

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO**

Eva Brvar

**PRIMERJAVA HIPERAKUMULACIJE Cd IN Zn PRI DVEH  
VRSTAH RODU *Thlaspi* IN POMEN ZA  
FITOEKSTRAKCIJO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF Cd AND Zn HYPERACCUMULATION  
IN TWO *Thlaspi* SPECIES AND THEIR POTENTIAL FOR  
PHYTOEXTRACTION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomska naloga je zaključek Univerzitetnega študija Biologije. Opravljena je bila na Katedri za rastlinsko fiziologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer bil izveden poskus, meritve vsebnosti kovin v rastlinskih tkivih in dostopne frakcije kovin v rastnem substratu.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Barbara Vilhar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Alenka Gaberščik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Marjana Regvar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 26.9.2007

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.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva Brvar

## **KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Dn

DK 581.18: 546.4: 582.683 (043.2) = 863

KG hiperakumulacija Zn / hiperakumulacija Cd / *Thlaspi praecox* / *Thlaspi caerulescens* / fitoekstrakcija Cd / Žerjav

AV BRVAR, Eva

SA REGVAR, Marjana (mentor)

KZ SLO, 1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2007

IN PRIMERJAVA HIPERAKUMULACIJE Cd IN Zn PRI DVEH VRSTAH RODU *Thlaspi* IN POMEN ZA FITOEKSTRAKCIJO

TD Diplomaska naloga (univerzitetni študij)

OP VIII, 37s., 6 tab., 6 sl., 10 pril., 33 vir.

IJ sl

JI sl / en

AI V rastnih komorah smo vzgojili rastline vrst *Thlaspi praecox* (ekotip Žerjav) in *T. caerulescens* (ekotip Ganges). Proučili smo rast rastlin na rastnem substratu z različnimi koncentracijami Cd in Zn in akumulacijo Cd in Zn. Koncentracije Cd in Zn v rastlinskih tkivih smo po razklopu z mešanico HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub> izmerili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Določili smo pH talnih vzorcev in dostopne frakcije Cd in Zn talnih vzorcev z ekstrakcijo z amonijevim acetatom in vodo. Biomasa rastlin se je povečala s povečevanjem koncentracije Cd v rastnem substratu. Povečevanje koncentracije Zn v rastnem substratu ni vplivalo na biomaso rastlin. Uspeli smo potrditi hiperakumulacijo Cd obeh vrst (tkivna koncentracija je presegla 100 µg/g Cd SM). Tkivna koncentracija Zn ni presegla mejne hiperakumulacijske vrednosti (hiperakumulacija je določena s tkivno koncentracijo 10.000 µg/g Zn SM). Vrsti se nista razlikovali v sposobnosti hiperakumulacije Cd, *Thlaspi caerulescens* pa se je izkazal kot močnejši akumulator Zn. Povečevanje koncentracije Cd v rastnem substratu je vplivalo na privzem Zn v rastline, povečevanje koncentracije Zn v rastnem substratu pa ni vplivalo na privzem Cd. *Thlaspi praecox* se je s produkcijo visoke biomase in z akumulacijo pomembne količine kovin iz rastnega substrata z Žerjava izkazal kot zelo primerna vrsta za fitoekstrakcijo Cd na področju Žerjava in s tem potrdil svoj visoki potencial v fitoremediaciji.

### **KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

DC 581.18: 546.4: 582.683 (043.2) = 863

CX Zn hyperaccumulation / Cd hyperaccumulation / *Thlaspi praecox* / *Thlaspi caerulescens* / Cd phytoextraction / Žerjav

AU BRVAR, Eva

AA REGVAR, Marjana (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department for biology

PY 2007

TI COMPARISON OF Cd AND Zn HYPERACCUMULATION IN TWO *Thlaspi* SPECIES AND THEIR POTENTIAL FOR PHYTOEXTRACTION

DT Graduation thesis (University studies)

NO VIII, 37p., 6 tab., 6 pic., 10 app., 33 lit.

LA sl

AL sl / en

AB *Thlaspi praecox* (ecotype Žerjav) and *T. caerulescens* (ecotype Ganges) seedlings were grown in a controlled environment. Growth of the plants on substrates with various Cd and Zn concentrations was studied, together with Cd and Zn accumulation.. The plant material was wet digested with a mixture of HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub>. Concentrations of Zn and Cd in plant material were measured by atomic absorption spectroscopy (AAS). Exchangeable concentrations in the substrates were estimated using extraction with ammonium acetate. Substrate pH was measured. Plant biomass did not vary with Zn concentrations in the substrate, but it did increase when concentrations of Cd in substrate increased. Cd hyperaccumulation was confirmed for both plant species (plant concentration of 100 µg/g Cd DW was exceeded). Plant Zn concentrations did not reach hyperaccumulation concentrations (set at 10.000 µg/g Zn DW). Both *Thlaspi* species did not vary in Cd hyperaccumulation capacity, however *Thlaspi caerulescens* proved to have a higher Zn accumulation capacity than *T. praecox*. Increased Zn concentrations in substrate did not have any impact on plant Cd uptake, on the other hand increased Cd concentrations in substrate influenced plant Zn uptake. *Thlaspi praecox* biomass yield was high and together with the accumulation of significant metal quantities from substrate from Žerjav this plants proved to be a promising tool to be used in phytoremediation.

## KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV.....</b>	<b>- 2 -</b>
2.1	Hiperakumulacija .....	- 2 -
2.1.1	Akumulacija.....	- 4 -
2.1.2	Toleranca.....	- 5 -
2.2	<i>Thlaspi praecox</i> in <i>Thlaspi caerulescens</i> kot hiperakumulacijski vrsti .....	- 6 -
2.3	Vplivi Zn in Cd na žive organizme .....	- 7 -
2.3.1	Kadmij (Cd).....	- 7 -
2.3.2	Cink (Zn).....	- 8 -
2.3.3	Povezanost akumulacije Cd in Zn.....	- 9 -
2.4	Fitoremediacija in fitoekstrakcija .....	- 10 -
<b>3</b>	<b>NAMEN RAZISKAV .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>4</b>	<b>OSNOVNE HIPOTEZE.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>- 14 -</b>
5.1	Vzgoja rastlin .....	- 14 -
5.2	Vzorčenje rastlin .....	- 16 -
5.3	Analize dostopnih frakcij Zn in Cd v rastnem substratu .....	- 16 -
5.4	Razklop rastlinskih vzorcev .....	- 17 -
5.5	Vsebnost kovin v rastlinskih vzorcih in vzorcih rastnega substrata .....	- 17 -
5.6	Statistične analize.....	- 18 -
<b>6</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>- 19 -</b>
6.1	Rast vrst <i>Thlaspi praecox</i> in <i>T. caerulescens</i> .....	- 19 -
6.2	Primerjava sočasne akumulacije Cd in Zn vrst <i>Thlaspi praecox</i> in <i>T. caerulescens</i> .....	- 20 -
6.3	Vpliv privzema ene kovine na prizem druge kovine .....	- 23 -
6.4	Fitoekstrakcija Zn in Cd iz rastnega substrata z Žerjava .....	- 24 -
<b>7</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>- 25 -</b>
7.1	Variabilnost podatkov .....	- 25 -
7.2	Rast rastlin.....	- 26 -
7.3	Hiperakumulacijske sposobnosti vrst <i>Thlaspi praecox</i> in <i>Thlaspi caerulescens</i> .....	- 27 -
7.4	Sočasna akumulacija Zn in Cd .....	- 28 -
7.5	Vpliv privzema ene kovine na prizem druge kovine .....	- 29 -
7.6	Fitoekstrakcija na Žerjavu .....	- 30 -
<b>8</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>- 31 -</b>
<b>9</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>- 32 -</b>

**10 LITERATURA..... - 34 -**

<b>PRILOGA I: BIOMASA RASTLIN.....</b>	<b>I</b>
<b>PRILOGA II: KONCENTRACIJE KOVIN V POGANJKIH RASTLIN.....</b>	<b>III</b>
<b>PRILOGA III: TRANSLOKACIJSKI FAKTOR (TF).....</b>	<b>V</b>
<b>PRILOGA IV: BIOAKUMULACIJSKI FAKTOR (BAF).....</b>	<b>VI</b>
<b>PRILOGA V: STATISTIČNE ODVISNOSTI.....</b>	<b>VII</b>
<b>PRILOGA VI: DOSTOPNE FRAKCIJE KOVIN V RASTNEM SUBSTRATU.....</b>	<b>VIII</b>
<b>PRILOGA VII: STATISTIČNE ODVISNOSTI PRIVZEMA KOVIN V RASTLINE.....</b>	<b>IX</b>
<b>PRILOGA VIII: HRANILNA TEKOČINA ZA ROD <i>Thlaspi</i>.....</b>	<b>X</b>
<b>PRILOGA IX: FITOEKSTRAKCIJA NA ŽERJAVU.....</b>	<b>X</b>
<b>PRILOGA X: pH RASTNEGA SUBSTRATA.....</b>	<b>XII</b>

## KAZALO TABEL

<b>TABELA 1:</b> Povprečne koncentracije kovin ( $\mu\text{g/g SM}$ ) v poganjkih neakumulacijskih in hiperakumulacijskih rastlin. ....	- 3 -
<b>TABELA 2:</b> Osnovne skupine hipotez o razlogih za akumulacijo kovin. ....	- 4 -
<b>TABELA 3:</b> Rastni substrat, tretiran s kovinami. ....	- 14 -
<b>TABELA 4:</b> Translokacijski faktor (TF), najmanjše in največje vrednosti. ....	- 21 -
<b>TABELA 5:</b> Koncentracije kovin v rastnem substratu pred in po poskusu. ....	- 24 -
<b>TABELA 6:</b> Primerjava odstranjene količine kovin iz dostopnih frakcij rastnega substrata in količine kovin v rastlinskih tkivih. ....	- 24 -

## KAZALO SLIK

<b>SLIKA 1:</b> Biomasa poganjkov (g) v rastnem substratu z dodanim Cd po treh mesecih rasti. ....	- 19 -
<b>SLIKA 2:</b> Odvisnost koncentracije Cd v poganjkih rastlin od dostopnih frakcij Cd v rastnem substratu. .	- 20 -
<b>SLIKA 3:</b> Odvisnost koncentracije Zn v poganjkih rastlin od dostopnih frakcij Zn v rastnem substratu..	- 20 -
<b>SLIKA 4:</b> Odvisnost bioakumulacijskega faktorja Cd od dostopnih frakcij Cd v rastnem substratu. ....	- 22 -
<b>SLIKA 5:</b> Odvisnost bioakumulacijskega faktorja Zn od dostopnih frakcij Zn v rastnem substratu. ....	- 22 -
<b>SLIKA 6:</b> Primerjava privzema Zn rastlin na rastnem substratu brez Cd s privzemom Zn rastlin na rastnem substratu, ki je imel dodan Cd. ....	- 23 -

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>AAS</b>	atomska absorpcijska spektroskopija
<b>Ag</b>	srebro
<b>Al</b>	aluminij
<b>AM</b>	arbuskularna mikoriza
<b>BAF</b>	bioakumulacijski faktor
<b>Cd</b>	kadmij
<b>Co</b>	kobalt
<b>Cu</b>	baker
<b>DW</b>	dry weight
<b>EDTA</b>	etilen-diamin-tetraocetna-kislina
<b>Fe</b>	železo
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	vodikov peroksid
<b>Hg</b>	živo srebro
<b>HClO<sub>4</sub></b>	perklorna kislina
<b>HNO<sub>3</sub></b>	dušikova (V) kislina
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	amonijev acetat
<b>Se</b>	selenij
<b>SM</b>	suha masa
<b>TF</b>	translokacijski faktor
<b>TK</b>	težka kovina
<b>v/v</b>	volumensko razmerje
<b>Zn</b>	cink



## 1 UVOD

Zaradi agresivnosti fizikalno – kemijskih metod čiščenja onesnaženega okolja, se zaradi svoje neinvazivnosti vedno bolj uveljavlja *fitoremediacija*. S svojo odpornostjo na strupene substance in nenavadno sposobnostjo akumuliranja teh snovi v tkivih so se v fitoremediaciji kot najbolj primerne izkazale *hiperakumulacijske rastline*.

S pričujočo diplomsko nalogo smo želeli podrobneje preučiti akumulacijske sposobnosti dveh vrst; *Thlaspi caerulescens* (ekotip *Ganges*) kot najbolj raziskane hiperakumulacijske rastline (Assunção in sod., 2003) in *Thlaspi praecox* (ekotip *Žerjav*), ki se pojavlja tudi na slovenskih tleh. S svojo sposobnostjo hiperakumulacije kar treh kovin (Zn, Cd in Pb) (Vogel-Mikuš in sod., 2004) je vrsta *T. praecox* potencialno zelo zanimiva za fitoremediacijo.

V rastnem substratu z dodanimi koncentracijami Cd in Zn in v rastnem substratu z *Žerjava* smo vzgojili rastline obeh vrst. Primerjali smo rast rastlin in sposobnosti sočasne akumulacije Cd in Zn.

Okolje Doline smrti pri *Žerjavu* je zaradi delovanja talilnice in predelovalnice svinca MPI d.o.o. močno obremenjeno s Zn, Cd in Pb. Vrsta *Thlaspi praecox* je na tem področju avtohtona. Določili smo hiperakumulacijsko sposobnost vrste *Thlaspi praecox* na tem specifičnem substratu in ocenili njeno primernost za fitoekstrakcijo.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 Hiperakumulacija**

Elementi, kot so kadmij (Cd), živo srebro (Hg), svinec (Pb), aluminij (Al), srebro (Ag) in drugi, so vedno bolj razširjeni onesnaževalci okolja, predvsem v predelih, na katere človek močno vpliva. Njihova prisotnost v atmosferi, zemlji in vodi lahko celo v komaj zaznavnih koncentracijah vpliva na vse organizme. Nevarna je predvsem bioakumulacija in biomagnifikacija preko prehranjevalne verige ( Sanità di Toppi in Gabbrielli, 1999).

