

Gimnazija Kranj
Raziskovalna naloga

Naslov:

Fitoremediacijska zmogljivost slovenskih avtohtonih sort obogatenih z dodatkom melatonina

Raziskovalno vprašanje:

Ali dodatek 100 μ M raztopine čistega melatonina izboljša fitoremediacijsko zmogljivost ekstrakcije talnega svinca (Pb) pri treh slovenskih avtohtonih sortah *Fagopyrum esculentum* (Moench), *Brassica napus* L. in *Sinapis alba* L., gojenih v prsti onesnaženi s 1500 μ M raztopino PbCO_3 ?

Avtor: Maruša Hrobat

Mentor: Vanda Kukec, Marko Zupan

Raziskovalno področje: Biologija, ekologija z varstvom okolja

Datum: Marec, 2015

Osnutek

Cilj študije je bil raziskati načine za izboljšanje sanacijskih postopkov svinca (Pb), ki so trenutno v rabi v Mežiški dolini in preveriti, ali dodatek melatonina poveča fitoremediativno zmogljivost slovenskih avtohtonih sort (*Fagopyrum esculentum* (Moench), *Brassica napus* L. in *Sinapis alba* L.). Za raziskavo je bilo posajenih 40 semen iste sorte, po osem semen za vsako od petih ponovitev. Prve tri rastline iste ponovitve so bile zalite z raztopino svinčevega (II) karbonata (vsak peti dan) in melatonina (vsak drugi dan), naslednje tri rastline iste sorte so bile zalite z raztopino svinčevega (II) karbonata (vsak peti dan) in vode. Prva rastlina kontrolne skupine je bila zalivana z vodo, druga pa je z raztopino melatonina. Meritve parametrov tal in vsebnosti Pb v tleh, ter zgornjih delih vzorcev rastlin, so bile opravljene na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (AAS). Raziskovalna hipoteza je navedla, da bodo vzorci zalivani z melatoninom kopičili večje količine Pb, ki bo zaradi izredne mobilnosti zaznan predvsem v koreninah, in da dodatki Pb in melatonina ne bodo povzročili vidne spremembe v fiziologiji rastlin, kar se kaže v odsotnosti bistvene razlike v meritvah sveže biomase med vzorci. Rezultati kažejo, da so koreninski (talni) vzorci rastlin, ki so prejele melatonin, kopičili večje količine Pb kot vzorci, ki so bili zaliti z raztopino Pb in kot rastline kontrolnih skupin. Razlike v meritvah sveže biomase med vzorci so statistično nepomembne. Začetne hipoteze so delno podprte, vendar pa študija ni vzpostavila trdnega vzročno-posledičnega odnosa med dodatkom melatonina in učinkovitostjo fitoremediacijske zmožnosti rastlin, ravno zaradi omejenega dostopa do primerne znanstvene opreme.

Abstract

The objective of this study was to investigate ways of improving the currently used methods of lead (Pb) remediation in Meža Valley, and to test whether the addition of melatonin increases the phytoremediative capacity of Slovenian indigenous varieties (*Fagopyrum esculentum* (Moench), *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L.).

To investigate the issue 40 seeds of the same variety were planted, of which 8 for each of the 5 repetitions. The first 3 plants of the same repetition were watered with a solution of lead (II) carbonate (every fifth day) and melatonin (every other day), the following 3 plants of the same variety were watered with a solution of lead (II) carbonate (every fifth day) and water. The first plant of the control group was watered with water and the second plant with melatonin solution only. Measurement of the soil parameters and levels of Pb in the soil and upper parts samples of the plants were carried out at the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, using atomic absorption spectrometry (AAS).

Research hypothesis stated that the samples watered with melatonin will accumulate larger quantities of Pb, which will mostly be detectable in the roots, since it is highly immobile; and that additives of Pb and melatonin will not visibly damage the plants, indicated by no significant difference in the fresh biomass measurements between the samples.

Results indicate that the root samples of the plants which received melatonin accumulated larger Pb quantities as compared to samples which were watered with the Pb solution only and to the control group. Differences in measurements of fresh biomass between the samples are statistically insignificant. The initial hypotheses are to some extent supported, however the study does not establish a firm cause-and-effect relationship between the addition of melatonin and efficiency of phytoremediation, due to limited availability of sufficient equipment.

Kazalo vsebine

Osnutek	1
Abstract	2
1. Uvod	4
1.1. Ozadje raziskovalne naloge	4
1.1.1. Problematika svinca v Mežiški dolini	4
1.1.2. Fitoremediacija	5
1.1.3. Melatonin kot olajševalni dejavnik v procesu fitoremediacije	6
1.1.4. Uporabljene sorte rastlin	7
1.2. Raziskovalno vprašanje	8
1.3. Hipoteze in napovedi	8
1.3.1. Raziskovalne hipoteze	8
1.3.2. Ničelna hipoteza	8
2. Raziskava	9
2.1. Metodologija	9
2.1.1. Spremenljivke	9
2.1.2. Pripomočki	10
2.1.3. Material in metoda	11
2.1.4. Meritve	14
2.3. Analiza podatkov	16
2.3.1. Surovi kvantitativni podatki	16
2.3.2. Procesirani kvantitativni podatki	21
3. Zaključek	31
4. Reference	34
5. Priloge	36

