IV)/L, nadomestili z novimi, saj nam je zaradi propadanja rastlin zmanjkalo materiala za vzorčenje. Po četrtem tednu smo zaradi istega razloga zamenjali tudi kontrolne rastline z novimi.

3.2.1 Merjene dihalnega potenciala

Dihalni potencial smo ugotavljali s pomočjo meritev encimske aktivnosti elektronskega transportnega sistema (ETS) v mitohondrijih po metodi Packard (1971). Metoda temelji na redukciji umetnega elektronskega sprejemnika jodo-nitro-tetrazolium-klorida (INT), ki ga dodamo ekstraktu poskusnega tkiva.

Iz obravnavanja z določeno koncentracijo Se(IV) smo vzeli štiri vzorce male vodne leče. Rastline smo osušili na papirju in zatehtali 1 g sveže male vodne leče. Enako količino vzorca smo zavili v alu folijo ter sušili v sušilniku 24 ur pri temperaturi 105°C. Suho težo vzorca smo potrebovali, da smo lahko izračunali potencialno porabo kisika glede na suho maso.

Svež rastlinski material smo v terilnici homogenizirali s 4 mL ledeno hladno homogenizirajočo raztopino (0,1M fosfatni pufer, MgSO₄, polivinil piroolidon, Triton-X-100) in zlili v plastične epruvete na ledu. Vzorec smo na ledu 20 s homogenizirali z ultrazvočnim homogenizatorjem, da smo razbili celične in mitohondrijalne membrane. Ekstrakt smo centrifugirali 4 minute s frekvenco 10000 rpm pri temperaturi 0°C. Supernatant smo odlili v stekleno epruveto in vzorce razdelili v tri paralelke po 0,5 mL. Vsaki paralelki smo dodali 1,5 mL substratne raztopine (0,1 M fosfatni pufer, NADH, NADPH, Triton-X-100) in 0,5 mL jodo-nitro-tetrazolium klorida (INT), dobro premešali ter inkubirali 40 minut pri temperaturi 20°C. Po inkubaciji smo reakcijo ustavili z dodatkom 0,5 mL formaldehida in fosforne kisline v razmerju 1:1. Nastalo spojino formazan smo spektrofotometrično določili pri valovni dolžini 490 nm.

Produkcija formazana je sorazmerna potencialni porabi kisika v analiziranem tkivu. Potencialno porabo kisika smo izrazili na suho težo vzorca (Packard, 1971).

3.2.2 Merjenje vsebnosti barvil

Določali smo vsebnost klorofilov *a* in *b* ter karotenoidov pri vseh obravnavanjih male vodne leče.

Vsebnost klorofilov *a* in *b* (kl *a* in kl *b*) ter karotenoidov (*kar*) smo določali spektrofotometrično po metodi Lichtenthaler in Buschmann (2001a in 2001b). Rastlinsko tkivo smo strli v terilnici in ekstrahirali v 9 mL 100 % acetona. Vzorce smo centrifugirali 4 minute s frekvenco 4000 rpm pri temperaturi 4°C. Odčitali smo prostornino ekstrakta. S spektrofotometrom Lambda-12 smo določili ekstinkcije ekstrakta pri valovnih dolžinah 470, 644, 662 nm.

Vsebnosti klorofilov *a* in *b* ter karotenoidov na enoto suhe mase vzorca smo izračunali iz izmerjenih ekstinkcijskih vrednosti:

$$kl\ a\ [\text{mg g}^{-1}\ \text{sm}] = c_a \cdot V / \text{sm} = (11,24 \cdot E_{622} - 2,04 \cdot E_{644}) \cdot V / \text{sm} \quad \dots(1)$$

$$kl\ b\ [\text{mg g}^{-1}\ \text{sm}] = c_b \cdot V / \text{sm} = (20,13 \cdot E_{644} - 4,19 \cdot E_{662}) \cdot V / \text{sm} \quad \dots(2)$$

$$\text{kar}\ [\text{mg g}^{-1}\ \text{sm}] = (1000 \cdot E_{470} - 1,9 \cdot c_a - 63,14 \cdot c_b) \cdot V / \text{sm} / 214 \quad \dots(3)$$

c_a ...koncentracija klorofila *a*

c_b ...koncentracija klorofila *b*

V ...volumen ekstrakta (ml)

sm ...suha masa vzorca (g)

E_{622} ...ekstinkcija vzorca pri valovni dolžini 622 nm

E_{644} ... ekstinkcija vzorca pri valovni dolžini 644 nm

E_{470} ... ekstinkcija vzorca pri valovni dolžini 470 nm

3.2.3 Merjene fotokemične učinkovitosti FS II

Fotokemično učinkovitost smo merili s pomočjo fluorescence klorofila *a* fotosistema II (FS II) z modulacijskim fluorometrom (PAM 2100 Chlorophyll Fluorometer, Heinz Walz GmbH, Nemčija). Merili smo potencialno fotokemično učinkovitost FS II (F_v/F_m), izračunano kot $F_m - F_o / F_m$, kjer F_o pomeni minimalno florescenco klorofila *a* temotno prilagojenega vzorca, F_m pa maksimalno florescenco zatemnjenega vzorca. Čas zatemnitve vzorcev pred merjenjem je bil 10 minut (Trošt Sedej, 2005).

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke smo uredili v računalniškem programu Microsoft Excel 2010. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program Statgraphics 4.0.