Kovine v dovolj visokih koncentracijah na žive organizme delujejo kot strupene. Iz biomolekul odstranjujejo ione drugih kovin, modificirajo obliko aktivnih biomolekul (npr. encimov), blokirajo njihove funkcionalne skupine ipd. Ti efekti se izražajo zaradi privlaka kovinskih ionov do kisika, dušika in žvepla (Brooks, 1998).

Rastline preko korenin večinoma sprejemajo le makronutriente (kot so fosforjevi, natrijevi in kalijeve ioni) in mikronutriente (kot so klorovi, kobaltovi in bakrovi ioni). Nekatere rastline sprejemajo tudi elemente, ki niso nujno potrebni za rast in razvoj (takšni elementi so kadmijeve, svinčeve ioni in ioni živega srebra).

V ravnem substratu z visoko koncentracijo kovin večina rastlin v korenine privzame kovine v velikih količinah, v nadzemne dele pa transportira le majhen delež. Hiperakumulacijske rastline imajo izredno sposobnost akumulacije kovin. Aktivno jih privzemajo v svoja tkiva in jih kopičijo tudi pri nizkih zunanjih koncentracijah. V nadzemne dele akumulirajo kovine do te mere, da je tu njihova koncentracija enaka ali pa celo večja od koncentracije v koreninah (Baker, 1981). Koncentracija kovin v tkivih hiperakumulacijskih rastlin je do dva- ali tri-krat večja od koncentracij kovin v neakumulacijskih rastlinah. (Zha in sod., 2004) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Povprečne koncentracije kovin ( $\mu\text{g/g}$  SM) v poganjkih nehiperakumulacijskih in hiperakumulacijskih rastlin z deleži ter koncentracije kovin, ki se v okolje sproščajo z naravno mineralizacijo težkih kovin. (Prirejeno po Brooks, 1998) (\* Adrian0, 2001).

Kovina	Koncentracija kovin v nehiperakumulacijskih rastlinah [ $\mu\text{g/g}$ ]	Koncentracija kovin v hiperakumulacijah rastlinah [ $\mu\text{g/g}$ ]	%	Koncentracija kovin ob naravni mineralizaciji [ $\mu\text{g/g}$ ]
Cd	0,1	> 100	0,01	2
Se in Pb	0,1 in 1	> 1.000	0,1	1 in 15*
Ni, Co in Cu	3,1 in 10	> 5.000	0,5	20,3 in 20
Zn in Mn	70 in 400	> 10.000	1	100 in 1000

Danes je znanih več kot 400 vrst hiperakumulacijskih rastlin. Razlikujejo se v sposobnosti kopičenja kovin in vrsti kovin, ki jih kopičijo. Najpogosteje kopičijo le eno, nekatere so sposobne kopičiti dve ali celo tri kovine hkrati. Hiperakumulacijske rastline so običajno endemične za določen tip geološke podlage. Njihova prisotnost v okolju nakazuje specifično mineralizacijo tal (Brooks, 1998).

Predstavnike hiperakumulacijskih rastlin najdemo v različnih družinah rastlin. V družini križnic (*Brassicaceae*) so pogosti predvsem v rodovih *Thlaspi* in *Alyssum*. Rod *Thlaspi* vsebuje vrste, ki hiperakumulirajo Zn, Ni, Cd in Pb (Lombi in sod., 2000).

Nekatere rastline so do kovin tolerantne, vendar pa jih ne kopičijo v svojih tkivih. Prav tako nekatere rastline kovine kopičijo, vendar pa niso tolerantne na njihov učinek (in tako običajno zaradi zastrupitve z njimi ne morejo uspešno zaključiti življenjskega cikla) (Macnair in sod., 1999). Hiperakumulacijske vrste združujejo akumulacijo in toleranco, dve lastnosti, za kateri je dokazano, da sta regulirani z različnimi geni (genskimi sklopi) in sta tako vsaj delno neodvisni druga od druge (Macnair in sod., 1999).

### 2.1.1 Akumulacija

Več teorij razlaga, zakaj akumulacijske rastline v svojih tkivih kopičijo tako strupene substance. Boyd in Martens (1992) sta razloge združila v šest kategorij (Tabela 2).

**Tabela 2:** Osnovne skupine hipotez o razlogih za akumulacijo kovin (razvrstitev po Boyd & Martensen, 1992).

Hipoteza	Razlaga
Hipoteza nenamernega privzema	Tla, bogata s kovinami, povzročijo pospešeno privzemanje ionov iz tal. Neselektivno se skupaj z drugimi ioni privzemajo tudi ioni kovin.
Hipoteza tolerance	Privzete kovine se kopičijo v neaktivnih tkivih. Rastline lahko preživijo na območjih, ki so preveč strupena za uspevanje nehiperakumulacijskih vrst – kompeticijska prednost akumulatorjev.
Hipoteza odlaganja	Privzete kovine se kopičijo v delih, ki jih rastline lahko odvržejo.
Hipoteza odpornosti na sušo	Kopičenje Ni rastlini omogoča lažje preživetje sušnih obdobj.
Hipoteza interference	S propadom tkiv akumulacijske rastline se nakopičene kovine vrnejo v tla, ki postajajo vedno bolj neugodna za neakumulacijske vrste - povečanje kompeticijskih prednosti akumulacijskih vrst.
Hipoteza obrambe	Nakopičene kovine rastline branijo pred patogeni, herbivori...

Posamezne hipoteze se med seboj ne izključujejo. Možno je, da ena kovina opravlja eno nalogo (npr. nikelj povečuje odpornost na sušo), druga pa drugačno (npr. obrambno funkcijo) (Brooks, 1998).

Ena glavnih prednosti hiperakumulacije je zagotovo kompeticijska prednost, ki jo pridobijo hiperakumulacijske rastline. Z obvladovanjem dodatnega energijskega stroška, ki ga uspešno akumuliranje strupenih substanc zahteva, so si hiperakumulacijske rastline zagotovile uspevanje v ekološki niši, v kateri je medvrstna tekmovalnost minimalna. Okolje v katerem uspevajo, je namreč skoraj popolnoma neprimerno za vrste, ki niso odporne na vplive strupenih substanc (Brooks, 1998).

### 2.1.2 Toleranca

Hiperakumulacijske rastline aktivno privzemajo kovine v svoja tkiva in jih tam kopičijo tudi pri nizkih zunanjih koncentracijah. Preživetje jim omogočajo različni razstrupljevalni mehanizmi, kot so tvorba substanc, ki se vežejo s kovinami, celična in subcelična kompartmentalizacija in/ali spremembe metabolizma. Homeostatski mehanizmi omogočajo ohranjanje ustreznih koncentracij kovin v citosolu in s tem omogočajo odpornost nanje - imenujemo jih *tolerančni mehanizmi*. Odvijajo se na celičnem nivoju (vezava na celično steno in koreninske izločke), na nivoju celične membrane (znižanje privzema in črpanje kovin iz simplasta) in/ali na molekularnem nivoju (helacija v citosolu s peptidi kot so fitohelatini, metalotioneini, prenos kovin v vakuolo). V proces zmanjševanja strupenosti kovin je vključenih več homeostatskih mehanizmov hkrati. Najverjetneje ne obstaja splošni regulacijski mehanizem za vse kovine. Lahko rečemo, da so tolerančni mehanizmi specifični za kovine in se v podrobnostih razlikujejo med rastlinskimi vrstami (Hall, 2002). Pri hiperakumulacijskih rastlinah gre pri mehanizmih tolerance predvsem za vezavo kovin na celično steno in/ali sekvestracijo v vakuolah (Vázquez in sod., 1992; Vázquez in sod., 1994).

## 2.2 *Thlaspi praecox* in *Thlaspi caerulescens* kot hiperakumulacijski vrsti

Hiperakumulacijske rastline so običajno endemične in omejene na majhna področja z visokimi vsebnostmi kovin v tleh. Nekatere se pojavljajo bolj pogosto. *Thlaspi caerulescens* je najbolj raziskana hiperakumulacijska vrsta Zn (Assunção in sod., 2003). Razširjen je po celi Evropi, raste pa tako na s kovinami bogatimi tlemi kot tistimi, ki vsebujejo manjše koncentracije kovin. Na vseh rastiščih vzdržuje relativno visoko koncentracijo Zn v listih, ne glede na koncentracijo Zn v substratu, kar kaže na to, da je sposobnost hiperakumulacije splošna lastnost vrste (Assunção in sod., 2003). Poleg Zn je *T. caerulescens* sposoben kopičiti tudi Cd in Ni (Brooks 1998). Najbolj obetaven je tudi za uporabo pri fitoekstrakciji Zn in Cd (Lombi in sod., 2000).

*Thlaspi praecox* je novo odkrita hiperakumulacijska vrsta (Vogel-Mikuš in sod., 2004). Uspeva na karbonatni podlagi v Sloveniji in drugje na Balkanu. Že leta 1995 je bilo dokazano, da je v svojih tkivih sposoben kopičiti Zn (Brooks, 1998). Vogel-Mikuš in sod. (2005) so ugotovili, da *Thlaspi praecox* iz okolice Žerjava lahko kopiči tri kovine, in sicer do 1,5% Zn SM, 0,6% Cd SM in 0,4% Pb SM. Torej je tudi *T. praecox* izjemna hiperakumulacijska rastlina.

## 2.3 Vplivi Zn in Cd na žive organizme

Tla v bližini rudnikov in drugih virov onesnaževanja so močno obremenjena s kovinami. Eno izmed takšnih območij je okolica Žerjava v Mežiški dolini, kjer je od 1896 do 1990 delovala talilnica in predelovalnica svinca. V tem obdobju so z namestitvijo sistemov za čiščenje izpušnih plinov in modernejših filtrov poskušali zmanjšati negativne vplive na okolje, vendar pa so zaradi dolgoletnih izpustov kovin v izpušnem prahu povzročili trajno kontaminacijo tal s Zn, Cu in Pb. Še danes te kovine predstavljajo problem tako za rastline in živali kot za domačine (Fugaš in sod., 1984).

### 2.3.1 Kadmij (Cd)

Kadmij je zelo razširjena kovina, ki jo v okolje sproščajo elektrarne, grelni sistemi, kovinska industrija, urbani promet in cementarne. V okolje se lahko sprošča tudi z mineralizacijo matične kamnine (Sanità di Toppi in Gabbrielli, 1999). Čeprav vloga Cd v rastlinah še ni dokončno pojasnjena, vemo, da ga rastline privzemajo in transportirajo, čeprav velja za eno najbolj strupenih kovin. S transportom v nadzemne dele postane nevaren tako herbivorom kot ljudem.

Neposredni strupeni učinki Cd v rastlini so posledica močne vezave na funkcionalne SH-skupine encimov, kar inhibira celo paleto pomembnih encimov v rastlinskem metabolizmu (klorofil sintetaze, encimi Calvinovega cikla, motnje elektronskega transporta preko sprememb števila in zgradbe tilakoidnih membran (Seregin in Ivanov, 2000), kar vodi v zmanjšano vsebnost klorofila in inhibicijo fotosinteze (Hagemeyer, 1999). Odgovor celičnega metabolizma na strupene učinke Cd je primarno nespecifičen in podoben odgovorom rastline na slanostni stres (Seregin in Ivanov, 2000). Prvo prizorišče negativnega delovanja Cd je celična membrana, saj kovina vpliva na njeno permeabilnost in s tem na ionsko ravnovesje celice (Seregin in Ivanov, 2000). Spremeni se tudi lipidna zgradba membrane, kar je posledica nastajanja aktivnih kisikovih oblik, ki izzovejo lipidno peroksidacijo (Seregin in Ivanov, 2000).

Med posredne vplive Cd v rastlinskih tkivih štejemo inducirani vodni stres, pomanjkanje Fe, Mg in Ca, zapiranje listnih rež in s tem pomanjkanje CO<sub>2</sub> (Seregin in Ivanov, 2000). Inhibicija rasti je rezultat vpliva Cd tako na celične delitve (zaradi vpliva na upočasnjen metabolizem, direktne vezave na DNA in loma mikrotubulskega sistema) kot elongacijo (zmanjšana plastičnost celične stene). Cd naj bi povzročal tudi predčasno senescenco.

Mejna vrednost koncentracij Cd v tleh za Slovenijo je postavljena na 1 µg/g, opozorilna vrednost na 2 µg/g, kritična pa na 12 µg/g (Ur.l.RS, 68/96).

### 2.3.2 Cink (Zn)

Cink (Zn) spada med esencialne rastlinske mikroelemente. Prisotnost Zn v naravi je običajno posledica geoloških procesov. V manjši meri se pojavlja v metamorfnih in magmatskih kamninah, povečini pa kot sestavni del kamninskih mineralov, ki so bogati s Fe (magnetiti, pirokseni, amfiboli, biotit, spinel, garnet in staurolit). Približno 60% topnega Zn se v tleh pojavlja vezanega na organske komplekse zgrajene iz amino, organskih in fulvičnih kislin (Hagemeyer, 1999). Vir Zn so tudi raznolike človeške dejavnosti, predvsem rudarstvo, mikroelektronika, tekstilna in pirometalurgična industrija, odpadne vode, pesticidi ipd. (Adriano, 2001).

Zn je kovinski del rastlinskih encimov, ki sodelujejo pri sintezi DNA, RNA in pri sintezi proteinov ali kot kofaktor številnih encimov (Brooks, 2000). Pomembno vlogo igra v dušikovem metabolizmu rastlin (Hagemeyer, 1999). Pomanjkanje cinka (povprečna kritična količina je 20 µg/g Zn SM) vodi v zmanjšano sintezo proteinov (Adriano, 2001). Vidni simptomi pomanjkanja te kovine so medžilne kloroze in krajši internodiji (Hagemeyer, 1999). Simptomi prekomernih koncentracij Zn v citosolu (>100 µg/g Zn SM) so izguba turgorja, nekroze na starejših listih in zmanjšana rast (Hagemeyer, 1999). Seveda teh simptomov na hiperakumulacijskih rastlinah zaradi visoko zmogljivih tolerančnih mehanizmov ne opazimo do precej višjih tkivnih koncentracij Zn.