1. Uvod

1.1.Ozadje raziskovalne naloge

1.1.1. Problematika svinca v Mežiški dolini

Prvi dokument, ki omenja svinčeno (Pb) rudo na območju Zgornje Mežiške doline, je zapis v knjigi Ernesta Železnega leta 1424. Do takrat sta bili Pb in cinkova (Zn) ruda izkopavani in obdelovani na različnih lokacijah v Zgornji Mežiški dolini, zelo intenzivno predvsem v drugi polovici 20. stoletja. Rudarstvo, vezano na omenjeni rudi, se je končalo leta 1992 (Ribarič-Lasnik et al., 1999). Danes so nižji deli rudnika poplavljeni z vodo. Kljub temu pa težke kovine, kot so Pb, dolgoročno ostajajo prisotne v tleh; glavni vir onesnažene zemlje je onesnaževanje preko majhnih talnih delcev (prahu), ki se redno raznašajo v okolje. Emisije Pb v okolje iz različnih virov navadno končajo v tleh, in ker Pb je slabo topen v vodi (Kakovost zraka smernice za Evropo, 2000) se večinoma nabira v zgornjem sloju tal. Zato je onesneževanje pogosto prisotno tudi več let po prenehanju same rudarske dejavnosti. Po mnogih letih znatne emisije Pb v okolje je Zgornja Mežiška dolina postala močno obremenjena s Pb (Ivartnik in Pavlič, n.d.). Čeprav je bilo glede sanacije svinca storjenega že veliko, je izmerjena vsebnost težkih kovin na področju Mežiške doline še vedno skrb vzbujajoča (Celin, 2014). Mnoge metode prečiščevanja onesnaženih tal (npr. preplastitev javnih cest, parkov in igrišč, zamenjava onesnažene zemlje, mokro čiščenje prahu s cest in drugih asfaltiranih površin) (Ivartnik in Pavlič, n.d.) niso finančno in časovno učinkovite, ravno zato slovenska vlada spodbuja in financira inovacije v smeri novih, bolj ekološko in finančno učinkovitih načinov, eden takšnih je zagotovo fitoremediacija. Čeprav se postopek fitoremediacije že uporablja v Mežiški dolini, pa je dokaj zamuden. Nedavno je bil predstavljen nov, olajšan način ekstrakcije bakra (Cu) (Tan et al., 2007), kar je spodbudilo mojo radovednost, da bi ugotovila, ali bi imel predstavljen način fitoremediacije enak učinek na fitoekstrakcijo Pb. Če bi se le-ta izkazal za učinkovit in neškodljiv način sanacije onesnaženih tal, bi bil celoten proces sanacije tal Mežiške doline zaključen hitreje, z manj stroški in z minimalno škodo za okolje.

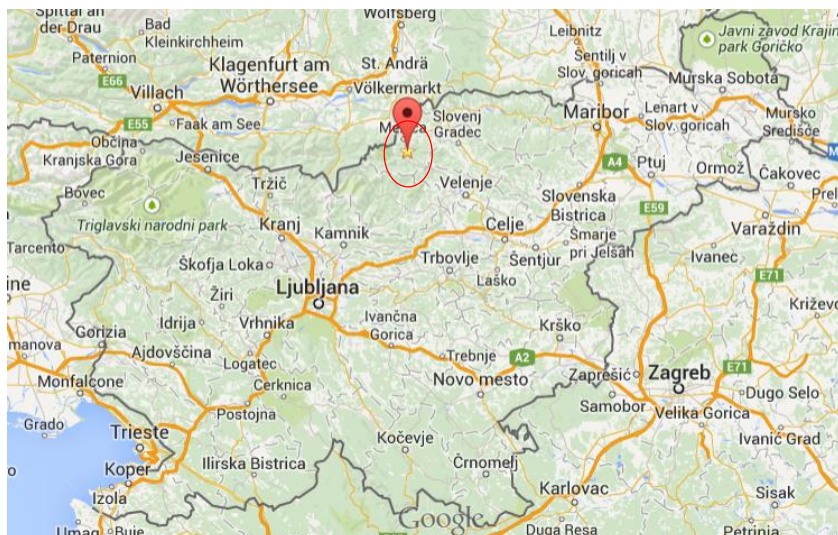


Figura 1: Lokacija Mežiške doline. Področje z najvišjo koncentracijo Pb v tleh – Žerjav (Ivartnik and Pavlič, n.d.) – je označeno z zvezdo. (Google.si, 2014)

1.1.2. Fitoremediacija

Uporaba rastlin za odstranjevanje težkih kovin iz tal (fitoremediacija) se uporablja vse pogostejše, ravno zaradi njene finančne učinkovitosti v primerjavi s tradicionalnimi remediativnimi metodami (omenjene zgoraj). Fitoremediacija je uporaba rastlin za delno ali popolno sanacijo izbranih onesnaževalcev v onesnaženih tleh, blatu, usedlinah, podtalnici ter površinskih in odpadnih vodah. Izkorišča predvsem naravne rastlinske procese (npr. absorpcijo vode in kemikalij, metabolne procese v rastlini). Ker so korenine učinkovite pri črpanju vode iz tal, se kontaminanti v vodi se lahko gibljejo preko povrhnjice do in preko Kasprijevega traku ter nato skozi endodermis, kjer so absorbirani, vezani ali metabolizirani (Pivetz, 2001).

Tabela 1: Nekaj prednosti in pomanjkljivosti fitoremediacije (Edsenga, Reese and Richards, n.d.).

Prednosti	Pomanjkljivosti
Bistveno cenejša v primerjavi z drugimi sanacijskimi metodami (npr. zamenjava kontaminirane prsti)	Omejena na področja z nižjo stopnjo kontaminacije
Nezahtevnost vzdrževanja metode	Dokaj zamudna metoda
Estetski element	Omejena na področja, na katerih je kontaminacija globoka toliko kot korenine uporabljenih rastlin
Okolju prijazna in najmanj vsiljiva metoda	Zaradi degradacije kemikalij lahko negativno vpliva na prehranjevalno verigo

1.1.3. Melatonin kot olajševalni dejavnik v procesu fitoremediacije

Ker je Pb kot glavni kontaminant prsti Mežiške doline slabo topen v prsti, ga je rastlina slabo (oziroma skoraj ni) sposobna absorbirati (Kabata-Pendias and Pendias, 1984), zato so za učinkovito fitoekstrakcijo in olajšan transport težkih kovin preko koreninskega sistema potrebne metode, ki transport olajšajo oziroma pospešijo (Turan and Esringu, 2007). Ena izmed tovrstnih metod je dodatek melatonina – okolju prijazne molekule s širokim spektrom antioksidantnih zmogljivosti (Tan et al., 2007).