4 REZULTATI

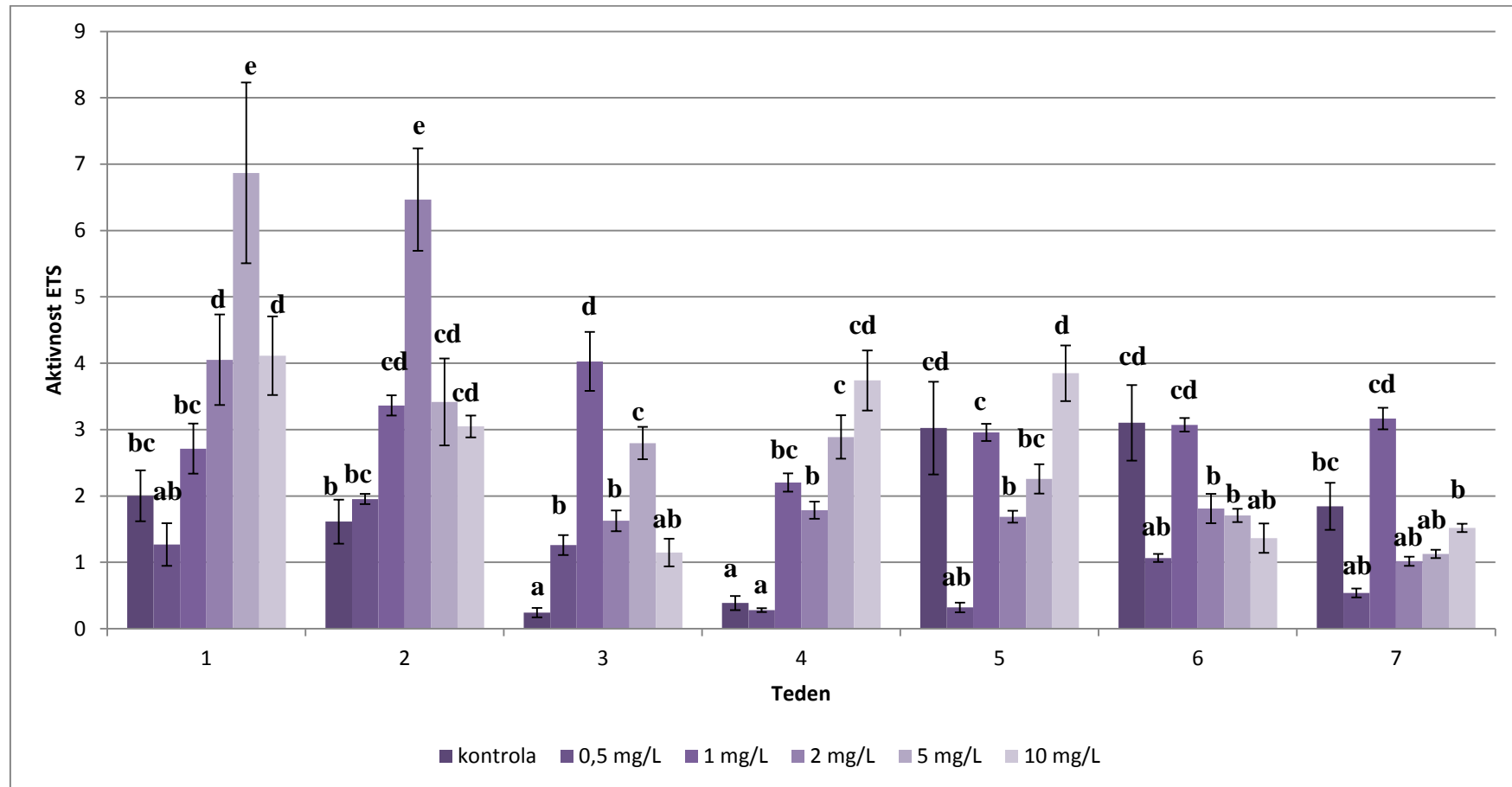
4.1 FIZIOLOŠKE MERITVE

4.1.1 Dihalni potencial

V prvem tednu se dihalni potencial v primerjavi s kontrolnimi rastlinami statistično značilno zviša pri rastlinah, obravnavanih s koncentracijami 2, 5, 10 mg/L dodanega selenita (Slika 5). V drugem in četrtem tednu smo izmerili višje vrednosti dihalnega potenciala v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri vseh obravnavanjih, razen pri dodatku 0,5 mg/L selenita, kjer ni bilo statistične razlike med kontrolnimi in poskusnimi rastlinami (Slika 5). V tretjem tednu so imele vse poskusne rastline, z izjemo rastlin, ki smo jim dodali 10 mg/L selenita, statistično značilno višji dihalni potencial v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. V petem tednu opazimo, da se dihalni potencial statistično značilno zniža v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, rastlinam, obravnavanimi s koncentracijami selenita 0,5 in 2 mg/L. Dihalni potencial se v primerjavi s kontrolnimi rastlinami v šestem tednu zniža pri vseh obravnavanjih s selenitom, razen pri koncentraciji 1 mg/L. V sedmem tednu nismo opazili statističnih razlik med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, obravnavanimi z različnimi koncentracijami selenita (Slika 5).

Opazili smo, da je imela mala vodna leča pri obravnavanju s koncentracijo selenita 0,5 mg/L tekom poskusa približno enak dihalni potencial, saj med posameznimi vzorčenji nismo izmerili statističnih razlik v primerjavi z začetno vrednostjo (Slika 5). Dihalni potencial se rastlinam, ki smo jim dodali 1 mg/L selenita poviša v tretjem tednu, v ostalih vzorčenjih pa nismo opazili statističnih razlik v dihalnem potencialu v primerjavi s prvim tednom poskusa. Pri dodatku selenita v koncentraciji 2 mg/L se dihalni potencial poviša v drugem tednu, nato se zniža v primerjavi s prvim tednom trajanja poskusa in ostane enak do sedmega tedna, kjer se še zniža (Slika 5). Dihalni potencial se rastlinam, ki smo jim dodali selenit v koncentraciji 5 mg/L v drugem tednu zniža, v primerjavi s prvim tednom poskusa, in ostaja približno enak do šestega tedna, kjer se zopet zniža. Dodatek selenita v koncentraciji 10 mg/L zniža dihalni potencial v tretjem in šestem tednu trajanja poskusa v primerjavi s prvim tednom (Slika 5).

V sedmem tednu trajanja poskusa je dihalni potencial pri rastlinah, obravnavanih z višjimi koncentracijami selenita (5 in 10 mg/L) statistično značilno nižji kot v prvem tednu. Nižji je tudi dihalni potencial pri rastlinah, obravnavanih s koncentracijo 2 mg/L. Pri koncentraciji 0,5 in 1 mg/L ni statističnih razlik v dihalnem potencialu med prvim in sedmim tednom poskusa.



Slika 5: Dihalni potencial, ocenjen s pomočjo meritev aktivnosti elektronskega transportnega sistema (ETS), za kontrolno vodno lečo in vodno lečo obravnavano s koncentracijami selenita 0,5, 1, 2, 5, 10 mg/L. Slika prikazuje povprečne vrednosti \pm SE, $n = 4$.

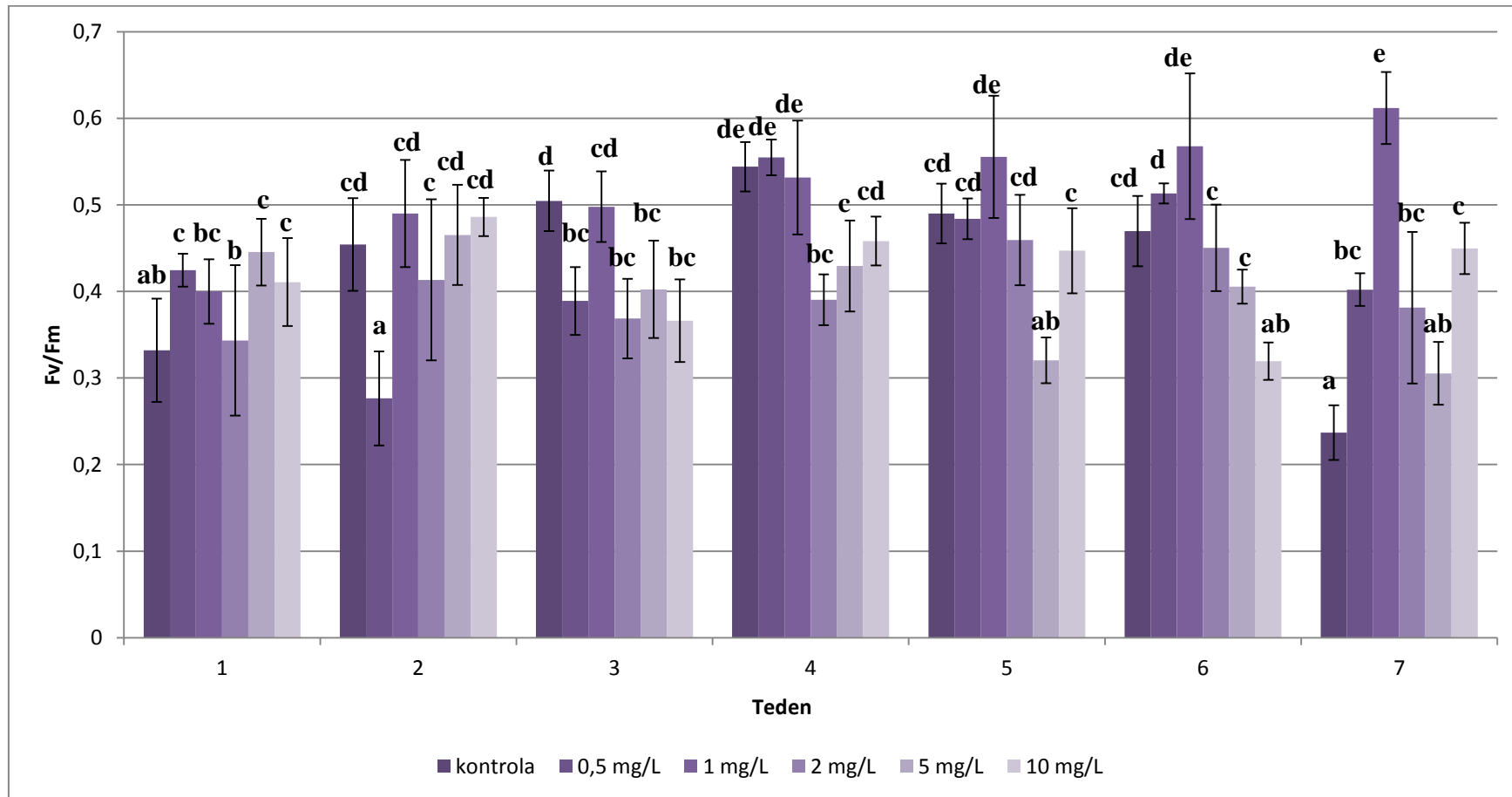
Opomba: Po tretjem in šestem tednu smo pri koncentraciji 10 mg/L na novo nasadili rastline. Po četrtem tednu smo na novo nasadili kontrolne rastline.

4.1.2 Fotokemična učinkovitost

Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti poskusnih rastlin so v prvem tednu statistično značilno višje v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri dodatku selenita v koncentraciji 0,5, 5 in 10 mg/L (Slika 6). V drugem tednu se potencialna fotokemična učinkovitost zniža, v primerjavi s kontrolo, poskusnim rastlinam z dodatkom selenita 0,5 mg/L. Statistično znižanje v primerjavi s kontrolnimi rastlinami opazimo v tretjem tednu pri vseh obravnavanih s selenitom, razen pri rastlinah, obravnavanih s koncentracijo 1 mg/L, kjer opazimo, da selenit pri tej koncentraciji ni vplival na potencialno fotokemično učinkovitost male vodne leče (Slika 6). Do znižanja fotokemične učinkovitosti v primerjavi s kontrolnimi rastlinami pride v četrtem tednu pri poskusnih rastlinah, ki smo jim dodali selenit v koncentracijah 2 in 5 mg/L. Dodatek selenita v koncentraciji 5 mg/L statistično značilno zniža vrednost fotokemične učinkovitosti poskusnih rastlin v petem tednu, v šestem tednu pa se v primerjavi s kontrolnimi rastlinami zniža vrednost rastlinam, ki smo jim dodali 10 mg/L selenita (Slika 6). Fotokemična učinkovitost se v sedmem tednu zviša, v primerjavi s kontrolo, vsem preučevanim rastlinam, razen rastlinam, ki smo jih obravnavali s koncentracijo 5 mg/L, kjer med kontrolnimi in poskusnimi rastlinami ne opazimo statistično značilne razlike.