Hiperakumulacijske rastline, ki hiperakumulirajo Zn, v svojem substratu potrebujejo višjo koncentracijo te kovine kot nehiperakumulacijske rastline (Shen et al., 1997). Koncentracija Zn v poganjkih prvih je skoraj 20-krat višja kot pri ostalih rastlinah. Minimalna koncentracija Zn, potrebna za nemoteno rast *T. caerulescens*, je okoli 1.000 µg/g Zn (Zhao, Shen, McGrath, neobjavljeni podatki). Nenavadno visoko potrebo po Zn razlagamo s tem, da detoksifikacijski mehanizmi, ki omogočajo izjemno hipertoleranco, delujejo tudi, če je koncentracija Zn v rastnem substratu razmeroma nizka (Brooks, 1998).

Mejna vrednost koncentracij Zn v tleh za Slovenijo je postavljena na 200 µg/g, opozorilna vrednost na 300 µg/g, kritična pa na 720 µg/g (Ur.l.RS, 68/96).



### 2.3.3 Povezanost akumulacije Cd in Zn

Dokazano je, da je koncentracija Cd v rastlinah odvisna od koncentracij Zn, Fe in Cu v tleh. To kaže na to, da so mehanizmi privzema teh kovin povezani med seboj. Zha in sod.(2004) so pokazali, da so komponente transporta kovinskih ionov vrste *T. caerulescens* sposobne transportirati več različnih kovinskih ionov hkrati. Velikokrat je bilo privzeto, da se tako Cd kot druge kovine brez jasne biološke vloge preko transporterjev prenašajo zaradi nizke specifičnosti transporterjev (Lombi in sod., 2000). Vendar pa dokumentirana razlika v privzemu Cd med različnimi populacijami *T. caerulescens* kaže, da privzem Cd poteka preko visoko specifičnega transporterja (Lombi in sod., 2001).

## 2.4 Fitoremediacija in fitoekstrakcija

Kovine so okolju nevarne predvsem zaradi težavnega odstranjevanja. Do nedavnega je bilo moč onesnaženo zemljo čistiti le kemično in fizikalno. Tehnike delimo na:

- *ex situ*, ki zahtevajo odstranitev onesnažene zemlje in so povezane z zelo visokimi stroški in težavami pri prevažanju zemlje in
- *in situ*, ki potekajo na onesnaženem kraju samem z imobilizacijo polutantov, dvigovanjem pH in razredčevanjem onesnaženega substrata z nekontaminirano zemljo (Khan 2000).

Zaradi visokih stroškov in/ali okolju neprijetnih posledic takšnih metod čiščenja v zadnjih letih raste zanimanje za uporabo živih organizmov za remediacijo onesnaženega okolja – bioremediacijo (Robinson in sod., 1998).

Po Bollag in Bollag (1995) je bioremediacija definirana kot proces, v katerem z uporabo mikroorganizmov ali rastlin iz onesnaženega ali degradiranega okolja odstranjujemo ali razgrajujemo okolju tuje substance. Za postopek remediacije okolja s pomočjo rastlin uporabljamo izraz *fitoremediacija*. Rastline preko korenin v svoja tkiva akumulirajo okolju tuje snovi. S pobiranjem biomase teh rastlin na neinvaziven način odstranimo polutante iz okolja.

Hiperakumulacijske lastnosti nekaterih rastlin so bile opažene že lep čas nazaj, vendar se jim dolgo časa ni posvečalo veliko pozornosti. Zaradi svoje potencialne uporabnosti pri remediaciji onesnaženega okolja postajajo danes vedno bolj zanimive (McGrath, 1998). Zaradi visoke tolerance do strupenih kovin in sposobnosti njihovega akumuliranja do relativno visokih koncentracij v svojih tkivih, so se izkazale kot zelo primerne za fitoremediacijo.

Termin *fitoekstrakcija* označuje proces, v katerem lahko rastline iz rastnega substrata odstranijo pomembne količine okolju tujih substanc. Uspešnost fitoekstrakcije je odvisna od:

- rastlinske sposobnosti akumuliranja tarčnega elementa do čim višjih koncentracij, najbolje da predvsem v nadzemnih delih (lažje pobiranje biomase, nabiranje rastlinskih korenin je težavno) in
- produkcije relativno visoke biomase (McGrath, 1998).

Sposobnost akumuliranja tarčnega elementa se meri z bioakumulacijskim (BAF), sposobnost transporta pa s translokacijskim faktorjem (TF) (Robinson in sod., 1998).

$$\text{bioakumulacijski faktor (BAF)} = \frac{\text{koncentracija težkih kovin v suhi masi}}{\text{razpoložljiva koncentracija kovin v rastnem substratu}}$$

$$\text{translokacijski faktor (TF)} = \frac{\text{koncentracija specifične snovi v poganjkih rastline}}{\text{koncentracija iste snovi v koreninah rastline}}$$

Največja prednost fitoremediacije z uporabo hiperakumulacijskih rastlin je nizka cena njene izvedbe, ima pa svoje omejitve:

- hiperakumulacijske rastline običajno akumulirajo le en specifičen element,
- ne poznamo hiperakumulacijskih rastlin za vse elemente, ki onesnažujejo okolje,
- mnoge hiperakumulacijske rastline rastejo zelo počasi in imajo relativno majhno biomaso,
- malo vemo o agronomskih lastnosti teh rastlin (potrebe po gnojilih, dovzetnost za bolezni in napade insektov ipd.) (Brooks, 1998).

Z razvojem raziskav in tehnologije lahko pričakujemo:

- vnos agronomskega znanja za izboljšanje produktivnosti hiperakumulacijskih rastlin, ki jih že poznamo,
- uporabo dodatkov, ki bodo povečali topnost kovin v substratu in povečali translokacijo kovin iz korenin v poganjke,
- uporabo rastnih hormonov, ki bodo spremenili korenine in poganjke hiperakumulacijskih vrst za optimalen privzem kovin,
- pridobivanje boljših hiperakumulacijskih rastlin s konvencionalnimi metodami ali s tkivnimi kulturami,
- uporabo rastlinskih simbiotov (bakterij, gliv) za stimulacijo akumulacije in
- uporabo transgenskih rastlin s spremenjenim privzemom in transportom elementov (Brooks, 1998).

Pomemben proces bo postalo tudi kontroliranje vpliva hiperakumulacije na okolje. Preprečevati bo potrebno mobilizacijo težkih kovin v globlje profile prsti, akumulacijo nevarnih koncentracij kovin v herbivorih ter disperzijo semen in cvetnega prahu (Brooks, 1998).

### **3 NAMEN RAZISKAV**

Glavne naloge so bile:

1. v kontroliranem okolju vzgojiti hiperakumulacijski rastlinski vrsti *Thlaspi praecox* (ekotip *Žerjav*) in *T. caerulescens* (ekotip *Ganges*) in primerjati njuno rast v rastnem substratu z različnimi koncentracijami Cd in Zn,
2. primerjati akumulacijske sposobnost Cd in Zn obeh vrst v rastnem substratu z različnimi koncentracijami teh dveh kovin,
3. oceniti primernost vrste *Thlaspi praecox* za fitoekstrakcijo Cd na področju Žerjava.

#### 4 OSNOVNE HIPOTEZE

Potek poskusa smo zasnovali na naslednjih hipotezah:

1. Odpornost obeh vrst na obe kovini bo visoka. Pričakujemo, da biomasa rastlin s povečevanjem koncentracije kovin v rastnem substratu ne bo padala.
2. Koncentracija Cd in Zn v rastlinskih tkivih se bo povečevala s povečevanjem koncentracije Cd in Zn v rastnem substratu.
3. Vrednosti translokacijskega faktorja (TF) za Cd in Zn bodo presegale vrednost 1.
4. Vrednosti bioakumulacijskega faktorja (BAF) za Cd in Zn bodo padale s povečevanjem koncentracije katere koli izmed teh dveh kovin v rastnem substratu.
5. Pričakujemo, da bo privzem ene kovine vplival na privzem druge kovine.
6. Vrsta *Thlaspi praecox* se bo izkazala kot primerna za fitoekstrakcijo Cd na področju Žerjava.

## 5 MATERIAL IN METODE

### 5.1 Vzgoja rastlin

Metoda vzgoje rastlin je povzeta po Lombi in sod. (2000).

Semena vrst *Thlaspi praecox* in *T. caerulescens* smo 10 minut sterilizirali v 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck). Semena smo dobro sprali s sterilno vodo in jih posejali v avtoklavirano mešanico vermikulita in perlita 1/1 (v/v). Takšna mešanica je omogočala zadostno prezračevanje korenin med rastjo. Semena smo kalili 30 dni. Po potrebi smo jih zalivali z destilirano vodo. Sadike smo nato presadili v rastni substrat.

Osnovni rastni substrat je bila komercialna zemlja, ki smo ji dodali Zn in/ali Cd v sulfatni obliki. Z dodajanjem kovin smo pripravili rastni substrat, ki je vseboval različne koncentracije Zn in Cd (Tabela 3).

**Tabela 3:** Rastni substrat, tretiran s kovinami

Dodana kovina	Koncentracija dodanih kovin [µg/g]
Cd	5 Cd 100 Zn
	50 Cd 100 Zn
	250 Cd 100 Zn
Zn	50 Zn
	250 Zn
	500 Zn
Zn in Cd	50Cd 50Zn
	50Cd 250Zn
	250Cd 50Zn
	250Cd 250Zn

Zaradi specifične potrebe hiperakumulacijskih rastlin po visokih koncentracijah Zn smo rastnemu substratu z dodanim Cd dodali tudi 100 µg/g Zn (Küpper in sod., 1999). S tem smo preprečili morebitno zaviranje rasti in razvoja zaradi pomanjkanja te esencialne kovine.

Poleg rastnega substrata z različnimi koncentracijami Zn in Cd smo v poskus vključili tudi rastni substrat, ki smo ga povzročili na območju Žerjava. (vzorčno mesto 2, ki je 250 metrov oddaljeno od točkastih virov onesnaženja – tovarniških dimnikov) (Vogel-Mikuš in

sod., 2005). Na tem ravnem substratu smo preizkusili fitoremediacijski potencial vrste *Thlaspi praecox*.

Z ravnim substratom s posamezno koncentracijo kovin smo napolnili 8 lončkov v velikosti 15x15 cm (porabili smo 500 g ravnega substrata za vsak lonček). V 4 lončke smo posadili sadike vrste *Thlaspi praecox*, v 4 pa sadike vrste *T. caerulescens*. Enako smo storili z ravnim substratom z Žerjava.

Ravni substrat vsakega lončka smo povzročili in ga 5 dni sušili pri 60°C. Posušene vzorce smo uporabili za meritev dostopnih frakcij Cd in Zn vsakega lončka.

Rastline smo 3 mesece gojili v ravnih komorah (16-urna fotoperioda, jakost svetlobe 160  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 19°C, 50% relativna zračna vlažnost). Lončki so bili po ravnih komori razporejeni naključno. Med ravnjo smo lončke z rastlinami večkrat prerazporedili, da bi vsem rastlinam zagotovili kar najbolj podobne pogoje za ravnjo.

Rastline smo trikrat na teden zalivali z destilirano vodo (vsakemu lončku smo dodali približno 100 ml tekočine). Po enem mesecu ravnjo se je ravnjo rastlin začela upočasnjevati, posamezne rastline so začele kazati tudi kloroze. Rastline smo enkrat tedensko namesto z destilirano vodo začeli zalivati s hranilno raztopino za rod *Thlaspi* (hranilna raztopina je bila pripravljena po Tolrà in sod., 1996) (Priloga VIII).

## 5.2 Vzorčenje rastlin

Po treh mesecih rasti v rastnih komorah smo poskus zaključili. Rastline smo vzeli iz lončkov, jih temeljito sprali najprej z vodovodno, nato pa še z bidestilirano vodo. Po kratkotrajnem sušenju na papirju smo poganjke ločili od korenin in jih ločeno stehali. Rastlinski material smo zavili v aluminijasto folijo in ga potopili v tekoči dušik. Do sušenja smo ga hranili v zamrzovalni skrinji. Zamrznjen rastlinski material smo posušili z liofiliziranjem (sušenje je potekalo 5 dni). Posušene vzorce smo stehali, nato pa v terilnici uprašili s pomočjo tekočega dušika. Prah smo shranili v zaprtih plastičnih posodicah v eksikatorju z dodanim izsušenim silika gelom.

## 5.3 Analize dostopnih frakcij Cd in Zn v rastnem substratu

Posušene vzorce rastnega substrata vsakega lončka smo presejali skozi sito s porami velikosti 2x2 mm in v čiste čaše zatehtali po 1 g vzorca zemlje. Dodali smo 20 ml 1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (pH=7), ter jih pokrili s plastično vrečko (Baker in sod., 1994). Vzorce smo na stresalniku stresali 2 uri (180 rpm). Po stresanju smo pustili, da se je material v vzorcih posedel. Supernatant smo prefiltrirali skozi 0,45  $\mu\text{m}$  sterilne filtre v epruvete. Le-te smo zatesnili s pokrovčki in jih do meritev shranili v hladilniku.

pH smo določili v vodnih ekstraktih tal. Prst in bidestilirano vodo smo zmešali v razmerju 1:2 (v/v) in vzorce stresali 2 uri na (180 rpm). pH smo izmerili s pH metrom (Gavlak in sod., 2003).