Melatonin ($C_{13}H_{16}N_2O_2$) v rastlinah deluje kot neposredni lovilec prostih radikalov in posredni antioksidant, kar poveča aktivnost številnih antioksidantnih encimov. Poleg tega neposredno detoksificira hidroksilne radikale, vodikov peroksid, dušikov oksid in hipoklorovo kislino. Rastline imajo navadno visoko vsebnost melatonina, saj jim ta omogoči prilagoditev težkim razmeram, ki so jim izpostavljene zaradi svoje imobilnosti. Melatonin naj bi imel tudi sposobnost povečanja poljščin. Slednje je mogoče zaradi njegove vloge v ohranjanju klorofila, promocije fotosinteze in stimulacije razvoja koreninskega sistema (Mandal, 2012).

Pb je slabo topen in se ga tako le majhna količina prenese v višje dele rastline, prenesena količina pa je navadno shranjena v koreninah in podzemnih celičnih stenah (Kugonič and Zupan, 1999). To je storjeno v postopku fitoekstrakcije ali fitoakumulacije. Omenjeni postopek torej izkoristi rastline ali alge za odstranitev kontaminantov iz prsti, sedimentov ali vode in jih prenese v dele rastlinske biomase, ki so nato odstranjeni iz zemlje. Organizmi, ki so sposobni ekstrahirati večje količine kontaminantov, so znani kot hiperakumulatorji. Dve tovrstni sorti sta bili uporabljeni v izvedeni študiji, in sicer *Fagopyrum esculentum* (Moench) ter *Brassica napus* L.. Rastline absorbirajo kontaminante preko koreninskega sistema in jih nato kopičijo v koreninski biomas, kasneje pa jih prenesejo v stebila in liste. Živeča rastlina lahko absorbira kontaminante, dokler ni požeta (Wikipedia, n.d.).

1.1.4. Uporabljene sorte rastlin

1.1.4.1. ***Fagopyrum esculentum* (Moench):** Sorta, ki je bila vzgojena v Sloveniji pred več kot 15 leti. Semenski material te sorte se še vedno proizvaja, ohranja in uporablja v Sloveniji in na ekološko-podobnih območjih (Ministrstvo za okolje in prostor, 2007). Ta sorta je bila uporabljena v študiji, ker je znana kot hiperakumulator za Pb (Honda et al., 2007).

1.1.5.2. ***Brassica napus* L.:** Znana tudi kot oljna repica ali ogrščica, je belocveta članica družine Brassicaceae. *B. napus* L. je gojena predvsem zaradi semena, ki je bogat z oljem in predstavlja tretji najpomembnejši vir rastlinskih olj na svetu (Wikipedia, n.d.). *B.napus* L. je bila uporabljena v tej študiji, ker je prav tako znana kot rastlina, zmožna akumulirati visoke koncentracije Pb (Park, Kim and Kim, 2012).

1.1.6.3. ***Sinapis alba* L.:** Znana tudi kot bela gorjušica, je prav tako članica družine Brassicaceae. Izhaja sicer iz Sredozemlja, vendar je gojena po celem svetu (Pfaf.org, n.d.). Ta sorta je bila uporabljena v študiji, ker za razliko od zgoraj omenjenih sort ni primerna za fitoremediacijo Pb, zaradi prenizke biomase (Evangelou et al., 2007).

1.2. Raziskovalno vprašanje

Ali dodatek 100 μM raztopine čistega melatonina izboljša fitoremediacijsko zmogljivost ekstrakcije talnega svinca (Pb) pri treh slovenskih avtohtonih sortah *Fagopyrum esculentum* (Moench), *Brassica napus* L. in *Sinapis alba* L., gojenih v prsti onesnaženi s 1500 μM raztopino PbCO_3 ?

1.3. Hipoteze in napovedi

1.3.1. Raziskovalne hipoteze

- Rastline, ki so bile zalivane z obema raztopinama (Pb in melatonin), bodo akumulirale večje količine Pb kot tiste, ki so bile zalivane le z raztopino Pb. To bo povzročilo višjo raven Pb (mg/kg) zaznano v koreninah (vzorec prsti) in v nadzemnih delih rastlin, ki so bile zalivane z obema raztopinama (Pb in melatonin) kot v tistih, ki so bile zalivane le z raztopino Pb.
- Zelo malo ali nič Pb bo zaznanega v nadzemnih delih vseh rastlin, ker se ta akumulira predvsem v zgornjih 20 cm prsti in je navadno slabo mobilan (Traunfeld and Clement, 2001). Če že, potem bi morala biti zaznana količina Pb večja v nadzemnih delih rastlin, ki so bile zalivane z obema raztopinama (Pb in melatonin).
- Dodatek Pb bo rastlinam, ki niso bile zalivane z raztopino melatonina, povzročil vidno škodo (npr. rjavi listi, oveneli cvetovi) in inhibiral njihovo rast. Ostale rastline bodo uspevale normalno.
- Dodatek melatonina ne bo rastlinam povzročil nobene vidne škode.

1.3.2. Ničelna hipoteza

- Med rastlinami, ki so bile zalivane le s Pb raztopino in tistimi, ki so bile zalivane z obema raztopinama (Pb in melatonin), ne bo nobene razlike v zaznanih vrednostih prevzema Pb.
- Med rastlinami, ki so bile zalivane le s Pb raztopino in tistimi, ki so bile zalivane z obema raztopinama (Pb in melatonin), bo vidna razlika v njihovi rasti in stopnjo opazne škode.

2. Raziskava

2.1. Metodologija

2.1.1. Spremenljivke

Neodvisna: Dodatek melatonina k procesu zalivanja rastlin.