Potencialna fotokemična učinkovitost se rastlinam, obravnavanim z dodatkom selenita 0,5 mg/L v drugem tednu statistično značilno zniža v primerjavi s prvim tednom poskusa, nato pa se v četrtem in šestem tednu zviša, v sedmem tednu pa ni več značilne razlike v dihalnem potencialu v primerjavi s prvim tednom (Slika 6). Rastlinam, ki smo jim dodali selenit v koncentraciji 1 mg/L, se vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti statistično značilno zviša v primerjavi s prvim tednom, v četrtem tednu, v sedmem tednu pa je njena vrednost še višja (Slika 6). Dodatek selenita v koncentraciji 2 mg/L je zvišal fotokemično učinkovitost v primerjavi z začetno vrednostjo v drugem, petem in šestem tednu. Potenciala fotokemična učinkovitost se je pri obravnavanju s koncentracijo selenita 5 mg/L statistično značilno znižala v petem in sedmem tednu v primerjavi s prvim tednom poskusa. Dodatek selenita v najvišji koncentraciji (10 mg/L) je znižal vrednost fotokemične učinkovitosti v šestem tednu, v primerjavi s prvim tednom.

V sedmem tednu poskusa je vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti v primerjavi s prvim tednom višja kot na začetku, pri rastlinah z dodatkom selenita 1 mg/L in nižja kot v prvem tednu, pri rastlinah obravnavanih s koncentracijo selenita 5 mg/L. Pri ostalih koncentracijah med prvim in sedmim tednom nismo izmerili značilnih razlik (Slika 6).



Slika 6: Potencialna fotokemična učinkovitost (F_v/F_m) za kontrolno vodno lečo in vodno lečo obravnavano s koncentracijami selenita 0,5, 1, 2, 5, 10 mg/L. Slika prikazuje povprečne vrednosti \pm SD, $n = 5$.

Opomba: Po tretjem in šestem tednu smo pri koncentraciji 10 mg/L na novo nasadili rastline. Po četrtem tednu smo na novo nasadili kontrolne rastline.

4.2 BIOKEMIJSKE MERITVE

4.2.1 Vsebnost barvil

4.2.1.1 Klorofil *a*

V prvem in drugem tednu smo opazili, da dodatek različnih koncentracij selenita ni imel bistvenega vpliva na vsebnost klorofila *a* pri mali vodni leči. V drugem tednu se sicer zniža vsebnost klorofila *a* v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri obravnavanju z višjimi koncentracijami selenita (5 in 10 mg/L), vendar značilne razlike nismo izmerili (Tabela 3). Od tretjega do sedmega tedna so imele višjo vsebnost klorofila *a* v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, poskusne rastline, ki smo jim dodali selenit v koncentraciji 1 mg/L.

V petem tednu smo izmerili statistično značilno zvišanje vsebnosti klorofila *a*, pri mali vodni leči, ki smo ji dodali 1 mg/L selenita, v primerjavi s prvim tednom trajanja poskusa. Pri tej koncentraciji smo v petem tednu izmerili najvišjo vsebnost klorofila *a*. Statistično značilno višjo vsebnost klorofila *a* v primerjavi s prvim tednom trajanja poskusa, smo izmerili tudi pri poskusnih rastlinah z dodatkom 5 mg/L selenita v drugem tednu (Tabela 3).

V sedmem tednu poskusa je bila vsebnost klorofila *a* višja kot v prvem tednu, pri rastlinah obravnavanih s koncentracijo 1 mg/L, vendar značilne razlike nismo izmerili. Prav tako smo v sedmem tednu pri obravnavanju rastlin z ostalimi koncentracijami opazili nižjo vsebnost klorofila *a*, v primerjavi s prvim tednom, vendar značilne razlike nismo ugotovili.

Tabela 3: Vsebnost klorofila *a* ($\text{mg g}^{-1} \text{ sm}$) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.

vzorčenje	kontrola	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
1	2,58±0,12 ^{ab}	2,87±0,59 ^{ab}	2,79±0,28 ^{ab}	2,03±0,26 ^{ab}	2,34±0,46 ^b	1,68±0,17 ^{ab}
2	1,80±0,26 ^{ab}	1,57±0,19 ^{ab}	2,05±0,34 ^{ab}	1,74±0,28 ^{ab}	1,42±0,49 ^a	1,31±0,09 ^a
3	0,71±0,11 ^a	1,33±0,24 ^a	3,11±0,95 ^b	2,19±0,37 ^{ab}	1,60±0,35 ^{ab}	1,36±0,47 ^a
4	0,87±0,20 ^a	0,79±0,21 ^a	3,24±0,24 ^b	2,14±0,21 ^{ab}	1,00±0,16 ^a	1,01±0,27 ^a
5	2,14±0,40 ^{ab}	1,66±0,25 ^{ab}	5,58±2,03 ^c	2,59±0,41 ^{ab}	1,49±0,16 ^a	1,71±0,70 ^{ab}
6	2,18±0,34 ^{ab}	0,94±0,17 ^a	4,18±0,61 ^{bc}	1,00±0,18 ^a	1,79±0,35 ^{ab}	1,16±0,19 ^a
7	1,92±0,73 ^{ab}	0,87±0,36 ^a	3,84±0,55 ^{bc}	1,12±0,60 ^a	1,77±0,14 ^{ab}	1,40±0,39 ^a

Opomba: Po tretjem in šestem tednu smo pri koncentraciji 10 mg/L na novo nasadili rastline. Po četrtem tednu smo na novo nasadili kontrolne rastline.

4.2.1.2 Klorofil *b*

V prvih treh tednih nismo opazili značilnih razlik v vsebnosti klorofila *b*, pri obravnavanju male vodne leče z različnimi koncentracijami selenita (Tabela 4). V četrtem tednu je vsebnost klorofila *b* statistično značilno višja pri rastlinah, ki smo jim dodali višje koncentracije selenita (5 in 10 mg/L). Od petega do sedmega tedna značilnih razlik v vsebnosti klorofila *b* nismo več ugotovili, vendar smo opazili povišanje v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri mali vodni leči z dodatkom selenita 1 mg/L v četrtem in petem tednu.

Koncentraciji selenita 0,5 mg/L in 2 mg/L nista imeli bistvenega vpliva na vsebnost klorofila *b* pri mali vodni leči, saj med obravnavanjem poskusnih in kontrolnih rastlin nismo opazili statističnih razlik (Tabela 4). Vsebnost klorofila *b* je pri vodni leči, obravnavani s koncentracijo selenita 1 mg/L, v primerjavi s kontrolno rastlino višja od četrtega do sedmega tedna, vendar značilnih razlik nismo ugotovili.

Pri obravnavanih rastlin z 5 mg/L in 10 mg/L dodanega selenita smo opazili statistično značilno višjo vsebnost klorofila *b* v četrtem tednu, v ostalih vzorčenjih pa značilnih razlik ni bilo (Tabela 4).

V sedmem tednu poskusa je bila vsebnost klorofila *b* nižja kot v prvem tednu, pri vseh obravnavanih s selenitom, razen pri najvišji koncentraciji selenita (10 mg/L), vendar statistično značilnih razlik nismo izmerili (Tabela 4).

Tabela 4: Vsebnost klorofila *b* ($\text{mg g}^{-1} \text{ sm}$) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.

vzorčenje	kontrola	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
1	2,14±0,29 ^a	2,06±0,31 ^a	1,95±0,59 ^a	1,46±0,18 ^a	1,88±0,48 ^a	1,37±0,15 ^a
2	1,55±0,32 ^a	0,93±0,25 ^a	1,32±0,32 ^a	1,12±0,26 ^a	1,34±0,51 ^a	1,68±0,47 ^a
3	0,75±0,20 ^a	1,21±0,23 ^a	1,47±0,54 ^a	1,24±0,32 ^a	1,28±0,56 ^a	1,24±0,45 ^a
4	1,03±0,28 ^a	0,85±0,20 ^a	2,88±1,20 ^{ab}	1,19±0,15 ^a	4,22±0,02 ^b	4,07±1,13 ^b
5	2,41±0,70 ^a	1,75±0,22 ^a	3,76±1,36 ^{ab}	2,03±0,55 ^a	1,21±0,10 ^a	1,76±1,06 ^a
6	1,71±0,59 ^a	1,20±0,56 ^a	2,33±0,37 ^a	1,01±0,23 ^a	1,15±0,24 ^a	0,87±0,23 ^a
7	1,19±0,60 ^a	0,84±0,42 ^a	1,82±0,57 ^a	0,50±0,66 ^a	1,41±0,20 ^a	1,55±0,51 ^a

Opomba: Po tretjem in šestem tednu smo pri koncentraciji 10 mg/L na novo nasadili rastline. Po četrtem tednu smo na novo nasadili kontrolne rastline.