#### 5.4 Razklop rastlinskih vzorcev

Za elementarno analizo tkiv vzgojenih rastlin smo rastlinski material popolnoma razgradili s kislinsko mešanico  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  (Merck) = 7 /1 (v/v) (Vogel-Mikuš in sod., 2005). Steklovino, ki smo jo uporabili, smo pred uporabo preko noči namočili v 0,2%  $\text{HNO}_3$  (odstranjevanje morebitnih organskih ostankov). Sprali smo jo z bidestilirano vodo in posušili v sušilniku. V kolikor steklovine nismo pripravili tik pred uporabo, smo jo po sušenju do uporabe zavili v aluminijasto folijo in s tem preprečili morebitno kontaminacijo z organskim materialom.

V 16 cm dolge steklene epruvete smo zatehtali po 30 mg rastlinskega materiala, ki smo ga želeli razklopiti. Dodali smo po 3 ml  $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$  (Merck) = 7 /1 (v/v) v vsako epruveto. Epruvete smo prekrili z aluminijasto folijo (kislini namreč močno hlapita) in mešanico pustili stati preko noči v laminariju, da bi se rastlinski material čim bolj prepojil s kislinsko mešanico (predrazklop). Naslednji dan smo epruvete zložili v termoblok in jih postopoma segrevali. Med segrevanjem smo bili pozorni na to, da je razklop potekal na primerni temperaturi (ob previsoki temperaturi bi se vzorci lahko zažgali, ob premočnem vrenju pa lahko z vrenjem kisline iz epruвет izgubljamozatehtani rastlinski material). Razklop je bil zaključen, ko je mešanica kislin popolnoma izparela in v epruветah ni bilo več vidnega rastlinskega materiala (razklop je potekal približno 8 ur). Po končanem razklopu smo epruvete (razklopljene vzorce) pokrili z aluminijasto folijo in jih shranili do časa meritve.

#### 5.5 Vsebnost kovin v rastlinskih vzorcih in vzorcih rastnega substrata

Koncentracije Cd in Zn v rastlinskih vzorcih in vzorcih rastnega substrata smo izmerili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Pred meritvami smo v epruvete dodali po 5 ml 0,2%  $\text{HNO}_3$ . Pokrili smo jih s plastičnimi pokrovčki (preprečevanje kontaminacije z organskim materialom) in jih v hladilniku shranili preko noči. Vsaj 2 uri pred meritvami smo epruvete vzeli iz hladilnika (segrevanje na sobno temperaturo) in jih primerno razredčili. Z redčenjem smo zagotovili meritve elementarnih koncentracij v optimalnem meritvenem razponu naprave.

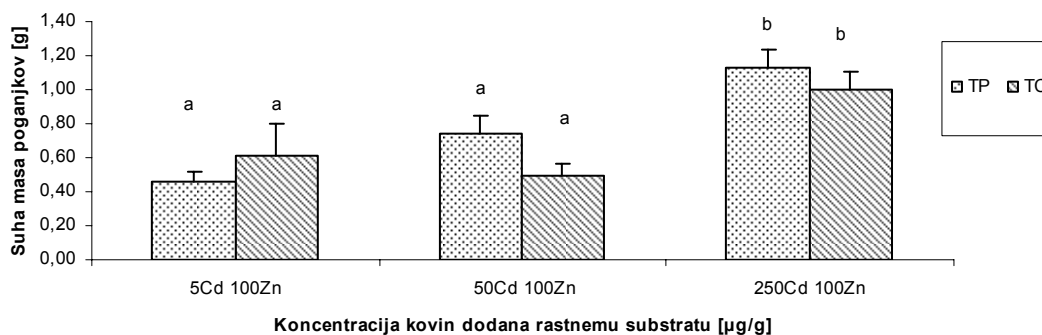
## 5.6 Statistične analize

Statistične analize smo naredili s pomočjo programa Statistica Statsoft (verzija 6.0) in MS Excel (MS Office 2003). Regresijske krivulje smo analizirali s pomočjo programa Sigma Plot 8.02.

## 6 REZULTATI

### 6.1 Rast vrst *Thlaspi praecox* in *T. caerulescens* v rastnem substratu z različnimi koncentracijami Cd in Zn

Biomasa rastlin v rastnem substratu z dodanim Cd se je povečevala s povečevanjem koncentracije Cd v rastnem substratu. ( $p \leq 0,001$ ; Priloga V). Med vrstama nismo opazili razlik v biomasi (Slika 1).



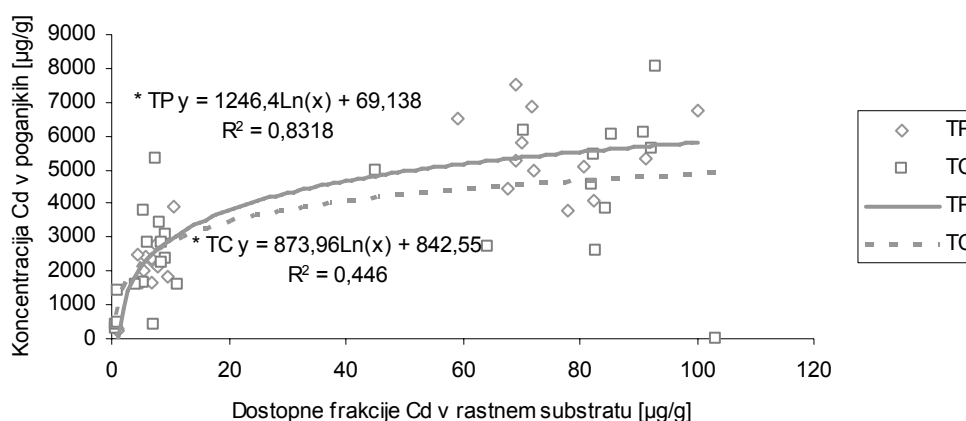
**Slika 1:** Biomasa poganjkov (g) v rastnem substratu z dodanim Cd po treh mesecih rasti. Biomasa = povprečna suha masa ene rozete v lončku. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost ( $n=3-4$ )  $\pm$  standardna napaka. TP – *Thlaspi praecox*, TC – *Thlaspi caerulescens*. Statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v rastnem substratu in vrstami so označene z različnimi črkami. Analiza variance ANOVA (dvosmerna,  $p < 0,05$ ). Razlike smo testirali s posthoc Tukey-evim testom.

V rastnem substratu z dodanim Zn se biomasa rastlin ni spreminjala z naraščanjem koncentracij Zn v substratu, neodvisna je bila tudi od vrste (Priloga V). Kljub desetkratnemu povečanju koncentracije Zn v rastnem substratu nismo opazili spremembe biomase rastlin. Tudi biomasa rastlin v rastnem substratu z obema kovinama ni bila odvisna niti od vrste niti od koncentracije kovin v rastnem substratu.

Biomasa rastlin lahko služi za oceno rastlinske tolerance na strupene substance. Glede na majhen vpliv povečevanja koncentracij Zn v rastnem substratu na rast obeh vrst sklepamo, da sta obe vrsti visoko tolerantni na povišane koncentracije Zn v rastnem substratu.

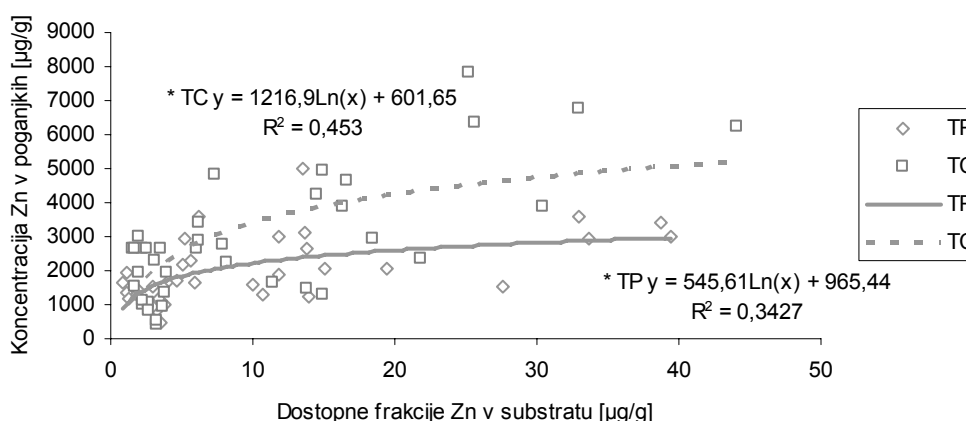
## 6.2 Primerjava sočasne akumulacije Cd in Zn vrst *Thlaspi praecox* in *T. caerulescens*

Razlika v privzemu Cd med vrstama ni bila statistično različna. Na koncentracijo Cd v poganjkih je vplivala le koncentracija kovine v ravnem substratu ( $p \leq 0,001$ ; Priloga V) (Slika 2).



**Slika 2:** Odvisnost koncentracije Cd v poganjkih rastlin od dostopnih frakcij Cd v ravnem substratu. TP - *Thlaspi praecox*, TC - *Thlaspi caerulescens*. \*- odvisnost parametrov je statistično značilna, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna

Koncentracija Zn v poganjkih rastlin je bila odvisna od koncentracije Zn v ravnem substratu ( $p \leq 0,001$ ; Priloga V), razlikovala se je tudi med vrstama ( $p \leq 0,001$ ; Priloga V) (Slika 3).



**Slika 3:** Odvisnost koncentracije Zn v poganjkih rastlin od dostopnih frakcij Zn v ravnem substratu. TP - *Thlaspi praecox*, TC - *Thlaspi caerulescens*. \*- odvisnost parametrov je statistično značilna, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna

Koncentracija obeh kovin v poganjkih rastlin se je povečevala s povečevanjem koncentracije kovin v rastnem substratu. Kapaciteta akumulacije Cd je bila za obe vrsti zelo podobna, velike razlike med vrstama pa smo opazili v privzemu Zn. *Thlaspi caerulescens* ima večjo kapaciteto akumuliranja Zn kot *T. praecox* (*T. caerulescens* je v svoja tkiva vedno akumuliral več Zn kot *T. praecox*).

Translokacijski faktor (TF) Cd je bil neodvisen od vrste in koncentracije kovine v rastnih substratih (Priloga V). TF Zn se med vrstama ni razlikoval (razen v rastnem substratu z obema kovinama), odvisen je bil od koncentracije kovin v rastnem substratu ( $p \leq 0,01$ ; Priloga V). Regresijske krivulje te odvisnosti niso statistično značilne.

Tabela 4: Translokacijski faktor (TF), najmanjše in največje vrednosti

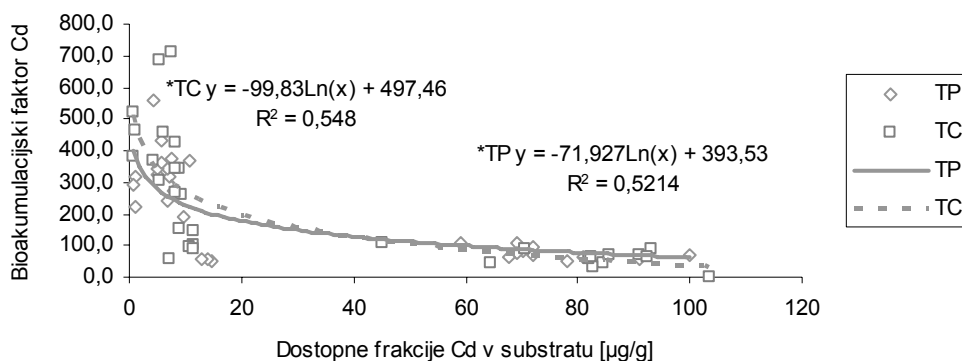
	Translokacijski faktor Zn				Translokacijski faktor Cd			
	<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
	Najmanjši	Največji	Najmanjši	Največji	Najmanjši	Največji	Najmanjši	Največji
5Cd 100Zn	3,7	5,7	4,0	6,0	1,0	1,7	0,9	8,2
50Cd 100Zn	3,0	4,5	3,9	6,5	1,6	3,1	0,5	2,2
250Cd 100Zn	3,1	7,6	3,9	6,2	1,4	2,5	1,1	1,6
50Zn	1,3	4,5	0,6	1,9	mno	mno	mno	mno
250Zn	2,5	5,6	3,0	5,2	mno	mno	mno	mno
500Zn	1,3	2,8	2,6	3,2	mno	mno	mno	mno
50Cd 50Zn	0,9	1,0	2,6	5,9	2,1	4,7	1,2	1,9
50Cd 250Zn	2,7	3,3	3,5	5,6	1,5	2,8	1,5	5,4
250Cd 50Zn	1,8	2,2	0,8	2,6	1,3	3,3	1,3	1,9
250Cd 250Zn	2,7	3,5	1,3	4,6	1,5	2,1	1,1	1,4

mno – meritve niso bile opravljene

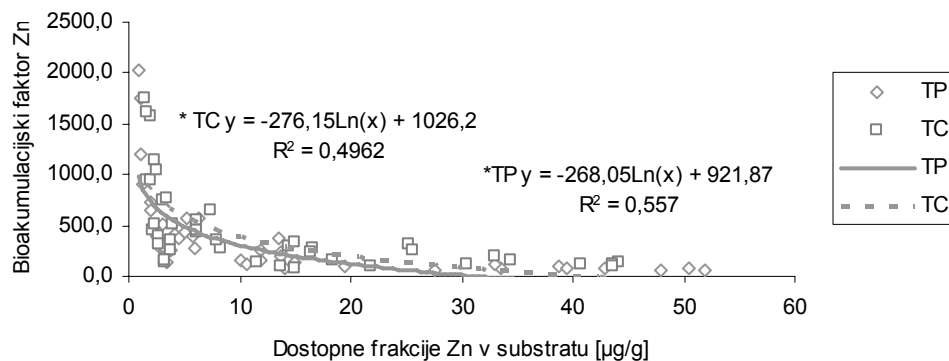
Vrednosti TF (Tabela 4) za Cd in Zn presegajo mejno vrednost hiperakumulacije ( $TF > 1$ ). Vrednosti TF padejo pod 1 le pri zelo nizki koncentraciji kovin v rastnem substratu. Vse vrednosti TF so zbrane v Prilogi III.