Odvisna: Količina Pb (v mg/kg) zaznana v vzorcih prsti in nadzemnih delov rastlin.

Kontrolirane spremenljivke:

- Temperatura, nasičenost in pH raztopin, uporabljenih za zalivanje.
- Tip uporabljene prsti.
- Velikost in material uporabljenih rastlinskih lončkov.
- Temperatura zraka, vlažnost in lokacija rastlin med obdobjem rasti.
- Dolžina in temperatura obdobja sušenja.
- Izgubljen ali poškodovan material med pakiranjem in mletjem vzorcev.
- Preprečevanje mešanja vzorcev iz različnih pogojev, z rednim čiščenjem sit in naprave za mletje z etanolom.

2.1.2. Pripomočki

- Semena sort *F. esculentum* (Moench), *B. napus* L. in *S. alba* L.
- 120 rastlinskih lončkov, 10x10x15 cm
- Biobrazda prst
- Naravna mineralna voda brez CO₂
- PbCO₃ (svinečev (II) karbonat) (Sigma-Aldrich)¹
- Melatonin (Super-Nutrition)²
- Elektronska tehcnica
- Merilni trak
- Digitalni termometer (za spremljanje temperature zraka in raztopin za zalivanje)
- Papirnate vrečke brez voska in potiska
- BINDER vacuum sušilna peč³ (za sušenje vzorcev prsti in nadzemnih delov rastlin)
- Digitalni vlagomer
- 3 2L plastične posode za shranjevanje raztopin za zalivanje
- Mlin za grobo mletje suhih vzorcev (RETSC ZM100)⁴
- Velik ročni možnar za fino mletje vzorcev
- Manjši ročni možnar za še finejše mletje vzorcev
- 2 mm sito
- 160 µm sito
- Mikrovalovna pečica⁵ (za razklop rastlinskih vzorcev)
- Atomske absorpcijske spektrofotometer (AAS Varian)⁶ (za določanje prisotnosti Pb v rastlinskih vzorcih)

¹ Glej prilogo 1

² Glej prilogo 2

³ Glej prilogo 13

⁴ Glej prilogo 3

⁵ Glej prilogo 4

⁶ Glej prilogo 5

2.1.3. Material in metoda

Metoda je bila prevzeta po raziskavi iz leta 2007 *Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin* avtorjev Tan, D., Manchester, L., Helton, P. in Reiter, R.

- Skozi celoten poskus je bila uporabljena 100 μ M raztopina melatonina. Koncentracija Pb raztopine se je z vsakim zalivanjem povečala za 100 μ M, tako da je bila prva nasičenost 100 μ M in zadnja 500 μ M.
- Raztopine za zalivanje so bile hranjene v 2L plastičnih posodah v hladnem in suhem prostoru, tako je bila zagotovljena konstantna temperatura vode in raztopin ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Poskus je bil izveden zunaj, na domači terasi. Vseh 120 rastlin je bilo izpostavljenih enakim pogojem (temperatura med 20°C in 28°C).
- Uporabljena prst, znana pod imenom Biobrazda, je obogatena s 100% naravnim gnojilom biobrazda in mikroelementi v humusni osnovi, kar omogoča optimalno rast rastlin v začetnih fazah (Biobrazda.si, n.d.)⁷.
- Posajenih je bilo 120 rastlin⁸ (19.07.2014), vsaka v posamezen plastičen rastlinski lonček (10x10x15 cm). 40 lončkov ajde (*F. esculentum* (Moench))⁹, 40 lončkov ogrščice (*B. napus* L.)¹⁰ (obe rastlini znani kot Pb akumulatorja) in 40 lončkov gorjušice (*S. alba* L.)¹¹ (neprimerna za fitoremediacijo Pb).

⁷ Glej prilogo 6

⁸ Glej prilogo 7

⁹ Glej prilogo 8

¹⁰ Glej prilogo 9

¹¹ Glej prilogo 10

- 5 ponovitev vseh treh različnih sort rastlin je bilo posajenih in razdeljenih v razdelke po tri, tri in dve rastlini. Zadnji dve rastlini sta predstavljali kontrolno skupino, saj sta bili zalivani zgolj z mineralno vodo brez CO₂ in raztopino melatonina. Vseh prvih šest rastlin je bilo zalivanih s Pb raztopino. Prve tri rastline so bile poleg Pb raztopine vsak drugi dan zalivane še z raztopino melatonina, medtem ko so bile druge tri rastline na isti dan, kot so prve tri prejele dodatek melatonina, zalivane le z mineralno vodo brez CO₂.

Tabela 2: Vizualna reprezentacija razporeditve rastlin v poskusu; prvi trije lončki (Pb-M) so vsebovali rastline, ki so bile zalivane s Pb raztopino in raztopino melatonina, drugi trije lončki (Pb) so vsebovali rastline, ki so bile zalivane s Pb raztopino in mineralno vodo brez CO₂, zadnja dva lončka sta vsebovala rastline kontrolne skupine, od teh so bile prve zalivane zgolj z raztopino melatonina (Melatonin) in zadnje zgolj z mineralno vodo brez CO₂ (Voda)¹².