4.2.1.3 Karotenoidi

V prvem tednu smo opazili, da se je vsebnost karotenoidov pri mali vodni leči povečala, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, rastlinam obravnavanim s koncentracijami selenita 1, 2 in 5 mg/L. V drugem, četrtem in sedmem tednu dodatek selenita ni vplival na vsebnost karotenoidov pri nobeni preučevani koncentraciji. V tretjem tednu so imele višjo vsebnost karotenoidov v primerjavi s kontrolo poskusne rastline, ki smo jih obravnavali z 1 in 2 mg/L selenita, v petem tednu pa rastline z 1 in 10 mg/L dodanega selenita (Tabela 5). Opazili smo, da se je v šestem tednu znižala vsebnost karotenoidov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, tistim rastlinam, ki smo jim dodali 0,5 mg/L selenita.

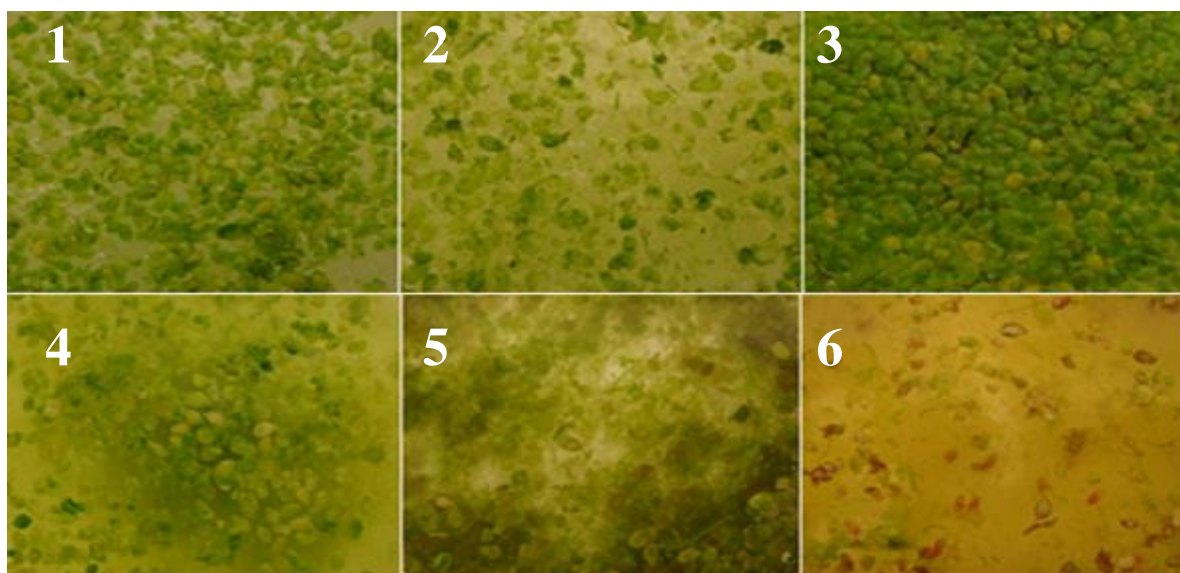
Pri poskusnih rastlinah, obravnavanih s koncentracijo selenita 0,5 mg/L, smo izmerili značilno zvišanje vsebnosti karotenoidov v drugem tednu v primerjavi s prvim tednom trajanja poskusa (Tabela 5). Statistično značilno zvišanje vsebnosti karotenoidov smo opazili tudi pri mali vodni leči z dodatkom 1 mg/L selenita v petem tednu ter pri obravnavanju poskusnih rastlin s koncentracijo 10 mg/L v petem tednu.

V primerjavi s prvim tednom, v sedmem tednu nismo opazili značilnih razlik v vsebnosti karotenoidov pri obravnavanjih z različnimi koncentracijami selenita, medtem ko smo opazili višjo vsebnost karotenoidov pri kontrolnih rastlinah. Opazili smo zvišanje pri koncentracijah 0,5 in 1 mg/L ter znižanje pri koncentracijah 2, 5 in 10 mg/L, vendar ni bilo statistično značilno (Tabela 5).

Tabela 5: Vsebnost karotenoidov (mg g^{-1} sm) pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita.

vzorčenje	kontrola	0,5 mg/L	1 mg/L	2 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
1	0,09±0,02 ^a	0,12±0,04 ^a	1,03±0,11 ^{bc}	0,76±0,12 ^{bc}	0,83±0,08 ^{bc}	0,52±0,05 ^{ab}
2	0,69±0,05 ^b	0,69±0,04 ^b	0,86±0,12 ^{bc}	0,69±0,07 ^b	0,42±0,16 ^{ab}	0,29±0,07 ^{ab}
3	0,22±0,04 ^a	0,44±0,09 ^{ab}	1,19±0,34 ^c	0,84±0,15 ^{bc}	0,51±0,08 ^{ab}	0,40±0,14 ^{ab}
4	0,31±0,08 ^{ab}	0,23±0,07 ^a	1,04±0,29 ^{bc}	0,77±0,06 ^{bc}	/	/
5	0,66±0,07 ^b	0,55±0,12 ^{ab}	1,80±0,65 ^d	0,88±0,08 ^{bc}	0,50±0,049 ^{ab}	1,26±1,55 ^c
6	0,75±0,05 ^{bc}	0,21±0,08 ^a	1,38±0,20 ^{cd}	0,29±0,06 ^{ab}	0,64±0,11 ^b	0,40±0,06 ^{ab}
7	0,87±0,25 ^{bc}	0,37±0,14 ^{ab}	1,35±0,12 ^{cd}	0,41±0,13 ^{ab}	0,55±0,03 ^{ab}	0,41±0,10 ^{ab}

Opomba: Po tretjem in šestem tednu smo pri koncentraciji 10 mg/L na novo nasadili rastline. Po četrtem tednu smo na novo nasadili kontrolne rastline.



Slika 7: Mala vodna leča, obravnavana z različnimi koncentracijami selenita na koncu poskusa: (1) kontrola, (2) 0,5 mg/L, (3) 1 mg/L, (4) 2 mg/L, (5) 5mg/L, (6) 10 mg/L.

5 RAZPRAVA

5.1 DIHALNI POTENCIAL

Povečana potreba po energiji je eden od odgovorov na stresne razmere, zato je sposobnost premagovanja stresa pri vitalnih rastlinah povezana z dihalnim potencialom, ki ga ugotavljamo s pomočjo meritev elektronskega transportnega sistema (aktivnostjo ETS) določenega tkiva. Večji dihalni potencial zagotavlja več energije, kar omogoča rastlini vzpostavitev zaščitnih in popravljivih mehanizmov in rastlina poveča odpornost na neugodne, stresne razmere (Germ in Gaberščik, 2003). Povečana aktivnost ETS je lahko pokazatelj, da je rastlina pod stresom.

V naši raziskavi smo ugotovili, da koncentracija selenita 0,5 mg/L ni imela večjega vpliva na dihalni potencial male vodne leče, saj med trajanjem poskusa nismo izmerili značilnih razlik v dihalnem potencialu v primerjavi s prvim tednom (Slika 5). Opazili smo značilno zvišanje dihalnega potenciala pri tej koncentraciji v primerjavi s kontrolnimi rastlinami v tretjem tednu, kar lahko nakazuje da je bila rastlina pod stresom. To potrjuje tudi vrednost fotokemične učinkovitosti, ki je v tretjem tednu statistično značilno nižja od kontrole (Slika 6).

Mala vodna leča, ki je uspevala v mediju, kjer je bila koncentracija selenita 1 mg/L, je imela v prvem delu poskusa večinoma višji dihalni potencial v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Slika 5). Germ in Gaberščik (2003) poročata, da imajo višji dihalni potencial rastline, ki uspevajo v manj ugodnih razmerah ter rastline v času intenzivne rasti. Večji dihalni potencial pri tej koncentraciji v primerjavi s kontrolnimi rastlinami je lahko posledica intenzivne rasti male vodne leče, kar lahko opazimo na sliki 7. Po poročanju Mechora in Germ (2010) je aktivnost elektronskega transporta na začetku rastne sezone večja, ker rastline potrebujejo več energije za intenzivno rast. Da imajo rastline na začetku poskusa povišan dihalni potencial zaradi intenzivne rasti, potrjujejo tudi rezultati fotokemične učinkovitosti, ki ostajajo statistično enaki kontrolnim rastlinam (Slika 6). Višjo aktivnost ETS na začetku rasti sta opazili tudi Mazej in Gaberščik (1999) pri vodni rastlini *Potamogeton crispus*. Ugotovljeno je bilo, da tudi selenat pri tej koncentraciji

povzroči povišanje dihalnega potenciala pri mali vodni leči v primerjavi s kontrolnimi rastlinami (Šut, 2012).

Pri obravnavanju rastlin s koncentracijo selenita 2 mg/L je bil dihalni potencial do petega tedna višji v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, od petega tedna naprej pa nižji in v sedmem tednu ni bil statistično različen od kontrole (Slika 5). Predvidevamo lahko, da je bil visok dihalni potencial v prvih dveh tednih posledica intenzivne rasti male vodne leče, v tretjem in četrtem tednu pa višji dihalni potencial in nižja fotokemična učinkovitost v primerjavi s kontrolnimi rastlinami nakazujeta na stres, ki bi ga lahko selenit povzročil za rastlino.