Bioakumulacijski faktor (BAF) obeh kovin je vrstno neodvisen, na vrednosti so vplivale le koncentracije kovin v rastnem substratu ( $p \leq 0,01$ ; Priloga V). BAF Zn je bil vrstno odvisen le v rastnem substratu z obema dodanima kovinama ( $p < 0,01$ , Priloga V).

Vrednosti BAF Cd in Zn padajo z naraščanjem koncentracije katerekoli kovine v rastnem substratu (Slika 4 in Slika 5).



**Slika 4:** Odvisnost bioakumulacijskega faktorja Cd od dostopnih frakcij Cd v rastnem substratu. TP - *Thlaspi praecox*, TC - *Thlaspi caerulescens*. \*- odvisnost parametrov je statistično značilna, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna



**Slika 5:** Odvisnost bioakumulacijskega faktorja Zn od dostopnih frakcij Zn v rastnem substratu. TP - *Thlaspi praecox*, TC - *Thlaspi caerulescens*. \*- odvisnost parametrov je statistično značilna, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna

Vse vrednosti BAF so zbrane v Prilogi IV.

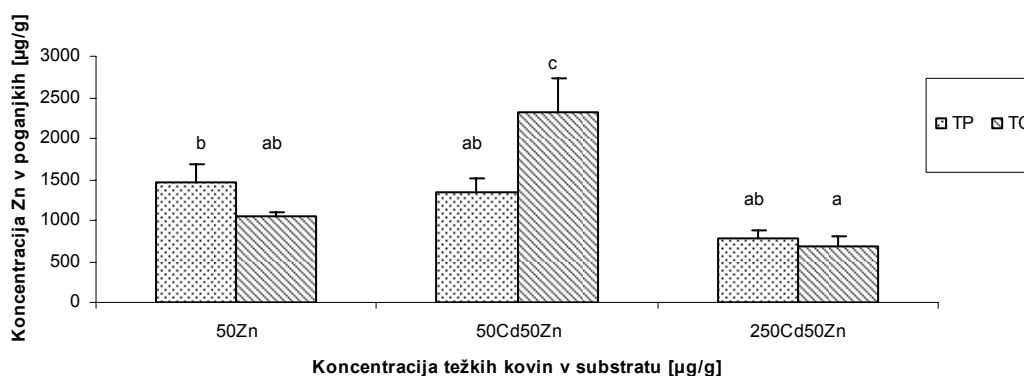
Meritve pH rastnega substrata so zbrane v Prilogi X.

### 6.3 Vpliv privzema ene kovine na prizem druge kovine

Povečevanje koncentracije Cd v rastnem substratu je vplivalo na privzem Zn. Privzem Zn se je razlikoval med vrstama ( $p \geq 0,01$ , Priloga VII), odvisen je bil tudi od koncentracije Cd v rastnem substratu ( $p \geq 0,01$ , Priloga VII). Grafični prikazi te odvisnosti niso statistično značilni.

Povečevanje koncentracije Zn v rastnem substratu ni vplivalo na koncentracijo Cd v rastlinskih poganjkih (Priloga VII).

Primerjali smo privzem Zn rastlin na rastnem substratu brez Cd s privzemom Zn rastlin na rastnem substratu, ki je imel dodan Cd. Opazili smo, da se je koncentracija Zn v *Thlaspi caerulescens* najprej povečala, nato pa spustila. Pri *Thlaspi praecox* spremembe Zn v tkivih nismo opazili (Slika 6).



**Slika 6:** Primerjava privzema Zn rastlin na rastnem substratu brez Cd s privzemom Zn rastlin na rastnem substratu, ki je imel dodan Cd. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost ( $n=3-4$ )  $\pm$  standardna napaka. TP – *Thlaspi praecox*, TC – *Thlaspi caerulescens*. Statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v rastnem substratu in vrstami so označene z različnimi črkami. Analiza variance ANOVA (dvosmerna,  $p < 0,05$ ). Razlike smo testirali s posthoc Tukey-evim testom.

#### 6.4 Fitoekstrakcija Cd in Zn iz rastnega substrata z Žerjava

Za analizo fitoekstrakcijskih sposobnosti *Thlaspi praecox* smo uporabili rastni substrat, ki smo ga povzorčili z območja Žerjava (vzorčno mesto 2; Vogel-Mikuš in sod., 2005). Vrsta se na tem območju pojavlja avtohtono.

Dostopne frakcije kovin v rastnem substratu (Tabela 5) smo izmerili pred presaditvijo sadik v rastni substrat in po zaključenem poskusu. V posameznem lončku je bilo 500g rastnega substrata.

Tabela 5: Koncentracije kovin v rastnem substratu pred in po poskusu

	Koncentracija dostopnega Zn v rastnem substratu [ $\mu\text{g/g}$ ]		Koncentracija dostopnega Cd v rastnem substratu [ $\mu\text{g/g}$ ]	
	Povprečje	Std.napaka	Povprečje	Std.napaka
Pred poskusom	48,32	1,98	13,18	0,81
Po poskusu	44,25	1,34	9,86	0,98
<b>Razlika</b>	<b>4,08</b>		<b>3,32</b>	

Statistični test je potrdil statistično značilno spremembo pred in po poskusu. Koncentracija Cd in Zn se je po poskusu v žerjavskem substratu statistično značilno znižala (t-test, pri  $p=0,002$  za Cd in  $p=0,0144$  za Zn).

Koncentracija Cd v rastnem substratu z Žerjava ( $13,18 \mu\text{g/g}$ ) presega mejno vrednost za Slovenijo (mejna vrednost je postavljena na  $1 \mu\text{g/g}$ , Ur.l.RS 68/96). Da bi koncentracijo Cd na področju Žerjava približali dovoljeni vrednosti, bi v hipotetičnem primeru (brez bistvenih sprememb in ob ohranitvi BAF) potrebovali 4 posevke *Thlaspi praecox*.

Vrsta ni primerna za fitoekstrakcijo Zn.

Količina kovin v rastlinskih tkivih je večja od količine kovin, ki je bila odstranjena iz dostopnih frakcij kovin rastnega substrata (Tabela 6).

Tabela 6: Primerjava odstranjene količine kovin iz dostopnih frakcij rastnega substrata in količine kovin v rastlinskih tkivih

	Zn [ $\mu\text{g}$ ]	Cd [ $\mu\text{g}$ ]
Odstranjena količina kovine iz dostopne frakcije kovin rastnega substrata	2040	1660
Količina kovine v rastlinskih tkivih	14357	3711



## 7 RAZPRAVA

### 7.1 Variabilnost podatkov

Podatki o koncentracijah Cd in Zn v poganjkih rastlin so zelo variabilni. Tako Robinson in sod. (1998) kot McGrath (1993) so ta pojav že dokumentirali. Variabilnost podatkov se pojavi kljub nadzorovanemu okolju. Del variabilnosti lahko pripišemo temu, da smo uporabili semena naravnih populacij. V naravnem okolju je sposobnost akumulacije težkih kovin lastnost, ki variira med posameznimi rastlinami iste vrste. Del variabilnosti je posledica tega, da smo poskus izvajali na pravem ravnem substratu.

Zemlja je že po naravi zelo heterogena, težko je torej pridobiti relativno homogen ravn substrat. Poleg same heterogenosti substrata na analize vsebnosti snovi vpliva še potencialna vezava snovi v organske in anorganske komplekse v zemlji. Staranje („ageing”) je proces, v katerem se biološka in kemijska dostopnost snovi v tleh niža. Delno sta zanjo odgovorni difuzija v mikro- in nano-pore delcev v zemlji in inkorporacija snovi v strukturo različnih organskih snovi v tleh (Robinson in sod., 1998).

Zaradi tega je večina raziskav akumulacije različnih snovi v rastline preko koreninskega sistema narejenih na podlagi hidroponskih kultur. Dodajanje snovi homogeni vodni raztopini je bistveno lažje kot heterogenemu substratu, prav tako pa je veliko lažje nadzirati ravnne razmere v vodnih raztopinah. Čeprav hidroponske raziskave ponujajo relativno natančne meritve, pa le slabo odražajo ravnne naravnih rastišč, kjer so ravnne vse prej kot homogene in kontrolirane, do izraza pride tudi puferska sposobnost tal (Robinson in sod., 1998).

## 7.2 Rast rastlin

Pomanjkanje Zn v rastnem substratu močno vpliva na rast vrste *Thlaspi caerulescens* (Ozturk in sod., 2003). Po dveh mesecih in pol rasti so rastline njihovega poskusa v rastnih substratih z zelo nizko koncentracijo Zn kazale močno izražene simptome pomanjkanja te kovine (manjši listi, kloroze, na robovih mlajših listov celo nekroze). Zaradi močno izražene helacije in sekvestracije v tkivih primanjkuje Zn, ki bi bil sicer dostopen metabolnim procesom. Rezultati kažejo na to, da ta dva procesa potekata tudi takrat, ko v rastnem substratu kovina ni prisotna v povečanih količinah. Zaradi teh podatkov smo se rastnemu substratu, ki naj bi imel dodan le Cd, odločili dodati tudi Zn, da bi se tako izognili kritičnemu pomanjkanju te kovine (rastnemu substratu smo dodali 100 µg/g Zn, tako kot Lombi in sod., 2000).

Druge raziskave so pokazale, da se biomasa vrste *Thlaspi caerulescens* poveča ob povečanju koncentracije Zn v rastnem substratu iz 0 µg/g na 75 µg/g (največja razlika nastopi pri prehodu iz koncentracije 5 µg/g na 25 µg/g Zn) (Ozturk in sod., 2003). Rastline v našem poskusu niso bile izpostavljene kritičnemu pomanjkanju Zn, najnižja koncentracija Zn v rastnem substratu je namreč bila 50 µg/g Zn. Tako povečevanja biomase rastlin s povečevanjem koncentracije Zn v rastnem substratu nismo opazili.

Nasprotno smo opazili povečevanje biomase rastlin s povečevanjem koncentracije Cd v rastnem substratu. Možni vzrok je lahko efekt redčenja kovine v rastlinskih tkivih, vprašljivo pa je, če redčenje kovine v tkivih upraviči velik energijski strošek povečanja biomase.

Strupenih učinkov visokih koncentracij kovin v poskusu nismo opazili. Najvišja tkivna koncentracija Zn je bila 7.826 µg/g, Cd pa 8.025 µg/g. Ozturk in sod. (2003) kot strupeni za vrsto *Thlaspi caerulescens* navajajo tkivni koncentraciji nad 30.000 µg/g Zn in 10.00 µg/g Cd. Najvišje koncentracije kovin, ki smo jih dodali rastnemu substratu v poskusu, so še vedno prenizke, da bi lahko resneje škodile rastlinam.

### 7.3 Hiperakumulacijske sposobnosti vrst *Thlaspi praecox* in *Thlaspi caerulescens*

Uspeli smo doseči hiperakumulacijski plato Cd obeh vrst. Akumulirana koncentracija Cd v poganjkih se je pri najvišji koncentraciji Cd v substratu prenehala povečevati. Sklepamo, da se mejna vrednost hiperakumulacije Cd obeh vrst giblje okoli tkivne koncentracije 5.000  $\mu\text{g/g}$  Cd. Ta vrednost je višja od tiste, ki so jo določili Robinson in sod. (1998). Kot platojsko koncentracijo so namreč navedli 2.000  $\mu\text{g/g}$  Cd v tkivih rastlin.

Dosegli smo tudi plato hiperakumulacije Zn *Thlaspi praecox*. Kljub povečevanju koncentracije Zn v ravnem substratu koncentracija Zn v rastlinah *T. praecox* preneha naraščati. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da se bioakumulacijski plato te vrste za Zn nahaja blizu tkivne koncentracije 3.000  $\mu\text{g/g}$ .

Nasprotno se z uporabljenimi koncentracijami Zn nismo približali platu hiperakumulacije Zn vrste *T. caerulescens*. Koncentracija tkivnega Zn tudi pri najvišji koncentraciji Zn v ravnem substratu še vedno narašča. Uporabili smo semena vrste *T. caerulescens*, ekotip *Ganges*. Ta ekotip je znan po toleranci na zelo visoko tkivno koncentracijo Zn, zato je bila visoka kapaciteta akumuliranja Zn pričakovana. Robinson in sod. (1998) kot mejno koncentracijo Zn v tkivih rastlin vrste *Thlaspi caerulescens* navajajo 10.000  $\mu\text{g/g}$ .

Upoštevati moramo tudi dejstvo, da meja hiperakumulacije Zn v poskusu sploh ni bila dosežena (hiperakumulacija Zn je določena s tkivno koncentracijo 10.000  $\mu\text{g/g}$  Zn SM). Najvišjo koncentracijo akumuliranega Zn smo izmerili pri vrsti *T. caerulescens*, ki je akumulirala 7.826  $\mu\text{g/g}$  (Priloga II). Težko torej govorimo o povezavi med toleranco in kapaciteto akumuliranja, saj prave hiperakumulacije Zn sploh nismo dosegli. Nasprotno smo uspeli potrditi pravo hiperakumulacijo Cd obeh vrst. Določena je s tkivno koncentracijo 100  $\mu\text{g/g}$  Cd SM - presega jo večina rastlinskih vzorcev.

#### 7.4 Sočasna akumulacija Zn in Cd

Koncentracija kovin v poganjkih rastlin se je povečevala s povečevanjem koncentracije kovin v rastnem substratu. Lombi in sod. (2000) ter Vogel – Mikuš in sod. (2005) so prav tako opazili povečevanje koncentracije Cd v rastlinskih tkivih s povečevanjem Cd v rastnem substratu. Lombi in sod. (2000) so poskus akumulacije Cd izvajali na različnih populacijah *T. caerulescens* in *T. goesingense*. Pri vseh obravnavanih populacijah se je koncentracija Cd v poganjkih povečevala z naraščanjem koncentracije Cd. Vogel–Mikuš in sod. (2005) so pokazali, da se tudi koncentracija Zn v poganjkih rastlin povečuje s povečevanjem koncentracije Zn v rastnem substratu.