Pb-M	Pb-M	Pb-M	Pb	Pb	Pb	Melatonin	Voda	Prva ponovitev
Pb-M	Pb-M	Pb-M	Pb	Pb	Pb	Melatonin	Voda	Druga ponovitev
Pb-M	Pb-M	Pb-M	Pb	Pb	Pb	Melatonin	Voda	Tretja ponovitev
Pb-M	Pb-M	Pb-M	Pb	Pb	Pb	Melatonin	Voda	Četrta ponovitev
Pb-M	Pb-M	Pb-M	Pb	Pb	Pb	Melatonin	Voda	Peta ponovitev

¹² Glej prilogo 11

- Prvih 7 dni so bile rastline dnevno zalivane s 100mL mineralne vode brez CO₂. Osmi dan je bilo prvim trem rastlinam dodanih 100mL 100 µM raztopine melatonina, ostalim petim rastlinam pa enaka količina mineralne vode brez CO₂. Postopek je bil ponovljen vsak drugi dan. Petnajsti dan je bilo vsem rastlinam, razen kontrolni skupini, dodanih 100mL 100µM raztopine Pb. Slednja je bila dodana vsak peti dan, njena nasičenost pa se je povečevala z vsakim dodatkom.
- Po 38 dneh dnevnega zalivanja so se rastline v lončkih sušile še 4 dni. Nato so bile požete, nadzemni deli (listi, cvetovi in stebila) so bili ločeni od podzemnih delov, dolžina vseh je bila izmerjena z merilnim trakom, masa vseh vzorcev pa je bila izmerjena z elektronsko tehtnico.
- Da ne bi prišlo do poškodb vzorcev, so bili slednji previdno shranjeni v ločene papirnate vrečke¹³; rastlinski vzorci prvih treh rastlin (zalivanih z raztopinama Pb in melatonina) so bili shranjeni skupaj, tako da so bili njihovi nadzemni deli shranjeni v eno, podzemni pa v drugo papirnato vrečko. Vzorci naslednjih treh rastlin (zalivane z raztopino Pb) so bili prav tako shranjeni skupaj, in sicer ponovno v 2 različni vrečki, podzemni vzorci v eno in nadzemni v drugo. Enak postopek je bil uporabljen tudi pri vzorcih kontrolne skupine za vseh 5 ponovitev.
- Vsebina prvih treh lončkov je bila torej združena v dva rastlinska vzorca (nadzemni in podzemni deli), ki so bili zalivani z raztopinama Pb in melatonina. Enak postopek je bil uporabljen tudi za vsebino drugih treh lončkov in dveh lončkov kontrolne skupine za vseh pet ponovitev. Tri ponovitve so bile poslane na Univerzo v Ljubljani na nadaljnje meritve.
- Papirnate vrečke z vzorci je nato čakalo 3-dnevno sušenje v BINDER vacuum sušilni peči. Nadzemni deli so se sušili pri 105°C, podzemni pa pri 40-50°C.

¹³ Glej prilogo 12

2.1.4. Meritve

Drugi del eksperimenta je bil izveden na oddelku za agronomijo biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Po 3-dnevnem sušenju so bili vzorci zmleti v mlinu in z uporabo ročnega možnarja, nato pa presejani skozi 2mm sito. Majhen del dobljenega vzorca je bil ponovno zmlet, tokrat v manjšem možnarju in presajen skozi 0.16mm sito.



Figura 2: Proces mletja z večjim keramičnim možnarjem. (Hrobat, 2014)



Figura 3: Proces setve z 2mm sitom. (Hrobat, 2014)

Opravljen je bil kislinski razklop z aquo regio (ISO 11466), vsebnost Pb pa je bila določena z atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS)(ISO 11047).

Suhi vzorci so bili zmleti v titanovem mlinu (RETSC ZM100). Rastlinski vzorci (< 0.20 mm) so bili prebavljani v 65% HNO₃ v mikrovalovni pečici. Pb je bil določen z AAS (ISO 11047).

2.3. Analiza podatkov

Kvalitativni in kvantitativni podatki so bili zabeleženi, saj se je raziskovalna hipoteza navezovala tako na vidno škodo in zavirano rast rastlin, kot na količino zaznanega Pb (v mg/kg) v rastlinskih vzorcih.

2.3.1. Surovi kvantitativni podatki

V naslednjih tabelah:

- O – *B. napus* L.
- G – *S. alba* L.
- A – *F. esculentum* (Moench)
- C – kontrolna skupina
- Pb – zalivano le s Pb
- Pb-M – zalivano s Pb in melatoninom

V naslednjih tabelah po tri zaporedne oznake (npr. O-C, O-C, O-C) predstavljajo tri različne ponovitve. Ker je meritveni postopek na Univerzi v Ljubljani dokaj zamuden in drag, so bile za prisotnost Pb testirane le po tri ponovitve. Spodnja meja detekcije (LOD) je bila 0.003 mg/kg. Merilna negotovost uporabljene opreme (AAS) pa je bila 9%.

Tabela 3: Količina zaznanega Pb v talnih vzorcih *B.napus L.*

Laboratorijska številka vzorca	Prst	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
964/14/1	O-C	58.374
965/14/1	O-C	56.536
966/14/1	O-C	49.417
949/14/1	O-Pb	131.073
950/14/1	O-Pb	174.592
951/14/1	O-Pb	162.394
955/14/1	O-Pb-M	217.293
956/14/1	O-Pb-M	218.346
957/14/1	O-Pb-M	278.858

Tabela 4: Količina zaznanega Pb v talnih vzorcih *S. alba* L.

Laboratorijska številka vzorca	Prst	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
952/14/1	G-C	38.757
953/14/1	G-C	94.393
954/14/1	G-C	47.124
958/14/1	G-Pb	222.346
959/14/1	G-Pb	230.631
960/14/1	G-Pb	230.788
961/14/1	G-Pb-M	311.914
962/14/1	G-Pb-M	251.164
963/14/1	G-Pb-M	321.180

Tabela 5: Količina zaznanega Pb v talnih vzorcih *F. esculentum* (Moench).

Laboratorijska številka vzorca	Prst	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
967/14/1	A-C	27.418
968/14/1	A-C	30.192
969/14/1	A-C	34.289
970/14/1	A-Pb	305.884
971/14/1	A-Pb	255.530
972/14/1	A-Pb	254.994
973/14/1	A-Pb-M	207.266
974/14/1	A-Pb-M	212.117
975/14/1	A-Pb-M	217.230

Tabela 6: Količina zaznanega Pb v vzorcih nadzemnih delov *B. napus* L.