Pri spremljanju dihalnega potenciala v vegetacijski sezoni pri vodnih rastlinah: klasastem rmancu (*Myriophyllum spicatum* L.), alpskem dristavcu (*Potamogeton alpinus* Balbis) in navadnem rogolistu (*Ceratophyllum demersum* L.) je bilo ugotovljeno, da so imeli poganjki klasastega rmanca in navadnega rogolista največji dihalni potencial v času aktivne rasti v začetku pomladi in v jeseni (Mazej in Gaberščik, 1999; Mazej, 2000; Gaberščik in sod., 2002).

Dodatek selenita v koncentraciji 5 mg/L v prvem delu poskusa zviša dihalni potencial male vodne leče v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, proti koncu poskusa pa dihalni potencial upade ali pa ni značilno različen od kontrole (Slika 5). Dihalni potencial se pri tej koncentraciji zmanjšuje v primerjavi z vrednostjo v prvem tednu. Glede na vrednosti fotokemične učinkovitosti fotosistema II (Slika 6), lahko predvidevamo, da je visok dihalni potencial v tretjem in četrtem tednu posledica stresnega delovanja selenita na malo vodno lečo. Če pri dodatku selenita 10 mg/L upoštevamo, da smo rastline po tretjem in šestem tednu zamenjali z novimi, dobimo podoben vzorec znižanja dihalnega potenciala. Dihalni potencial se v primerjavi z začetno vrednostjo zniža v tretjem in šestem tednu. Ko je organizem pod stresom, potrebuje več energije, poveča se produkcija ATP in poraba O₂ v mitohondrijih (Germ in Gaberščik, 2003). Prevelik stres povzroči zmanjšanje vitalnosti tkiva, nižanje fotosinteze in tako tudi znižanje dihalnega potenciala (Germ in Gaberščik, 2003). Ko je stres prevelik in se rastlina ne more več spopadati z njim, dihalni potencial upade (Ožbolt in sod., 2008), kar se zgodi tudi v našem primeru pri najvišjih koncentracijah dodanega selenita.

5.2 FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST

Potencialna fotokemična učinkovitost nam pove, ali je rastlina zaradi različnih dejavnikov pod stresom (Schreiber in sod., 1995). Rastline, ki uspevajo v ugodnih razmerah, so sposobne izrabiti več absorbirane svetlobe za fotokemično delo, kot rastline, ki so izpostavljene stresnim razmeram (Trošt Sedej, 2005). Vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti FS II od 0,80 do 0,83 pri kopenskih rastlinah pomenijo, da rastlina ni pod stresom (Schreiber in sod., 1995). Iz podatkov, dobljenih v naši raziskavi, lahko vidimo, da so vse vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti nižje od teoretičnih (Slika 6). Po poročanju Šraj-Kržič in Gaberščik (2005) je fotokemična učinkovitost rastlin v vodnem okolju lahko motena z različnimi tipi stresa, kot so fotoinhibicija (Gaberščik in Mazej, 1995), UV-B sevanje (Gaberščik in sod., 2002) in razpoložljivost CO₂. Moteči dejavniki so vezani na nihanje vodnega nivoja in lahko povzročijočasne motnje FS II (Šraj-Kržič in Gaberščik, 2005). Do nihanja vodnega stanja je prihajalo tudi v našem poskusu, je med poskusom prihajalo do povečanega izhlapevanja vode iz medija.

Potencialna fotokemična učinkovitost male vodne leče obravnavane s koncentracijo selenita 0,5 mg/L se v drugem tednu poskusa zniža v primerjavi z začetno vrednostjo, nato se povišuje in je na koncu statistično enaka kot v prvem tednu (Slika 6). V primerjavi s kontrolnimi rastlinami pa se fotokemična učinkovitost rastlin pri tej koncentraciji zniža v drugem in tretjem tednu. Predpostavljamo, da selenit pri tej koncentraciji ne vpliva na malo vodno lečo oziroma lahko selenit nanjo v tretjem tednu deluje stresno.

Zanimivo je, da med začetkom in koncem poskusa nismo izmerili večjih razlik pri vodni leči, obravnavani z najvišjo koncentracijo selenita 10 mg/L (Slika 6). Vendar, če upoštevamo, da smo pri tej koncentraciji v sedmem in četrtem tednu nadomestili rastline z novimi, vendarle opazimo znižanje fotokemične učinkovitosti v tretjem in šestem tednu v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Tudi Mechora (2011) s sodelavci poroča, da pri tej koncentraciji selenat zniža potencialno fotokemično učinkovitost pri dveh vodnih makrofitih: *Myriophyllum spicatum* in *Ceratophyllum demersum*. Znižanje fotokemične učinkovitosti pri koncentraciji selenita 10 mg/L je bilo ugotovljeno tudi pri treh vodnih rastlinah: *Myriophyllum spicatum*, *Ceratophyllum demersum* in *Potamogeton perfoliatus* (Mechora in sod., 2013).

Značilno večjo potencialno fotokemično učinkovitost v primerjavi s prvim tednom, smo na koncu poskusa izmerili pri mali vodni leči, obravnavani s koncentracijo selenita 1 mg/L (Slika 6), kar lahko pomeni, da je dodatek selenita v tej koncentraciji pozitivno vplival na rast rastlin. Na koncu poskusa smo izmeri večjo potencialno fotokemično učinkovitost v primerjavi s kontrolo, tudi pri vodni leči, obravnavani s koncentracijo selenita 2 mg/L. Pri tej koncentraciji smo v tretjem in četrtem tednu izmerili znižanje potencialne fotokemične učinkovitosti v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, kar nakazuje da so bile rastline pod stresom.

Pri vodni leči, obravnavani s koncentracijo selenita 5 mg/L, smo izmerili nižjo potencialno fotokemično učinkovitost kot na začetku poskusa (Slika 6), kar lahko pomeni, da selen pri tej koncentraciji deluje neugodno na rastline in povzroča poškodbe fotosinteznega aparata.

5.3 VSEBNOST BARVIL

Rastline se na spremembe v okolju prilagajajo na različne načine, med katerimi so tudi spremembe v koncentraciji barvil. Stresne razmere pospešujejo nastajanje kisikovih radikalov, ki poleg drugih škodljivih učinkov spodbujajo razgradnjo klorofila (Tausz in sod., 1999). Ugotovili smo, da se pri mali vodni leči, obravnavani z različnimi koncentracijami selenita, spreminjata predvsem vsebnost klorofila *a* in karotenoidov. Vsebnosti klorofila *b* ostajajo večinoma nespremenjene. Spremenjena količina in sestava fotosinteznih barvil je eden od kazalnikov vitalnosti rastline (Lichtenthaler 1993).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da dodatek selenita v koncentraciji 0,5 in 2 mg/L ni vplival na izgradnjo klorofilov (klorofila *a* in klorofila *b*) pri mali vodni leči (Tabela 3 in 4). V nekaj primerih smo sicer izmerili nižjo vsebnost klorofila *a* in *b* v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, vendar brez statistično značilnih razlik.

Pri mali vodni leči, ki je bila obravnavana s koncentracijo 1 mg/L dodanega selenita, smo opazili povišanje vsebnosti klorofila *a* ter višje vsebnosti klorofila *b*, ki pa niso bile statistično značilne (Tabela 3). Sklepamo lahko, da je koncentracija selenita 1 mg/L pozitivno vplivala na izgradnjo klorofilov. To je tudi razvidno iz slike 7, kjer lahko vidimo, da so poskusne rastline, obravnavane s koncentracijo 1 mg/L večje in bolj zelene v

primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Rezultate fotosinteznih barvil potrjujejo tudi rezultati dihalnega potenciala in fotokemične učinkovitosti. Podobno vpliva na malo vodno lečo tudi selenat pri koncentraciji 1 mg/L, ki deluje vzpodbujevalno na izgradnjo klorofilov (Šut, 2012).

Nižanje vsebnosti klorofila *a*, v primerjavi z začetno vrednostjo, smo izmerili pri obravnavanju male vodne leče s koncentracijo selenita 5 mg/L (Tabela 3). V četrtem tednu smo pri najvišjih koncentracijah (5 in 10 mg/L) dodanega selenita izmerili najvišjo vsebnost klorofila *b* v primerjavi s kontrolo (Tabela 4). Rahlo povišanje vsebnosti klorofilov pri dodatku selenata v koncentraciji 10 mg/L opazijo tudi Mechora in sod. (2011) pri vodni rastlini *Ceratophyllum demersum*. Pri dodatku selenita 10 mg/L nismo opazili jasnega vpliva na vsebnost klorofila *a*, vendar če upoštevamo, da smo pri najvišji koncentraciji zaradi propadanja rastlin, le te zamenjali z novimi v četrtem in sedmem tednu, iz rezultatov lahko sklepamo, da se vsebnost klorofilov znižuje od prvega do četrtega tedna, vendar brez značilnih razlik. Znižanje vsebnosti klorofilov pri makrofitih lahko pripišemo zaviranju izgradnje klorofila, kar se kaže tudi v znižanju fotosintezne aktivnosti (Chandra in Kulshreshtha, 2004).