Enako je zmanjševanje vrednosti bioakumulacijskega faktorja (BAF) s povečevanjem koncentracije kovin v rastnem substratu prikazano tudi v drugih raziskavah (Robinson in sod., 1998; Vogel-Mikuš in sod., 2005).

Vogel-Mikuš in sod. (2005) so opazili povečevanje TF za Zn s povečevanjem koncentracije Zn v rastnem substratu, TF za Cd pa ni bil odvisen od koncentracije Cd v rastnem substratu. Tudi v našem poskusu vrednosti TF Cd niso bile statistično značilno odvisne od koncentracij kovin v rastnem substratu, vrednosti TF Zn pa so bile odvisne tako od vrste kot od koncentracije Zn v rastnem substratu.

## 7.5 Vpliv privzema ene kovine na privzem druge kovine

Mehanizma privzemanja Cd in Zn sta ločena ali pa so ločene vsaj stopnje ekspresije med posameznimi populacijami. Zhao in sod. (1999) so izvedli poskus na štirih geografsko različnih populacijah *Thlaspi caerulescens*. Privzem in akumulacija Zn sta bila podobna pri vseh populacijah, opazili pa so velike razlike v akumuliranju Cd v poganjke rastlin. Rezultati našega poskusa potrjujejo obstoj ločenih mehanizmov za privzem Cd in Zn.

Opazili smo, da povečevanje koncentracije Zn v ravnem substratu ni vplivalo na privzem Cd v rastline. Nasprotno so vpliv visokih koncentracij Zn v ravnem substratu na privzem Cd opazili Lombi in sod. (2000), vendar šele pri koncentracijah, ki so presegale 2.000  $\mu\text{g/g}$  Zn. Zn ioni izpodrinejo poprej v zemlji vezane Cd ione in s tem povečajo koncentracijo Cd, ki je dostopna rastlinam.

Opazili smo vpliv povečane koncentracije Cd v ravnem substratu na privzem Zn. Pokazali smo že, da se je biomasa rastlin povečala s povečevanjem koncentracije Cd v ravnem substratu. Možno je, da povečana koncentracija Cd v ravnem substratu povzroči povečanje biomase, povečanje biomase pa povzroči večji privzem Zn (visoke potrebe hiperakumulacijskih rastlin po Zn v tkivih).

## 7.6 Fitoekstrakcija na Žerjavu

Uspešnost fitoekstrakcije je odvisna od produkcije relativno visoke biomase in akumuliranja tarčne snovi do zelo visokih koncentracij v tkivih rastline. Največjo biomaso celotnega poskusa je imel *Thlaspi praecox* na ravnem substratu Žerjav (Priloga I). Iz ravnega substrata je akumuliral veliko količino kovin. Zaključimo lahko, da je vrsta zelo primerna za fitoekstrakcijo Cd na tem področju.

Dokazali smo že, da se vrsti ne razlikujeta v sposobnosti privzema Cd, pa tudi vrednosti BAF in TF za Cd se med vrstama ne razlikujejo statistično značilno. Tako sklepamo, da je za fitoekstrakcijo Cd enako primeren tudi *T. caerulescens*. Primernost vrste *Thlaspi caerulescens* za fitoekstrakcijo Cd je bila dokazana tudi z drugimi raziskavami (Robinson in sod., 1998).

Na žalost nobena od vrst ni primerna za fitoekstrakcijo Zn. Ker je Zn v naravnem okolju veliko bolj razširjen kot Cd, mora biti prisoten v 200-krat višjih koncentracijah, da postane nevaren živim organizmom. Ob tako visokih koncentracijah kovine v ravnem substratu pa so vrednosti BAF prenizke za učinkovito odstranjevanje Zn v ekonomsko sprejemljivem času (< 10 let) (Robinson in sod., 1998). Glede na podatke, ki so jih Robinson in sod. (1998) predstavili kot dokaz za neprimernost *T. caerulescens* za fitoekstrakcijo Zn, sklepamo, da bi se z ekonomskega vidika bioremediacije za neprimerno izkazala tudi vrsta *T. praecox*.

Fitoremediacija okolja nikoli ne poteka linearno. Pri računanju števila posevkov rastlin, ki bi jih potrebovali, da bi okolje očistili do določene meje, moramo upoštevati dejstvo, da vsak posevek spremeni lastnosti tal, kar vpliva na pogoje fitoekstrakcije naslednjega posevka.

Težko tudi natančno spremljamo spreminjanje koncentracij kovin v tleh. V našem poskusu je količina kovin v rastlinskih tkivih večja od količine odstranjenih kovin iz dostopnih frakcij ravnega substrata. McGrath in sod. (1997) so pokazali, da več kot 90% kovin, ki jih je v poskusu akumuliral *Thlaspi caerulescens*, ni bilo zajetih v dostopnih frakcijah ravnih substratov, določenih z metodo NH<sub>4</sub>Ac. Rastlina lahko torej izkorišča tudi kovine v tleh, ki je specifična kemijska analiza ne zajame. Uporabljena metoda analize vsebnosti kovin v vzorcih ravnega substrata (Baker in sod., 1994) pa je ena najboljših za določanje biodostopnih koncentracij kovin.

## 8 SKLEPI

- V kontroliranem okolju smo uspeli vzgojiti rastline vrst *Thlaspi praecox* (ekotip Žerjav) in *T. caerulescens* (ekotip Ganges) na ravnem substratu, ki je vseboval različne koncentracije Cd in Zn.
- Biomasa rastlin obeh vrst se je povečala s povečevanjem koncentracije Cd v ravnem substratu, ni pa se spreminjala s povečevanjem koncentracije Zn v ravnem substratu. Zaradi tega sklepamo, da sta obe vrsti visoko odporni na povišane koncentracije Zn v ravnem substratu.
- Koncentracija kovin v rastlinskih tkivih se je povečevala s povečevanjem koncentracije kovin v ravnem substratu.
- Uspeli smo potrditi hiperakumulacijo Cd obeh vrst (tkivna koncentracija Cd je presegla 100 µg/g Cd SM). Koncentracije Zn niso presegle mejnih hiperakumulacijskih vrednosti (tkivna koncentracija 10.000 µg/g Zn SM).
- Dosegli smo plato hiperakumulacije Cd obeh vrst (tkivna koncentracija 5.000 µg/g Cd SM) in plato hiperakumulacije Zn vrste *Thlaspi praecox* (tkivna koncentracija 3.000 µg/g Zn SM). Nasprotno tudi pri najvišjih koncentracijah Zn v ravnem substratu nismo uspeli doseči hiperakumulacijskega platoja Zn vrste *Thlaspi caerulescens*.
- *Thlaspi caerulescens* ima večjo kapaciteto akumuliranja Zn in je tako boljši akumulator Zn kot *T. praecox*. Nasprotno se vrsti ne razlikujeta v sposobnosti hiperakumulacije Cd.
- Vrednosti translokacijskega faktorja (TF) Zn so bile odvisne od koncentracije Zn v ravnem substratu. Vrednosti TF Cd niso bile odvisne od koncentracije Cd v ravnem substratu. Vrednosti TF Cd in Zn se niso razlikovale med vrstama.
- Vrednosti bioakumulacijskega faktorja (BAF) obeh kovin so se zmanjševale s povečevanjem koncentracije kovin v ravnem substratu. BAF je bil vrstno neodvisen.
- Povečevanje koncentracije Cd v ravnem substratu je vplivalo na privzem Zn v rastline. Nasprotno povečevanje koncentracije Zn v ravnem substratu ni vplivalo na privzem Cd v rastline.
- *Thlaspi praecox* se je izkazal kot vrsta, ki je zelo primerna za fitoekstrakcijo Cd na področju Žerjava. S produkcijo velike biomase in akumulacijo pomembne količine kovine iz ravnega substrata z Žerjava potrjuje svoj visoki potencial v fitoremediaciji.

## 9 POVZETEK

V rastnih komorah smo vzgojili rastline vrst *Thlaspi praecox* (ekotip *Žerjav*) in *T. caerulescens* (ekotip *Ganges*). *Thlaspi caerulescens* je najbolj raziskana hiperakumulacijska vrsta Zn (Assunção in sod., 2003), *T. praecox* pa je novo odkrita hiperakumulacijska vrsta (Vogel-Mikuš in sod., 2005), ki na slovenskih tleh uspeva avtohtono. Proučili smo rast rastlin na rastnem substratu z različnimi koncentracijami Zn/Cd in akumulacijo Zn in Cd. Koncentracije Zn in Cd v rastlinskih tkivih smo po razklopu z mešanico HNO<sub>3</sub> in HClO<sub>4</sub> (Vogel-Mikuš in sod., 2005) izmerili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS). Določili smo pH talnih vzorcev in dostopne frakcije Zn in Cd talnih vzorcev z ekstrakcijo z amonijevim acetatom in vodo (Baker in sod., 1994).

Biomasa rastlin je narasla ob povečanju koncentracije Cd v rastnem substratu, medtem ko koncentracija Zn v rastnem substratu ni vplivala na rast rastlin. Koncentracija obeh kovin v rastlinskih tkivih se je povečevala s povečevanjem koncentracije kovin v rastnem substratu. Uspeli smo potrditi hiperakumulacijo Cd obeh vrst (tkivna koncentracija je presegla 100 µg/g Cd SM). Koncentracija Zn ni presegla mejnih vrednosti hiperakumulacije (določena je s tkivno koncentracijo 10.000 µg/g Zn SM). Vrsti se nista razlikovali v sposobnosti hiperakumulacije Cd, *Thlaspi caerulescens* pa se je izkazal kot močnejši akumulator Zn.

Običajno so vrednosti translokacijskega faktorja (TF) odvisne od koncentracije kovin v rastnem substratu (Vogel-Mikuš in sod., 2005). V našem poskusu so bile vrednosti TF Zn odvisne od koncentracije Zn v substratu, medtem ko koncentracija Cd v rastnem substratu ni vplivala na vrednosti TF Cd. Vrednosti TF se med vrstama niso razlikovale. Vrednosti bioakumulacijskega faktorja (BAF) Cd in Zn so bile prav tako vrstno neodvisne, zniževale so se ob povečevanju koncentracije kovin v rastnem substratu.

Povečevanje koncentracije Cd v rastnem substratu je vplivalo na privzem Zn v rastline. Povečevanje koncentracije Zn v rastnem substratu ni vplivalo na privzem Cd v rastline.

*Thlaspi praecox* se je s produkcijo relativno visoke biomase in z akumulacijo pomembne količine kovin iz rastnega substrata z *Žerjava* izkazal kot zelo primerna vrsta za fitoekstrakcijo Cd na področju *Žerjava* in potrdil svoj visoki potencial v fitoremediaciji.



## SUMMARY

*Thlaspi praecox* (ecotype *Žerjav*) and *T. caerulescens* (ecotype *Ganges*) seedlings were grown in a controlled environment. *Thlaspi caerulescens* is the best researched Zn hyperaccumulator species (Assunção e tal., 2003), while hyperaccumulator species *T. praecox* has been recently discovered (Vogel-Mikuš et al., 2005). *T. praecox* is indigenous to Slovenian area. Plant growth on substrates with various Zn and Cd concentrations was studied, together with concurrent Cd and Zn hyperaccumulation. The plant material was wet digested with a mixture of HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub>. Concentrations of Zn and Cd in plant material were measured by atomic absorption spectrometry (AAS). Exchangeable concentrations in the substrates were estimated using extraction with ammonium acetate. Substrate pH was measured.

Plant biomass increased with higher substrate Cd concentrations. Substrate Zn concentration did not influence plant growth. Cd hyperaccumulation was confirmed for both plant species (plant concentration of 100 µg/g Cd DW was exceeded). Plant Zn concentrations did not reach hyperaccumulating concentrations (set at 10.000 µg/g Zn DW). Both *Thlaspi* species did not vary in Cd hyperaccumulation capacity, however, *Thlaspi caerulescens* proved to have a higher Zn accumulation capacity than *T. praecox*.

Translocation coefficient (TC) values usually vary with metal concentrations in soil (Vogel-Mikuš e tal., 2005). We observed Zn TC values depended on Zn concentration in substrate, whereas Cd translocation coefficient values did not vary with Cd substrate concentrations. Translocation coefficient values for both metals did not differ between species. Bioaccumulation coefficient values for both metals did not differ between species, they decreased with rising metal concentrations in substrate.

Increased Zn concentrations in substrate did not have any impact on plant Cd concentrations, on the other hand increased Cd concentrations in substrate influenced plant Zn uptake.

*Thlaspi praecox* biomass yield was high and together with the accumulation of significant metal quantities from substrate from *Žerjav*, this species proved to be a promising tool to be used in phytoextraction of Cd.