Laboratorijska številka vzorca	Rastlina	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
147/14/2	O-C	16.961
148/14/2	O-C	6.817
149/14/2	O-C	10.765
150/14/2	O-Pb	23.440
151/14/2	O-Pb	39.160
152/14/2	O-Pb	81.188
153/14/2	O-Pb-M	70.855
154/14/2	O-Pb-M	49.404
155/14/2	O-Pb-M	64.287

Tabela 7: Količina zaznanega Pb v vzorcih nadzemnih delov *S. alba* L.

Laboratorijska številka vzorca	Rastlina	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
156/14/2	G-C	<.003
157/14/2	G-C	<.003
158/14/2	G-C	<.003
159/14/2	G-Pb	<.003
160/14/2	G-Pb	<.003
161/14/2	G-Pb	<.003
162/14/2	G-Pb-M	74.613
163/14/2	G-Pb-M	206.276
164/14/2	G-Pb-M	70.830

Tabela 8: Količina zaznanega Pb v vzorcih nadzemnih delov *F. esculentum* (Moench).

Laboratorijska številka vzorca	Rastlina	Pb v mg/kg $\pm 9\%$
138/14/2	A-C	<.003
139/14/2	A-C	<.003
140/14/2	A-C	<.003
141/14/2	A-Pb	<.003
142/14/2	A-Pb	<.003
143/14/2	A-Pb	<.003
144/14/2	A-Pb-M	<.003
145/14/2	A-Pb-M	<.003
146/14/2	A-Pb-M	<.003

2.3.2. Procesirani kvantitativni podatki

Raziskovalna hipoteza se je nanašala tudi na vidno škodo in inhibirano rast rastlin, ki niso bile zalivane z raztopino melatonina, torej le z raztopino Pb. Na dan, ko so bile rastline odstranjene iz lončkov, so bile le-te tudi predhodno fotografirane^{14,15,16}. Meritve sveže biomase so bile zbrane glede na višino in težo rastlin takoj po žetvi.

V naslednjih tabelah:

- O – *B. napus* L.
- G – *S. alba* L.
- A – *F. esculentum* (Moench)
- C – kontrolna skupina
- Pb – zalivano le s Pb
- Pb-M – zalivano s Pb in melatoninom
- Vse srednje vrednosti so bile izračunane z uporabo formule za izračun srednje vrednosti¹⁷ in TI-84 Plus Texas Instruments GDC.
- Predstavljeni standardni odkloni so bili izračunani z uporabo formule za standardni odklon¹⁸ in TI-84 Plus Texas Instruments GDC.
- Za primerjavo stopnje odstopanja med nizi podatkov je bil izbran koeficient variacije (CV). Izračunan je bil z uporabo TI-84 Plus Texas Instruments GDC kot količnik med standardnim odklonom in srednjo vrednostjo niza podatkov.

¹⁴ Glej prilogo 14

¹⁵ Glej prilogo 15

¹⁶ Glej prilogo 16

¹⁷ Glej prilogo 17

¹⁸ Glej prilogo 18

Tabela 9: Podatki izmerjene sveže biomase zgornjih delov *F. esculentum* (Moench) s povprečnimi vrednostmi, standardnimi odkloni in CV vrednostmi.

Rastlina	Masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Višina v cm $\pm$ 0.05 cm	Povprečna masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Povprečna višina v cm $\pm$ 0.05 cm	St. odkl. mase v gramih $\pm$ 0.01 g	St. odkl. višine v cm $\pm$ 0.05 cm	CV masa	CV višina
A-C	11.65	30.00	10.95	34.67	1.14	4.11	0.10	0.12
A-C	11.86	34.00						
A-C	9.34	40.00						
A-Pb	15.01	41.00	16.13	43.67	0.85	1.89	0.05	0.04
A-Pb	16.32	45.00						
A-Pb	17.06	45.00						
A-Pb-M	10.39	37.00	12.88	36.67	1.77	2.87	0.14	0.08
A-Pb-M	14.36	33.00						
A-Pb-M	13.90	40.00						

Tabela 10: Podatki izmerjene sveže biomase zgornjih delov *B. napus* L. s povprečnimi vrednostmi, standardnimi odkloni in CV vrednostmi.

Rastlina	Masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Višina v cm $\pm$ 0.05 cm	Povprečna masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Povprečna višina v cm $\pm$ 0.05 cm	St. odkl. mase v gramih $\pm$ 0.01 g	St. odkl. višine v cm $\pm$ 0.05 cm	CV masa	CV višina
O-C	5.72	6.00	5.97	7.33	0.59	1.89	0.10	0.26
O-C	6.79	10.00						
O-C	5.41	6.00						
O-Pb	8.42	9.00	10.65	10.00	1.82	0.82	0.17	0.08
O-Pb	10.65	10.00						
O-Pb	12.89	11.00						
O-Pb-M	12.31	9.00	9.83	8.67	1.79	0.47	0.18	0.05
O-Pb-M	9.02	8.00						
O-Pb-M	8.17	9.00						

Tabela 11: Podatki izmerjene sveže biomase zgornjih delov *S. alba* L. s povprečnimi vrednostmi, standardnimi odkloni in CV vrednostmi.

Rastlina	Masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Višina v cm $\pm$ 0.05 cm	Povprečna masa v gramih $\pm$ 0.01 g	Povprečna višina v cm $\pm$ 0.05 cm	St. odkl. mase v gramih $\pm$ 0.01 g	St. odkl. višine v cm $\pm$ 0.05 cm	CV masa	CV višina
G-C	6,84	43.00	7.75	40.33	0.81	2.49	0.10	0.06
G-C	7.60	41.00						
G-C	8.81	37.00						
G-Pb	10.77	49.00	11.65	42.67	1.06	4.50	0.09	0.11
G-Pb	11.05	40.00						
G-Pb	13.14	39.00						
G-Pb-M	6.80	34.00	10.08	37.67	2.41	3.86	0.24	0.10
G-Pb-M	10.92	43.00						
G-Pb-M	12.53	36.00						

Vse izračunane CV vrednosti so relativno majhne, kar kaže na majhno stopnjo odstopanj med nizi podatkov, torej na majhno variacijo med meritvami različnih ponovitev, kar pa hkrati tudi poveča statistično moč v testiranju hipoteze. Velika statistična moč zagotovi, da razlika, ki jo merimo, ni zgolj navidezna, ampak resnično obstaja (Frost, 2011).