Količina karotenoidov se je na koncu poskusa znižala, v primerjavi z začetno vrednostjo, pri mali vodni leči, obravnavani z višjimi koncentracijami selenita (2, 5, 10 mg/L) ter zvišala pri obravnavanju s koncentracijami 0,5 in 1 mg/L, vendar značilnih razlik nismo izmerili (Tabela 5). Opazimo statistično zvišanje vsebnosti karotenoidov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami pri obravnavanju s koncentracijami 1 in 2 mg/L dodanega selenita. V petem tednu opazimo pri koncentraciji 10 mg/L porast karotenoidov v primerjavi s prvim tednom, kar lahko zopet pripišemo menjavi starih rastlin z novimi v četrtem tednu.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da se mala vodna leča z različno vsebnostjo fotosinteznih barvil prilagaja na spremenjene razmere ob dodatku selenita. Mechora s sodelavci (2013) ugotavlja, da višje koncentracije selenita lahko vplivajo na proces fotosinteze, ne da bi vplivale na tvorbo fotosinteznih barvil. Navaja še, da bi ob daljši izpostavljenosti rastlin visokim koncentracijam selenita najverjetneje prišlo do poškodb kloroplastov in tako do motenj v procesu fotosinteze.

6 SKLEPI

Rezultati naše raziskave so pokazali, da nizke koncentracije dodanega selenita (0,5 mg/L) niso bistveno vplivale na preučevane fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče.

Pozitiven vpliv selenita na rast male vodne leče smo opazili pri obravnavanju rastlin s koncentracijo 1 mg/L dodanega selenita, kjer smo izmerili najvišjo vsebnost fotosinteznih barvil in najvišjo potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Opazili pa smo tudi intenzivnejšo rast male vodne leče in povišan dihalni potencial.

Rezultati so pokazali, da visoke koncentracije (5 in 10 mg/L) dodanega selenita stresno vplivajo na malo vodno lečo.

7 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo preučevali vpliv selenita na izbrane fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče. Selen je element, ki je naravno prisoten v tleh, od koder lahko prehaja v vodno okolje. O vplivu selena na vodne rastline ni opravljenih veliko raziskav. Znano je, da lahko rastline kopičijo selen v svojih tkivih, kjer v visokih koncentracijah deluje stresno na rastline. Nizke koncentracije selena pa lahko izboljšajo vitalnost rastlinskih tkiv.

Raziskavo smo opravljali na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete na Katedri za ekologijo in varstvo okolja. Malo vodno lečo smo izpostavili različnim koncentracijam (0,5, 1, 2, 5, 10 mg/L) selenita v ravnem gojišču in ji v določenih časovnih intervalih merili izbrane fiziološke in biokemijske lastnosti. Poskus smo izvajali sedem tednov. Dihalni potencial male vodne leče smo ugotavljali z merjenjem elektronskega transportnega sistema (aktivnostjo ETS). S pomočjo modulacijskega fluorometra, smo preko fluorescencije klorofila *a*, spremljali fotokemično učinkovitost preučevanih rastlin. Z biokemijskimi analizami smo določali vsebnost fotosinteznih barvil v poskusnih rastlinah, klorofila *a* in *b* ter karotenoidov.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je vpliv selenita na dihalni potencial male vodne leče pri najnižji dodani koncentraciji 0,5 mg/L minimalen, saj med poskusom nismo izmerili značilnih razlik, v primerjavi z vrednostjo dihalnega potenciala, v prvem tednu poskusa. Pri najnižji koncentraciji smo izmerili značilno višji dihalni potencial, v primerjavi s kontrolo, tretji teden poskusa. Višje vrednosti dihalnega potenciala, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, smo opazili v prvem delu poskusa pri mali vodni leči, obravnavani z dodatkom selenita 1 mg/L, v zadnjih treh tednih pa se vrednosti niso značilno razlikovale od kontrole. Višje koncentracije selena (2, 5, 10 mg/L) so v prvih tednih povzročile zvišanje dihalnega potenciala, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, proti koncu poskusa pa znižanje in tako vrednosti manjše od kontrolnih. Podobne rezultate smo dobili tudi pri merjenju fotokemične učinkovitosti fotosistema II. Koncentracija selenita 0,5 mg/L ni imela jasnega vpliva na fotokemično učinkovitost male vodne leče. Vrednosti so bile značilno nižje od kontrolnih v drugem in tretjem tednu ter višje v sedmem tednu poskusa. Fotokemična učinkovitost se je v primerjavi s kontrolnimi

rastlinami najbolj povišala pri poskusnih rastlinah z dodatkom selenita 1 mg/L, kjer smo zasledili tudi povečano rast male vodne leče v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Povišanje fotokemične učinkovitosti, v primerjavi z začetno vrednostjo, smo izmerili tudi pri rastlinah, obravnavanih s koncentracijo 2 mg/L selenita. Dodatek selenita v višjih koncentracijah (5, 10 mg/L) je imel na fotokemično učinkovitost negativen vpliv. Vrednosti, ki smo jih izmerili, so bile v splošnem nižje od kontrolnih. Pri dodatku selenita v koncentraciji 0,5 in 2 mg/L se vsebnost klorofilov (klorofila *a* in klorofila *b*) ni bistveno spremenila. Opazili smo rahlo povišanje klorofila *a*, v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri obravnavanju z 2 mg/L dodanega selenita, ki pa ni bilo statistično značilno. Pri najnižji koncentraciji dodanega selenita (0,5 mg/L) smo proti koncu poskusa izmerili nižjo vsebnost karotenoidov v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, medtem ko smo pri koncentraciji 2 mg/L dodanega selenita izmerili porast karotenoidov v primerjavi s kontrolo na začetku poskusa. Dodatek selena 1 mg/L je pozitivno vplival na izgradnjo klorofilov in karotenoidov, saj smo izmerili višje vrednosti kot pri kontrolnih rastlinah. Mala vodna leča je bila pri tej koncentraciji tudi na pogled bolj zelena. V večini smo nižje vsebnosti klorofilov *a* in *b* ter karotenoidov v primerjavi z začetno vrednostjo opazili tudi pri najvišjih dodatkih selenita (5, 10 mg/L), zato lahko sklepamo, da selenit v visokih koncentracijah deluje negativno na izgradnjo fotosinteznih barvil.

Selenit pri koncentraciji 0,5 mg/L ni vplival na vrednosti dihalnega potenciala, fotokemične učinkovitosti fotosistema II in vsebnost fotosintetskih pigmentov, medtem ko je dodatek selenita 1 mg/L na izbrane fiziološke in biokemijske lastnosti vplival pozitivno. Selenit v višjih koncentracijah (5, 10 mg/L) je na malo vodno lečo deloval stresno.

8 PRENOS PRIDOBLENEGA ZNANJA NA POUK V OSNOVNI ŠOLI

8.1 ANALIZA UČNIH NAČRTOV

Pri pregledu učnih načrtov za biologijo in naravoslovje sem ugotovila, da je tema diplomske naloge široko uporabna pri poučevanju v osnovni šoli.

Mala vodna leča je zaradi svoje zgradbe, hitre rasti in enostavnega gojenja primeren organizem za preučevanje različnih vplivov na rastline. V osnovni šoli bi bila smiselna njena izpostavitvev različnim dejavnikom, ob katerih bi lahko učenci v določenih časovnih intervalih spremljali njene morfološke in anatomske lastnosti. Štetje stebelnih členov, spremembe barve in propad korenin bi bili pokazatelji stanja rastline. Rastopina natrijevega selenita je strupena in nevarna za delo v osnovni šoli, zato bi jo bilo potrebno zamenjati z bolj primernimi snovmi.

8.1.1 Učna tema: Človek onesnažuje zrak, vodo in tla

Učenci v 7. razredu, pri vsebinskem sklopu: VPLIVI ČLOVEKA NA OKOLJE spoznajo, da se zaradi naravnih vzrokov in človeških dejavnosti lahko v vodi poveča vsebnost snovi (onesnaževalcev), ki škodljivo vplivajo na rastline in s tem rušijo naravno ravnovesje.

Učenci gojijo malo vodno lečo v različnih vodah (v vodi, onesnaženi z detergentom, vodovodni vodi, vodi iz bližnjega potoka, vodi onesnaženi z žveplom, CO₂...) ter v določenih časovnih intervalih spremljajo morfološke in anatomske lastnosti male vodne leče.

8.1.2 Učna tema: Zgradba in delovanje rastlin

Učenci v 6. razredu, pri vsebinskem sklopu ŽIVA NARAVA spoznajo, da rastlina potrebuje mineralne snovi, ki jih privzema iz okolja kot surovino za proizvodnjo nekaterih lastnih snovi.