## 10 LITERATURA

Adriano 2001 *Trace elements in terrestrial environments; Biochemistry, bioavailability and risk of metals*, 2nd edition, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg

Assunção, Bookum, Nelissen, Vooijs, Schat, Ernst. 2003.: *A co-segregation analysis of zinc (Zn) accumulation and Zn tolerance in the Zn Hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*, New Phytologist 159: 383-390

Assunção, Schat, Aarts 2003: *Thlaspi caerulescens, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants*, New Phytologist 159: 351-360

Baker, Reeves, Hajar 1994 *Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metalophyte Thlaspi caerulescens J.&C. Presl (Brassicaceae)*, New Phytologist 127: 61-68

Basic, Keller, Fontanillas, Vittoz, Besnard, Gallard. 2005. *Cadmium Hyperaccumulation and Reproductive Traits in Natural Thlaspi caerulescens Populations*, Plant Biology 8: 64-72

Brooks. 1998. *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, CABI Publishing, New York, USA

Cobbett. 2003. *Heavy Metals and Plants - Model Systems and Hyperaccumulators*, New Phytologist Commentary 159: 289-293

Doick, Lee, Semple. 2003. *Assesment of Spiking Procedures For the Introduction of a Phenantrene-LNAPL Mixture Into Field-wet Soil*, Elsevier, Environmental Pollution 126: 399-406

Gavlak, Horneck, Miller, Kotuby-Amacher 2003 *Soil, plant and water reference methods for the Western region*, 2nd edition, WCC-103 publication

Hagemeyer 1999 *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, Springer Verlag, Berlin

Hall. 2002 *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. Journal of Experimental Biology 53: 1-11

- Keller, Hammer 2004 *Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of Thlaspi caerulescens in metal contaminated soils*, Elsevier, Environmental pollution 131: 243-254
- Küpper, Zhao, McGrath 1999 *Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator Thlaspi praecox*, Plant Physiology 119: 305-311
- Lombi, Zhao, Dunham, McGrath. 2000. *Cadmium Accumulation in Populations of Thlaspi caerulescens and Thlaspi Goesingense*, New Phytologist 145: 11-20
- Lombi, Zhao, Dunham, McGrath. 2001 *Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction*, J. Environ. 30: 1919-1926
- Lombi, Tearall, Howarth, Zhao, Hawkesford, McGrath. 2002 *Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*, Plant physiology 128: 1359-1367
- Macnair, Bert, Huitson, Saumitou-Laparde, Petit. 1999. *Zinc Tolerance and Hyperaccumulation are Genetically Independent Characters*, The Royal Society 266: 2175-2179
- McGrath, Lombi, Gray, Caille, Dunham, Zhao. 2005 *Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators Thlaspi caerulescens and Arabidopsis halleri*, Elsevier, Environmental pollution 2005: 1-11
- Ozturk, Karanlik, Ozkutlu, Cakman, Kochian 2003: *Shoot biomass and zinc /cadmium uptake for hyperaccumulator and non-accumulator Thlaspi species in response to growth on a zinc-deficient calcareous soil*, Elsevier, Plant Science 164: 1095-1101
- Pongrac. 2004. *Privzem in lokalizacija Zn, Cd in Pb pri ranem mošnjaku (Thlaspi praecox Wulf.)*, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Mentor: doc.dr. Marjana Regvar
- Robinson, Leblanc, Petit, Brooks, Kirkman, Gregg. 1998. *The potential of Thlaspi caerulescens for phytoremediation of contaminated soils*, Plant and Soil 203: 47-56

- Seregin, Ivanov 2001 *Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants*, Russian journal of plant physiology 48: 523-544
- Taiz, Zeiger 1998 *Plant Physiology*, 2nd edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers
- Tolrà, Poschebrieder, Barcelo 1996: *Zinc hyperaccumulation in Thlaspi caerulescens: Influence on growth and mineral nutrition*, Journal of plant nutrition 19 (12): 1531-1540
- Sanità di Toppi, Gabbrielli. 1999. *Response to cadmium in higher plants*, review article, Elsevier, Environmental and Experimental Botany 41: 105-130
- Vázquez, Barceló, Poschenrieder, Mádico, Hatton, Baker, Cope. 1992 *Localization of zinc and cadmium in Thlaspi caerulescens (Brassicaceae), a metallophyte that can hyperaccumulate both metals*. Journal of Plant Physiology 140: 350-355
- Vázquez, Poschenrieder, Barceló, Baker, Hatton, Cope. 1994 *Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. J&C Presl. Botanica Acta 107: 243-250
- Vogel-Mikuš, Drobne, Regvar 2004: *Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of the pennycress Thlaspi praecox Wulf. (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia*, Elsevier, Environmental Pollution 133: 233-242
- Vogel-Mikuš, Pongrac, Kump, Nečemer, Regvar. 2005. *Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator Thlaspi praecox Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake*, Elsevier, Environmental Pollution 2005
- Yanai, Zhao, McGrath, Kosaki. 2005. *Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*, Elsevier, Environmental Pollution 2005
- Yang, Long, Ye, He, Calvert, Stoffella 2004 *Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn-hyperaccumulating plant species (Sedum alfredii hance)*, Plant and soil 259: 181-189

Zha, Jiang, Zhao, Voijis, Schat, Barker, McGrath. 2004: *A Co-segregation Analysis of Cadmium and Zinc Accumulation in Thlaspi caerulescens Interecotypic Crosses*, New Phytologist, 163: 299-312

Zhao, Lombi, McGrath 2003 *Assesing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*, Plant and Soil 249: 37-43

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Marjani Regvar za mentorstvo.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Alenki Gaberščik za pomoč pri izboljševanju diplomske naloge.

Posebna zahvala gre Pauli. Hvala za vse odgovorjene histerične klice, hvala za pregledovanje napisanega s svetlobno hitrostjo in nasploh za vso potrpežljivost in prijaznost.

Milena - hvala za vse potrpljenje, razumevanje in dobro voljo.

## **PRILOGA I: Biomasa rastlin**

Tabela: Biomasa rastlin *Thlaspi praecox*

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Št. rozet	Poganjki		Korenine	
			Sveža masa [g]	Suha masa [g]	Sveža masa [g]	Suha masa [g]
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/1	3	8,4	1,3	0,9	0,2
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /2	3	10,8	1,2	1,0	0,1
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /3	3	8,4	1,2	0,6	0,1
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /4	3	12,1	1,9	1,6	0,4
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /1	2	5,7	1,0	0,3	0,1
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /2	2	9,7	1,5	1,0	0,2
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /3	3	13,7	3,1	1,2	0,2
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /4	3	13,0	2,0	0,9	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /1	3	15,5	3,6	1,9	0,5
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /2	3	20,5	4,2	1,4	0,4
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /3	3	16,7	2,7	1,3	0,3
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /4	3	15,0	3,1	1,1	0,2
<i>T. praecox</i>	50 Zn /1	0				
<i>T. praecox</i>	50 Zn /2	3	12,2	1,7	0,8	0,2
<i>T. praecox</i>	50 Zn /3	3	7,0	1,4	1,0	0,2
<i>T. praecox</i>	50 Zn /4	3	5,7	1,2	0,6	0,1
<i>T. praecox</i>	250Zn /1	3	12,2	2,2	1,4	0,3
<i>T. praecox</i>	250Zn /2	3	15,4	3,2	1,3	
<i>T. praecox</i>	250Zn /3					0,4
<i>T. praecox</i>	250Zn /4	3	10,3	2,1	0,9	0,3
<i>T. praecox</i>	500Zn /1	3	13,4	2,4	1,0	0,4
<i>T. praecox</i>	500Zn /2	3	8,7	1,7	1,0	0,3
<i>T. praecox</i>	500Zn /3	3	9,6	1,7	1,1	0,3
<i>T. praecox</i>	500Zn /4	3	9,2	1,6	1,1	0,3
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /1	3	14,2	2,8	0,9	0,3
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /2	2	6,8	1,0	0,3	0,1
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /3	2	11,9	2,3	0,9	0,3
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /4	3	9,1	2,0	1,5	0,3
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /1	3	14,8	3,0	1,1	0,2
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /2	2	10,1	1,4	0,7	0,2
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /3	3	10,6	2,0	0,7	0,1
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /4	3	15,7	2,8	1,9	0,4
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /1	3	11,4	2,2	1,0	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /2	3	16,3	2,8	1,1	0,3
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /3	3	11,7	2,3	0,7	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /4	2	16,4	2,8	1,2	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /1	3	12,2	3,0	1,0	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /2	3	12,4	2,2	1,1	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /3	3	13,5	2,5	0,6	0,2
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /4	3	15,2	2,7	1,5	0,3
<i>T. praecox</i>	Zerjav	3	23,4	4,4	1,9	0,4
<i>T. praecox</i>	Zerjav	3	20,9	4,4	1,6	0,5
<i>T. praecox</i>	Zerjav	3	24,9	4,4	1,6	0,5
<i>T. praecox</i>	Zerjav	3	23,4	4,2	2,2	0,5

Tabela: Biomasa rastlin *Thlaspi caerulescens*

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Št. rozet	Poganjki		Korenine	
			Sveža masa [g]	Suha masa [g]	Sveža masa [g]	Suha masa [g]
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn/1	3	7,3	1,4	0,8	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /2	2	5,8	2,3	0,3	0,1
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /3	3	8,2	1,6	0,9	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /4	4	5,7	1,1	0,8	
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /1	3	11,4	1,0	1,3	
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /2	3	7,6	1,4	0,8	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /3	3	11,0	1,8	1,2	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /4	3	9,7	1,8	0,8	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /1	3	18,0	3,8	2,0	0,5
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /2	3	16,2	3,0	2,0	0,5
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /3	3	12,4	2,2	1,0	
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /4	3	17,3	3,1	1,2	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /1	1	7,5	1,4	0,8	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /2	2	6,0	0,9	0,4	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /3	3	7,9	1,3	0,8	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /4	2	6,5	1,0	1,7	0,1
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /1	3	13,2	2,6	0,9	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /2	3	10,7	2,4	1,5	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /3	3	11,6	2,1	1,6	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /4	3	11,0	2,5	1,3	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /1	3	10,9	2,1	1,9	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /2	3	12,1	2,6	1,5	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /3	3	9,0	1,4	1,2	
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /4	3	8,3	1,5	0,9	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /1	2	9,5	1,8	1,0	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /2	3	13,0	2,6	1,0	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /3	3	10,3	2,0	0,9	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /4	3	9,2	1,6	0,9	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /1	3	14,9	3,7	1,2	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /2	2	13,3	2,1	2,1	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /3					
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /4	1	3,8	0,5	0,4	0,1
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /1	3	12,6	2,4	1,1	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /2					
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /3	3	11,1	1,7	1,0	0,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /4	3	4,0	0,7	0,3	0,1
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /1	3	17,3	3,7	1,4	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /2	3	16,3	2,6	1,4	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /3	3	15,9	2,8	1,6	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /4	3	18,0	3,4	1,5	0,3
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	2	14,2	2,3	1,5	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	6	20,0	2,8	1,8	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	4	16,3	2,9	1,5	0,4
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	3	18,3	2,6	2,2	0,4



## **PRILOGA II: Koncentracije kovin v poganjkih rastlin**

Tabela: Vrednosti AAS za vrsto *Thlaspi praecox*

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Vrednosti AAS			
		Poganjki		Korenine	
		Cd [µg/g]	Zn [µg/g]	Cd [µg/g]	Zn [µg/g]
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/1	284,4	1339	283,7	359,3
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/2			218,3	295,2
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/3	210,5	1670	126,9	370,7
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/4	258,4	1436	175,8	254,1
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn/1	2257		1400	506
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn/2	2447	1172	1182	393,6
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn/3	1649	1142	809	349
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn/4	3915	2173	1245	486,6
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn/1	5115	1651	2257	536,8
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn/2	3785	2266	1882	341,5
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn/3	6867	2968	2736	902,6
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn/4	4079	3580	2890	468,8
<i>T. praecox</i>	50 Zn/1	/	994	/	220,6
<i>T. praecox</i>	50 Zn/2	/	1249	/	564,1
<i>T. praecox</i>	50 Zn/3	/	1957	/	1471
<i>T. praecox</i>	50 Zn/4	/	1680	/	780,3
<i>T. praecox</i>	250Zn/1	/	4996	/	884,6
<i>T. praecox</i>	250Zn/2	/		/	
<i>T. praecox</i>	250Zn/3	/	3137	/	1017
<i>T. praecox</i>	250Zn/4	/	2993	/	1189
<i>T. praecox</i>	500Zn/1	/	2938	/	1142
<i>T. praecox</i>	500Zn/2	/	3430	/	1224
<i>T. praecox</i>	500Zn/3	/	2977	/	1261
<i>T. praecox</i>	500Zn/4	/	3599	/	2685

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Vrednosti AAS			
		Poganjki		Korenine	
		Cd [µg/g]	Zn [µg/g]	Cd [µg/g]	Zn [µg/g]
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn/1	1855	1530	880,4	1719
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn/2	2781	978,3	589,2	1062
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn/3	2131	1705	893,9	1641
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn/4	2369	1151	885,7	1195
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn/1	1685	1531	1151	466,9
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn/2	1677	2663		971,1
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn/3	2470	2065	1109	773,4
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn/4	2022	2033	715,7	647,8
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn/1	5801	842,8	1734	
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn/2	4986	483,5	3738	268,4
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn/3	7514	836,7		381,3
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn/4	5269	916,1	2724	508,3
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn/1	4432	1592	2914	471,1
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn/2	5357	1278	2551	393,7
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn/3	6799	1227	3314	446,4
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn/4	6489	1909	3012	549,1
<i>T. praecox</i>	Žerjav	792,2	3869	391,1	820,6
<i>T. praecox</i>	Žerjav	833,6	2918	592,3	814,1
<i>T. praecox</i>	Žerjav	767,6	2754	486,4	862,9
<i>T. praecox</i>	Žerjav	1024	3676	602,5	572,7

Tabela: Vrednosti AAS za vrsto *Thlaspi caerulescens*

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Vrednosti AAS			
		Poganjki		Korenine	
		Cd [µg/g]	Zn [µg/g]	Cd [µg/g]	Zn [µg/g]
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn/1	319,4	2671	372,3	442,2
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /2	1440	1343	176,4	326,2
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /3	432	3012	286,7	744,1
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /4	458,5	2230	193,8	383,3
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /1	399,8	1555	740,8	375,2
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /2	3430	2272	1675	581,9
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /3	3084	2660	1743	409,7
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /4	5300	2664	2449	458,8
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /1	3874	2674	3550	689,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /2	2631	2856	2401	495,4
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /3	6052	3407	83,56	575,6
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /4	8025	2794	4957	451
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /1	/	996	/	535
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /2	/	/	/	565,4
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /3	/	1037	/	595,8
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /4	/	1143	/	1945
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /1	/	4243	/	811,7
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /2	/	4933	/	983,9
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /3	/	4625	/	1540
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /4	/	3860	/	1222
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /1	/	7826	/	3065
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /2	/	6206	/	2141
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /3	/	6794	/	/
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /4	/	6373	/	2002