Da bi ugotovila, ali je imel dodatek Pb resničen vpliv na fizično škodo in ali je res zaviral rast rastline, sem izvedla T-test med meritvami sveže biomase rastlin, zalivanih z obema raztopinama in s tistimi, ki so bile zalivane zgolj z raztopino Pb.

Da bi ugotovila, ali melatonin resnično vpliva na fiziologijo rastlin, ki je bil dodan, sem izvedla dodaten T-test med meritvami sveže biomase rastlin zalivanih z melatoninom in Pb, ter rastlin kontrolne skupine.

Število prostostnih stopenj $(n_1+n_2)-2$; kjer je $n_1=3$ in $n_2=3$: 4

Kritična T-vrednost: 2.78 za 5% napako

Tabela 12: Izračunane T-vrednosti meritev sveže biomase med skupinama rastlin (Pb in Pb-M) iz dveh različnih pogojev. Tabela prikazuje tudi, ali je razlika med nizoma podatkov statistično pomembna ali ne.

Rastlina	Izračunana T-vrednost ¹⁹		Število prostostnih stopenj	Kritična T-vrednost za 5 %	Pomembnost razlike	
	Masa	Višina			Masa	Višina
A-Pb A-Pb-M	2.33	2.88	4	2.78	ne	da
O-Pb O-Pb-M	0.45	2.00	4	2.78	ne	ne
G-Pb G-Pb-M	0.84	1.19	4	2.78	ne	ne

Tabela 13: Izračunane T-vrednosti meritev sveže biomase med skupinama rastlin (control and Pb-M) iz dveh različnih pogojev. Tabela prikazuje tudi, ali je razlika med nizoma podatkov statistično pomembna ali ne.

Rastlina	Izračunana T-vrednost ²⁰		Število prostostnih stopenj	Kritična T-vrednost za 5 %	Pomembnost razlike	
	Masa	Višina			Masa	Višina
A-C A-Pb-M	1.30	0.56	4	2.78	ne	ne
O-C O-Pb-M	2.90	0.97	4	2.78	da	ne
G-C G-Pb-M	1.30	0.82	4	2.78	ne	ne

¹⁹ Glej prilogo 19

²⁰ Glej prilogo 19

Tabela 14: Srednje vrednosti in mediana zaznane količine Pb v vzorcih prsti vseh treh rastlinskih sort.

Vzorec prsti	Povprečje Pb v mg/kg ±9%	Mediana Pb v mg/kg ±9%
O-C	54.776	56.536
O-Pb	156.020	162.394
O-Pb-M	238.166	218.346
G-C	60.091	47.124
G-Pb	227.922	230.631
G-Pb-M	294.753	311.914
A-C	30.633	30.192
A-Pb	272.136	255.530
A-Pb-M	212.204	212.117

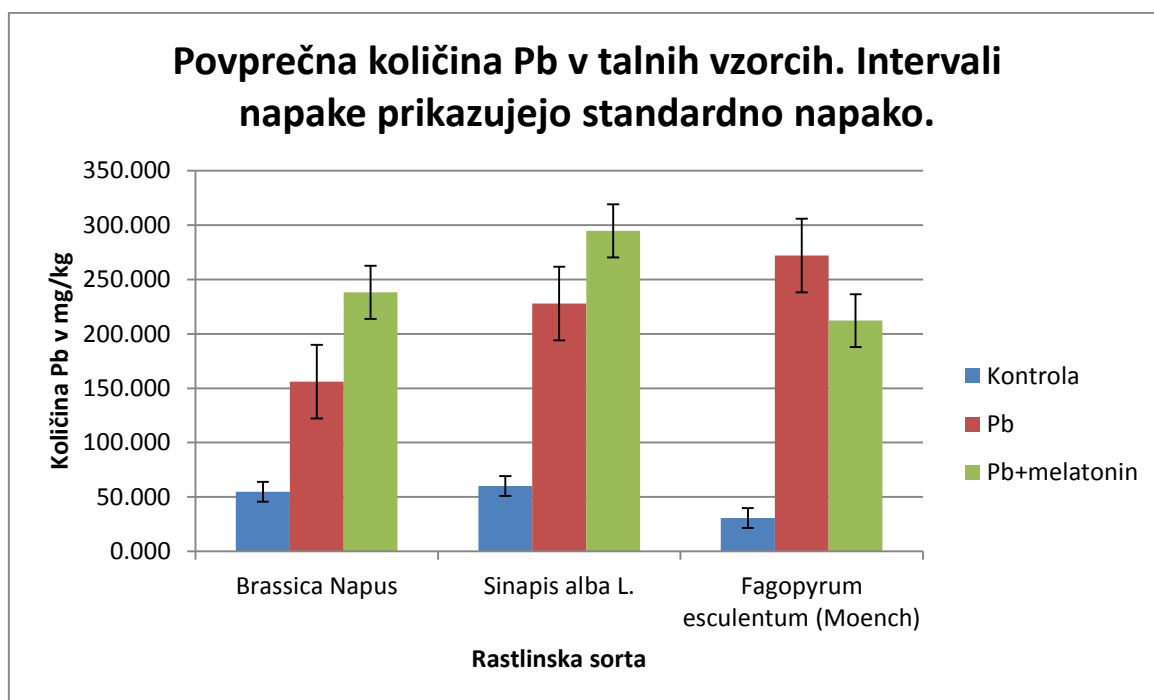


Figura 4: Graf prikazuje srednjo vrednost zaznane količine Pb v talnih vzorcih vseh treh rastlinskih sort. Graf vsebuje tudi intervale napake, ki prikazujejo veliko standardno napako srednje vrednosti, zaradi majhnega vzorca.