Učenci gojijo malo vodno lečo v različnih rastnih gojiščih, ki jim povečujejo in zmanjšujejo količino mineralnih snovi (K, Ca, N, Mg, P) ter spremljajo znake pomanjkanja in povečanja mineralnih hranil na rastlinah.

8.1.3 Učna tema: Prilagoditve rastlin na okolje

Učenci v 7. razredu, pri vsebinskem sklopu: ŽIVA NARAVA spoznajo raznolikost zgradbe rastlin glede prilagoditve na okolje ter da so rastline v svojem okolju v času rasti in razvoja lahko občasno ali stalno izpostavljene različnim stresnim dejavnikom.

Učenci gojijo malo vodno lečo v bazičnem in kislem okolju in spremljajo njen odziv na morfološko-anatomski ravni. Pri tem uporabljajo nenevarne kisline in baze (npr. citrsko kislino in pecilni prašek).

8.2 PRIMER UČNE PRIPRAVE

Učna priprava	
Predmet: Naravoslovje Razred: 7	Naslov teme: Rast rastlin v onesnaženih vodah
Vsebinski sklop:	Vplivi človeka na okolje
Učna enota:	Človek onesnažuje zrak, vodo in tla
Cilji:	<p>Učenci:</p> <ul style="list-style-type: none"> • spoznajo, da se zaradi naravnih procesov in človeške dejavnosti lahko v vodi, zraku in tleh poveča vsebnost snovi, ki škodljivo vplivajo na organizme in s tem rušijo naravno ravnovesje • spoznajo glavne vzroke onesnaževanja (površinskih voda, podtalnice), ključne onesnaževalce, posledice njihovega delovanja na organizme in okolje ter načine in ukrepe za zmanjšanje in preprečevanje onesnaženja

Učne metode:	razlaga, opis, pogovor, eksperiment, sklepanje, demonstracijski eksperiment, metoda vodenega pogovora
Oblike dela:	frontalna, skupinska
Učna sredstva:	delovni list
Literatura:	<p>Učni načrt. Program osnovna šola. Naravoslovje [elektronski vir] – Ljubljana: Ministrstvo za šolstvo in šport: Zavod RS za šolstvo, 2011</p> <p>Glažar S.A., Slavinec M., Svečko M., Stefanovik V. 2009. Naravoslovje: za 7. razred devetletne osnovne šole. Delovni zvezek. Ljubljana: DZS</p>
Potek učne ure	
<p>I.</p> <p>Učitelj napove temo učne ure in se z učenci pogovori o glavnih onesnaževalcih vode in podtalnice. Predstavi jim malo vodno lečo. Skupaj pogledajo njeno zunanjo zgradbo in razmere, v katerih rastlina uspeva.</p> <p>Učence razdeli v skupine s po 3-4 učenci in jim razdeli učne liste in potrebščine za poskus. Opozori jih na upoštevanje navodil in varnost pri izvajanju poskusa.</p> <p>II.</p> <p>Učenci naredijo prvi del poskusa po navodilih, ki jih imajo na učnem listu. Učitelj nadzoruje učence in jih usmerja pri delu. Rezultate poskusa si bodo ogledali pri naslednji učni uri (po tednu dni), ko bodo tudi odgovorili na vprašanja iz prvega sklopa. Učenci pospravijo delovno površino in stopijo k digestoriju, kjer učitelj izvede demonstracijski eksperiment, v katerem malo vodno lečo izpostavi pojavu kislega dežja. Učenci opazujejo eksperiment in rešujejo naloge iz delovnega lista. O rezultatih se pogovorijo z učiteljem.</p>	

III.

Učenci ponovijo nove pojme in spoznanja, ki so si jih naučili. Učitelj jih spodbudi k razmišljanju o aktualni okoljski tematiki.

9 VIRI

Azeez N. M., Sabbar A. A. 2012. Efficiency of duckweed (*Lemna minor* L.) in phytotreatment of wastewater pollutants from Basrah oil refinery. *Journal of Applied Hytotechnology in Environmental Sanitation*, 1, 4: 163-172.

Bañuelos G., Vickerman D. B., Trumble J. T., Shannon M.C., Davis C. D., Finley J. W., Mayland H.F. 2002. Biotransfer possibilities of selenium from plants used in phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 4, 4: 315-329.

Brenčič J., Lazarini F. 1995. *Splošna in anorganska kemija*. Ljubljana, DZS: 220.

Canton S. P., Van Derveer W. D. 1997. Selenium toxicity to aquatic life: An argument for sediment-based water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 6: 1255-1259.

Chambers P. A., Lacoul P., Murphy K. J., Thomaz S. M. 2008. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 9-26.

Chandra P., Kulshreshtha K. 2004. Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Botanical Review*, 70: 313-327.

Carvalho K. M., Martin D. F. 2001. Removal of aqueous selenium by four aquatic plants. *Journal of Aquatic Plant Management*, 39: 33-36.

Dumont E., Vanhaecke F., Cornelis R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1304-1323.

Egerston C. J., Kopaska J. A., Downing J. A. 2004. A century of change in macrophyte abundance and composition in response to agricultural eutrophication. *Hydrobiologia*, 524: 145-156.

Ellis D. R., Salt D. E. 2003. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279.

Fan T. W. M., Teh S. J., Hinton D. E., Higashi R. M. 2002. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, 57: 65-84.

Fournier E., Adam-Guillermin C., Potin-Gautier M., Pannier F. 2010. Selenate bioaccumulation and toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*: influence of ambient sulphate ion concentration. *Aquatic Toxicology*, 97: 51–57.

Gaberščik A. 1997. Makrofiti in kvaliteta voda. *Acta Biologica Slovenica*, 41/2-3: 141-148.

Gaberščik, A., Mazej, Z. 1995. Photosynthetic performance and photoinhibition in two species of *Potamogeton* from lake Bohinj (Slovenia). *Acta Botanica Gallica*, 6: 667-672.

Gaberščik A., Germ M., Škof A., Drmaž D., Trošt T. 2002. UV-B radiation screen and respiratory potential in two aquatic primary producers: *Scenedesmus quadricauda* and *Ceratophyllum demersum*. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 27: 422-425

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

Germ M, Gaberščik, A. 2003. Dihalni potencial – kazalnik stresa pri rastlinah. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* 81-2, 335-339.

Hamilton S. J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326: 1-31.

Hyun S., Burns P.E., Murarka I., Lee L.S. 2006 Selenium(IV) and (VI) sorption by soils surrounding fly ash management facilities. *Vadose Zone Journal* 5: 1110-1118.

ISO, 2001. Water quality – Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. V: International Organization for Standardization, International Standard ISO, 20079

Krajnčič, B. 1974. Prispevek k poznavanju lemnacej severovzhodne Slovenije. *Biološki vestnik*, 22: 21-28.

Kuznetsov V. V., Kholodova V. P., Kuznetsov V. V., Yagodin B. A. 2003. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Doklady Biological Sciences*, 390: 266-268.

Lacoul P., Freedman B., 2006. Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems. *Environmental Reviews*, 14: 89-136.

Läuchli A. 1993. Selenium in plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta*, 106: 455-468.

LeDuc D. L., Abdelsamie M., Montes-Bayon M., Wu C.P., Reisingerand S.J., Terry N. 2006. Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution*, 144: 70-76.

Lemly A. D. 2004. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59: 44-56.

Lemly A. D., Finger S. E., Nelson M. K. 1993. Sources and impacts of irrigation drainwater contaminants in arid wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 2265-2279.

Lemly A. D., Smith G. J. 1987. Aquatic cycling of selenium: Implications for fish and wildlife. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington D. C, 12: 1-10.

Lemly A. D. 2002. Selenium Assesment in Aquatic Ecosystems - A guide for Hazard Evaluation and Water Quality Criteria. New York, Springer-Verlag: 161.

Lemly A. D. 1999. Selenium impacts on fish: an insidious time bomb. Human and Ecological Risk Assessment, 5, 6: 1139-1151.

Lemly A. D. 1999. Selenium Transport and Bioaccumulation in Aquatic Ecosystems: A Proposal for Water Quality Criteria Based on Hydrological Units. Ecotoxicology and Environmental Safety, 42: 150-156.

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

Lichtenthaler H. K., Buschmann C. (2001b). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterisation by UV-VIS. In Current Protocols in Food Analytical Chemistry, p. F4.3.1 – F4.3.8. John Wiley & Sons Inc, New York.

Lichtenthaler H.K. 1993. The plant prenyllipids, including carotenoids, chlorophylls, and preylquinones. Lipid metabolism in plants (T.S. Moore, ed.). CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 427-470.

Lin Z. Q., De Souza M., Pickering I. J., Terry N. 2002. Evaluation of the macroalga, muskagrass, for the phytoremediation of selenium-contaminated agricultural drainage water by microcosms. Wetlands and aquatic processes. Journal of Environmental Quality, 31: 2104–2110.