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	Vrednosti AAS			
		Poganjki		Korenine	
		Cd [µg/g]	Zn [µg/g]	Cd [µg/g]	Zn [µg/g]
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /1	3774	2675	1969	455
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /2	2391	1933	2057	733,7
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /3	2871	2671	1750	746,1
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /4	2867	1962	2021	523,8
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /1	1643	2943	1131	835
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /2	2244	3896	1125	689,6
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /3	1622	/	/	/
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /4	1580	4796	295,1	913,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /1	4575	827,6	3453	318,3
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /2	12,74	424,7	/	/
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /3	5420	930,9	4251	378,6
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /4	2745	505	1444	621,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /1	6098	2357	5031	837,2
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /2	6164	1667	4518	1099
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /3	4981	1317	4587	1027
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /4	5633	1458	4297	318,7
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	1169	5290	1057	1274
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	1039	4538	678,6	758,6
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	1025	4410	798,5	729,8
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	1340	5507	807,7	870,2

### **PRILOGA III: Translokacijski faktor (TF)**

**Tabela 3:** Translokacijske vrednosti vseh rastnih tretmajev

		Translokacijski faktor Zn				Translokacijski faktor Cd			
		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
		Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka
Cd	5Cd 100Zn	4,6	0,6	5,0	0,5	1,4	0,2	3,2	1,7
	50Cd 100Zn	3,6	0,5	5,1	0,6	2,2	0,3	1,6	0,4
	250Cd 100Zn	5,2	1,2	5,4	0,5	2,0	0,2	19,1	17,8
Zn	50Zn	2,6	0,7	1,4	0,4	pmd		pmd	
	250Zn	3,7	1,0	4,1	0,6	pmd		pmd	
	500Zn	2,3	0,3	2,9	0,2	pmd		pmd	
Cd in Zn	50Cd 50Zn	1,0	0,0	4,0	0,7	3,0	0,6	1,5	0,2
	50Cd 250Zn	3,0	0,1	4,8	0,7	2,2	0,4	2,9	1,2
	250Cd 50Zn	1,9	0,1	2,0	0,6	2,2	0,6	1,5	0,2
	250Cd 250Zn	3,2	0,2	2,5	0,8	2,0	0,1	1,2	0,1
	Ž	4,5	0,7	5,6	0,5	1,7	0,1	1,4	0,1

pmd = pod mejo detekcije

Vrednosti translokacijskega faktorja (TF) smo izračunali po formuli

$$\text{translokacijski faktor (TF)} = \frac{\text{koncentracija specifične snovi v poganjkih rastline}}{\text{koncentracija iste snovi v koreninah rastline}}$$

## **PRILOGA IV: Bioakumulacijski faktor (BAF)**

**Tabela:** Bioakumulacijski faktor (BAF)

		Bioakumulacijski faktor Zn				Bioakumulacijski faktor Cd			
		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
		Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka
Cd	5Cd 100Zn	1318	384	989	393	276	28	703	250
	50Cd 100Zn	608	147	895	95	339	41	383	135
	250Cd 100Zn	455	72	451	41	64	11	59	12
Zn	50 Zn	804	322	446	34	pmd		pmd	
	250 Zn	284	43	285	20	pmd		pmd	
	500 Zn	90	7	226	36	pmd		pmd	
Cd in Zn	50Cd 50Zn	369	52	1029	228	295	41	437	92
	50Cd 250Zn	123	29	312	169	398	55	270	48
	250Cd 50Zn	245	37	214	43	84	9	41	14
	250Cd 250Zn	132	18	112	12	76	12	82	11
	Ž	69	7	124	13	66	9	109	14

pmd = pod mejo detekcije

Vrednosti bioakumulacijskega faktorja (BAF) smo izračunali po formuli:

$$\text{bioakumulacijski faktor (BAF)} = \frac{\text{koncentracija težkih kovin v suhi masi}}{\text{razpoložljiva koncentracija težkih kovin v substratu}}$$

## **PRILOGA V: Statistične odvisnosti**

**Tabela:** Statistične odvisnosti

Parameter	Rastni tretmaji z dodanim Cd			Rastni tretmaji z dodanim Zn			Rastni tretmaji z Zn in Cd		
	Vrsta	Tretma	Vrsta × Tretma	Vrsta	Tretma	Vrsta × Tretma	Vrsta	Tretma	Vrsta × Tretma
Dostopne frakcije Cd	ns	p<0,001	p<0,001	-	-	-	ns	p<0,001	ns
Dostopne frakcije Zn	ns	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,001	ns	ns	p<0,001	ns
Biomasa v odvisnosti od [kovin] v substratu	ns	p<0,001	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Koncentracija Cd v poganjkih	ns	p<0,001	ns	-	-	-	ns	p<0,001	p>0,01
Koncentracija Zn v poganjkih	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,01	p<0,001	p<0,001	p>0,01
Translokacijski faktor Cd	ns	ns	ns	-	-	-	ns	ns	ns
Traslokacijski faktor Zn	ns	p<0,001	ns	ns	p<0,01	ns	p<0,01	p<0,01	p<0,01
Bioakumulacijski faktor Cd	ns	p<0,01	ns	-	-	-	ns	p<0,001	ns
Bioakumulacijski faktor Zn	ns	p>0,01	ns	ns	p>0,01	ns	p<0,01	p<0,001	p<0,01

Analiza variance ANOVA (dvosmerna, p<0,05). Razlike smo testirali s posthoc Tukey-ovim testom. Statistično značilne razlike so označene s stopnjami zaupanja, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna, / - ni meritev za parameter.

## **PRILOGA VI: Dostopne frakcije kovin v rastnem substratu**

**Tabela:** Dostopne frakcije kovin v rastnem substratu [ $\mu\text{g/g}$ ]

	Dostopne frakcije Zn				Dostopne frakcije Cd			
	<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>		<i>Thlaspi praecox</i>		<i>Thlaspi caerulescens</i>	
	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka	Povprečje	Std. napaka
5Cd 100Zn	1,32	0,25	3,86	1,54	0,92	0,01	0,91	0,05
50Cd 100Zn	2,52	0,89	2,64	0,41	7,58	1,07	7,98	0,40
250Cd 100Zn	5,77	0,22	6,60	0,44	78,29	2,32	86,51	2,26
50Zn	2,40	0,63	2,24	0,18	pmd		pmd	
250Zn	13,97	1,04	15,59	0,52	pmd		pmd	
500Zn	36,16	1,69	31,97	4,41	pmd		pmd	
50Cd 50Zn	3,70	0,34	2,53	0,49	7,96	0,60	7,33	0,87
50Cd 250Zn	18,96	3,14	23,10	6,41	5,01	0,25	7,37	1,59
250Cd 50Zn	3,19	0,12	3,20	0,23	70,14	0,68	83,05	7,97
250Cd 250Zn	11,63	0,86	15,50	2,25	79,48	9,64	74,73	11,10
Ž	48,32	1,98	40,56	2,18	13,18	0,81	10,70	0,59

pmd = pod mejo detekcije

## **PRILOGA VII: Statistične odvisnosti privzema kovin v rastline**

**Tabela:** Statistične odvisnosti privzema kovin v rastline

	Naraščajoča koncentracija Zn v substratu				Naraščajoča koncentracija Cd v substratu			
	Vrsta	Dostopne frakcije kovine v substratu	Vrsta x Dostopne frakcije kovine v substratu		Vrsta	Dostopne frakcije kovine v substratu	Vrsta x Dostopne frakcije kovine v substratu	
Privzem Zn v rastlino	ns	p<0,001	ns		p>0,01	p>0,01	ns	
Privzem Cd v rastlino	ns	ns	ns		p>0,01	p>0,01	ns	

Analiza variance ANOVA (dvosmerna,  $p < 0,05$ ). Razlike smo testirali s posthoc Tukey-ovim testom. Statistično značilne razlike so označene s stopnjami zaupanja, ns – odvisnost parametrov ni statistično značilna, / - ni meritev za parameter.

### **PRILOGA VIII: Hranilna tekočina za rod *Thlaspi***

Sestavina hranilne tekočine za rod *Thlaspi* je povzera po Tolrà in sod. (1996).

**Tabela:** Sestava založnih raztopin

<b>MAKROELEMENTI</b>	<b>c [mM]</b>	<b>M [mg/mol]</b>	<b>m [g] za 1000 ml</b>	<b>m [g] za 1000 ml <u>50x konc</u></b>
<b>Založna raztopina 1</b>				
KNO <sub>3</sub>	3	101,00	0,3030	15,15
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	114,98	0,1150	5,75
<b>Založna raztopina 2</b>				
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	2	236,1	0,4722	23,61
<b>Založna raztopina 3</b>				
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5	246,38	0,1232	6,16
<b>MIKROELEMENTI</b>	<b>c [μM]</b>	<b>M[mg/mol]</b>	<b>m [g] za 1000 ml</b>	<b>m [g] za 100 ml <u>1000x konc</u></b>
<b>Založna raztopina 4</b>				
FeEDTA	66	367,05	0,024225	2,42
<b>Založna raztopina 5</b>				
KCl	50	74,55	0,003728	0,3728
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46	61,81	0,002843	0,2843
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	9	197,84	0,001718	0,1781
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,5	287,62	0,000431	0,0431
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	1,5	249,62	0,000374	0,0374
(NH <sub>4</sub> )Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,14	241,95	0,00003387	0,003387

**Tabela:** Priprava hranilne raztopine

	50x koncentrirana raztopina makroelementov (založna razt. 1,2,3)	1000x koncentrirana Fe EDTA (založna razt. 4)	1000x koncentrirana raztopina mikronutrientov (založna razt. 5)
HIDROPONIKA	20 ml na 1000 ml	1 ml na 1000 ml	1 ml na 1000 ml
ZALIVANJE	40 ml na 1000 ml	2 ml na 1000 ml	2 ml na 1000 ml

V poskusu smo uporabili hranilno tekočino za zalivanje.

### **PRILOGA IX: Fitoekstrakcija na Žerjavu**



**Tabela:** Dostopne frakcije kovin v rastnem substratu z Žerjava pred in po poskusu

	Dostopne frakcije Zn [mg/g]	Dostopne frakcije Cd [mg/g]
Pred poskusom	50,50	14,82
	51,94	14,00
	47,91	12,82
	42,94	11,08
Po poskusu	45,27	9,66
	45,25	10,94
	46,18	11,65
	40,29	7,19

## PRILOGA X: pH RASTNEGA SUBSTRATA

Tabela: pH rastnega substrata

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	pH
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn/1	7,05
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /2	7,1
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /3	7,05
<i>T. praecox</i>	5Cd 100Zn /4	7
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /1	6,8
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /2	6,98
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /3	7,05
<i>T. praecox</i>	50Cd 100Zn /4	6,98
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /1	6,7
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /2	6,82
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /3	6,9
<i>T. praecox</i>	250Cd 100Zn /4	6,9
<i>T. praecox</i>	50 Zn /1	7,00
<i>T. praecox</i>	50 Zn /2	7,10
<i>T. praecox</i>	50 Zn /3	7,20
<i>T. praecox</i>	50 Zn /4	7,17
<i>T. praecox</i>	250Zn /1	7,00
<i>T. praecox</i>	250Zn /2	7,10
<i>T. praecox</i>	250Zn /3	7,20
<i>T. praecox</i>	250Zn /4	7,15
<i>T. praecox</i>	500Zn /1	6,80
<i>T. praecox</i>	500Zn /2	6,78
<i>T. praecox</i>	500Zn /3	6,80
<i>T. praecox</i>	500Zn /4	6,90
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /1	7,05
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /2	7,20
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /3	7,18
<i>T. praecox</i>	50Cd 50Zn /4	7,20
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /1	7,00
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /2	7,01
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /3	7,05
<i>T. praecox</i>	50Cd 250Zn /4	7,05
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /1	7,09
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /2	7,10
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /3	7,12
<i>T. praecox</i>	250Cd 50Zn /4	7,18
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /1	6,95
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /2	6,90
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /3	7,00
<i>T. praecox</i>	250Cd 250Zn /4	7,10
<i>T. praecox</i>	Žerjav	6,60
<i>T. praecox</i>	Žerjav	6,50
<i>T. praecox</i>	Žerjav	6,55
<i>T. praecox</i>	Žerjav	6,50

Vrsta	Rastni tretma z dodano kovino	pH
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn/1	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /2	7,02
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /3	7,05
<i>T. caerulesc.</i>	5Cd 100Zn /4	7,10
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /1	6,90
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /2	6,91
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /3	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 100Zn /4	7,01
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /1	6,60
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /2	6,70
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /3	6,72
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 100Zn /4	6,80
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /1	6,68
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /2	6,68
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /3	7,05
<i>T. caerulesc.</i>	50 Zn /4	7,10
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /1	6,80
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /2	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /3	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	250Zn /4	7,10
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /1	6,80
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /2	6,78
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /3	6,80
<i>T. caerulesc.</i>	500Zn /4	6,90
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /1	6,95
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /2	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /3	7,05
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 50Zn /4	7,10
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /1	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /2	6,98
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /3	7,12
<i>T. caerulesc.</i>	50Cd 250Zn /4	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /1	6,90
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /2	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /3	7,00
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 50Zn /4	7,10
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /1	6,78
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /2	6,98
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /3	6,96
<i>T. caerulesc.</i>	250Cd 250Zn /4	6,92
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	6,50
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	6,50
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	6,60
<i>T. caerulesc.</i>	Žerjav	6,62