Lohner T. W., Reash R. J., Willet V. E., Rose L. A. 2001. Assessment of tolerant sunfish populations (*Lepomis* sp.) inhabiting selenium-laden coal ash effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 203-216.

Martinčič A., Wraber T., Jogan J., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije, ključ za določanje praprotnic in semenk. 3. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije.

Martinčič A., Wraber T., Jogan J., Podobnik A., Ravnik V., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije, ključ za določanje praprotnic in semenk. 4. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije.

Mazej Z., Gaberščik A. 1999. ETS-activity as a measure of vitality of different macrophyte species. *Phyton*, 39, 3: 181-185.

Mazej Z. 2000. Vpliv povečanega UV-B sevanja na klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) in alpski dristavec (*Potamogeton alpinus*). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, 135 str.

McNeal J. M., Balistriieri L. S. 1989. Geochemistry and occurrence of selenium - an overview. In: Jacobs L.W. (ed.) *Selenium in Agriculture and the Environment*. Soil Science Society of America Special Publication, 23: 1-13.

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

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

Mechora Š., Germ M. 2010. Selenium induced lower respiratory potential in *Glycine max* (L.) Merr.. *Acta Agriculturae Slovenica.*, 95: 29-34.

Ožbolt L., Kreft S., Kreft I., Germ M., Stibilj V. 2008. Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chem.* 3-110: 691-696.

Packard T. T. 1971. The measurement of respiratory electron-transport activity in marine phytoplankton. *Journal of Marine Research*, 29, 3: 235-243.

Pilon-Smits E. A. H., De Souza M. P., Hong G., Amini A., Bravo R. C., Payabyab S.T., Terry N. 1999. Selenium volatilization and accumulation by twenty aquatic plant species. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1011-1018.

Porcella D. B., Bowie G. L., Sanders J. G., Cuter G. A. 1991. Assessing Se Cycling and toxicity in aquatic ecosystems. *Water, Air and Soil Pollution*, 57-58, 1: 3-11.

Riedel G. F., Ferrier D. P., Sanders J. G. 1991. Uptake of selenium by freshwater phytoplankton. *Water Air and Soil Pollution*, 57-58: 23-30.

Schrieber U., Bilger W., Neubauer C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: *Ecophysiology of photosynthesis*. Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds.), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York: 49-61.

Smith S., Kwan M. K. H. 1989. Use of aquatic macrophytes as a bioassay method to assess relative toxicity, uptake kinetics and accumulated forms of trace metals. *Hydrobiologia*, 188/189: 345-351

Swift M. C. 2002. Stream ecosystem response to, and recovery from, experimental exposure to selenium. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 9: 159-184.

Šraj-Kržič, N., Gaberščik, A. 2005. Photochemical efficiency of amphibious plants in an intermittent lake. *Aquatic Botany*, 83: 281-288.

Šut M. 2012. Vpliv selenata na izbrane biokemijske in fiziološke lastnosti pri mali vodni leči. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana, 45 str.

Tausz M, Bytnerowicz A., Weidner W., Arbaugh M. J., Padgett P., Grill D. 1999. Pigments and photoprotection in needles of *Pinus ponderosa* trees with and without symptoms of ozone injury. *Phyton*, 39: 219-224.

Terry N., Carlson C., Raab T. K., Zayed A. M. 1992. Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environmental Quality*, 21: 341-344.

Trošt Sedej T. 2005. Ekologija rastlin: priročnik za vaje. Zbirka scripta. Ljubljana, Študentka založba: 46.

Uden P. C., Boakye H. T., Kahakaohchi C., Tyson J. F. 2004. Selective detection and identification of Se containing compounds - review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1050: 85-93.

US Environmental Protection Agency, 1987. Ambient Water Quality Criteria for Selenium – 1987. EPA-440-5-87-006. Office of Water, Washington, DC.

US EPA, 1998. Report on the Peer Consultation Workshop on Selenium Aquatic Toxicity and Bioaccumulation. EPA-822-R-98-007. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC.

Zhang Y., Moore J. N. 1996. Chapter 14: Accumulation in a wetland channel, Benton Lake, Montana. *Environmental Chemistry of selenium* (ed. W. T. Frankenberger, Jr & R. A. Engberg). CRC Press, New York.

Okoren, T. Vpliv selena na fiziološke in biokemijske lastnosti male vodne leče.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Program Kemija in Biologija, 2013

Zimmo O. 2003. Nitrogen Transformations and Removal Mechanisms in Algal and Duckweed Waste Stabilisation Ponds. Doctoral Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 7 pp.

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

Žnidarčič D. 2011. Selen in njegove zvrsti v okolju. *Acta agriculturae Slovenica*, 97, 1: 73-83.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Mateji Germ, za strokovne nasvete, usmerjanje in razumevanje. Zahvaljujem se ji tudi za dostopnost in prijazen odnos.

Hvala, prof. dr. Alenki Gaberščik in prof. dr. Ivanu Kreftu za popravke in hiter pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se dr. Špeli Mechora za vso pomoč pri praktičnem in teoretičnem delu, za številne nasvete, spodbudo in potrpežljivost pri nastajanju mojega diplomskega dela.

Hvala tudi ostalim članom Skupine za ekologijo rastlin in članom Skupine za fiziologijo rastlin za tehnično pomoč in nasvete.

Posebno zahvalo namenjam moji družini.

Mami, hvala, ker si vedno verjela vame, me spodbujala in mi stala ob strani.

Tim, hvala za razumevanje in podporo.

Punčka moja, hvala ker si!

PRILOGE

PRILOGA A- Učni list za učence-Rast rastlin v onesnaženih vodah

RAST RASTLIN V ONESNAŽENIH VODAH

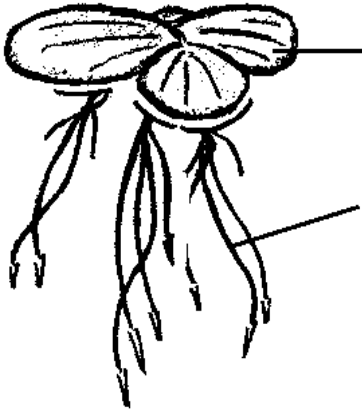
Učni list za učence

Ime in priimek: _____

Datum: _____

I. Preučevana rastlina: Mala vodna leča

Oglej si malo vodno lečo in zapiši opažanja.

1. Označi dele rastline.	2. Opiši izgled rastlin.
	Barva stebelnih členov: Barva koreninic: Dolžina stebelnih členov: Dolžina koreninic:

II. Poskus: Pripravite tri 200 mL čaše. V prvo nalijte 100 mL vodovodne vode, v drugo 100 mL vode iz potoka in v tretjo vodo iz potoka, ki ji dodate nekaj kapljic detergenta za pomivanje posode. V vsako čašo s pomočjo pincete prenesite 15 kolonij male vodne leče z enakim številom stebelnih členov. Čaše pokrite s prozorno živilsko folijo.

Čaše postavite v suh in svetel prostor. Po enem tednu pogledajte rezultate.

Potrebščine:

200 ml čaša (3) pinceta prozorna folija	vodovodna voda voda iz potoka	detergent za pomivanje posode
---	----------------------------------	----------------------------------

1. Nariši shemo poskusa. Pod vsako čašo zapiši število kolonij in stebelnih členov.

2. Kaj pričakuješ, da se bo zgodilo z malo vodno lečo?

3. Zapiši opažanja po končanem poskusu!

	Vodovodna voda	Voda iz potoka	Onesnažena voda iz potoka
Barva stebelnih členov			
Barva koreninic			
Dolžina stebelnih členov			
Dolžina koreninic			

4. Kaj lahko sklepaš iz dobljenih rezultatov?

5. Kateri so glavni onesnaževalci voda?

6. Razmisli, na kakšen način bi lahko preprečili/zmanjšali vpliv onesnažil na organizme!

III. Demonstracijski eksperiment: KISEL DEŽ IN RASTLINE

Oglej si demonstracijski eksperiment, ki ga bo izvedel učitelj v digestoriju in odgovori na spodnja vprašanja.

Potrebščine:

žveplov trak moder lakmusov papir	kozarec za vlaganje prostornine 5 L	mala vodna leča
--------------------------------------	--	-----------------

Poskus: V 5 L kozarec za vlaganje nalijemo približno 0,5 L vode in vanjo prenesemo nekaj kolonij male vodne leče. Na tanko železno žico, pritrjeno na pokrov kozarca, obesimo 4 cm dolg žveplov trak. Trak prižgemo in kozarec tesno zapremo.

Ko žveplo neha goreti, vodo v zaprtem kozarcu dobro premešamo in po nekaj minutah vanjo pomočimo moder lakmusov papir.

1. Nariši skico poskusa.
2. Kako se je obarval moder lakmusov papir?
3. Kakšne spremembe si opazil na rastlini? Razmisli, kako lahko te spremembe vplivajo na življenje rastlin.

4. Pri gorenju žvepla nastane žveplov dioksid. Katere njegove lastnosti si ugotovil pri poskusu?

5. Razmisli od kod žveplo prehaja v ozračje?