Tabela 15: Srednje vrednosti in mediana zaznane količine Pb v vzorcih nadzemnih delov vseh treh rastlinskih sort.

Vzorec nadzemnega dela	Povprečje Pb v mg/kg $\pm 9\%$	Mediana Pb v mg/kg $\pm 9\%$
O-C	0.000	0.000
O-Pb	0.000	0.000
O-Pb-M	0.000	0.000
G-C	11.514	10.765
G-Pb	47.929	39.160
G-Pb-M	61.515	64.287
A-C	0.000	0.000
A-Pb	0.000	0.000
A-Pb-M	117.240	74.613

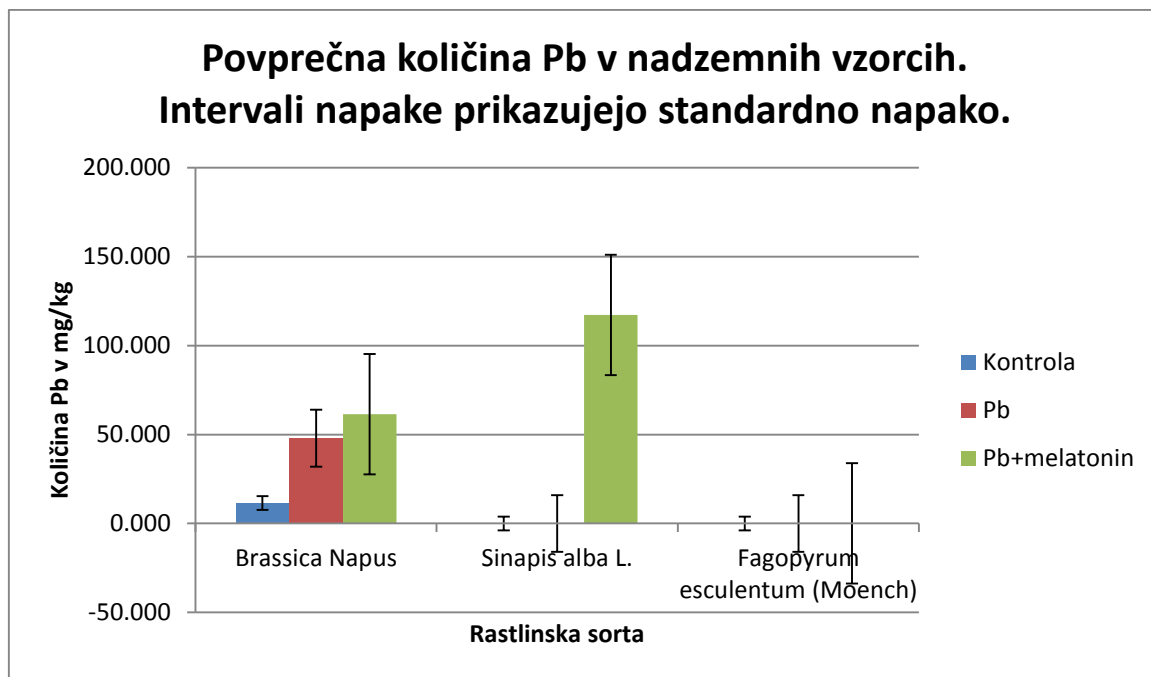


Figura 5: Graf prikazuje srednjo vrednost zaznane količine Pb v vzorcih nadzemnih delov vseh treh rastlinskih sort. Graf vsebuje tudi intervale napake, ki prikazujejo veliko standardno napako srednje vrednosti, zaradi majhnega vzorca.

Tabela 16: Standardni odklon, povprečje in CV (koeficient variacije) vrednosti zaznane količine Pb (v mg/kg) v talnih vzorcih vseh treh rastlinskih sort.

Talni vzorec	St. odkl. $\pm 9\%$	Povprečje $\pm 9\%$	CV
O-C	3.863	54.776	0.071
O-Pb	18.329	156.020	0.117
O-Pb-M	28.777	238.166	0.121
G-C	24.494	60.091	0.408
G-Pb	3.943	227.922	0.017
G-Pb-M	31.053	294.753	0.105
A-C	2.822	30.633	0.092
A-Pb	23.864	272.136	0.088
A-Pb-M	4.068	212.204	0.019

Tabela 17: Standardni odklon, povprečje in CV (koeficient variacije) vrednosti zaznane količine Pb (v mg/kg) v nadzemnih vzorcih vseh treh rastlinskih sort.

Nadzemni vzorec	St. odkl. $\pm 9\%$	Povprečje $\pm 9\%$	CV
A-C	0.000	0.000	0.000
A-Pb	0.000	0.000	0.000
A-Pb-M	0.000	0.000	0.000
O-C	4.175	11.514	0.363
O-Pb	24.377	47.929	0.509
O-Pb-M	8.974	61.515	0.146
G-C	0.000	0.000	0.000
G-Pb	0.000	0.000	0.000
G-Pb-M	62.977	117.240	0.537

Ponovno so bile vse izračunane CV vrednosti relativno majhne, torej je tudi tu stopnja variacije med meritvami različnih ponovitev majhna, kar poveča statistično moč med testiranjem hipoteze. Ponovno sem torej izbrala T-test kot način meritve statistične pomembnosti razlik med vzorci.

Enorepi T-test je bil uporabljen za testiranje ničelne hipoteze (ali rastline ob dodatku melatonina akumulirajo večjo količino Pb kot rastline brez dodatka melatonina) in za nadaljnje testiranje raziskovalne hipoteze.

Število prostostnih stopenj $(n_1+n_2)-2$; kjer je $n_1=3$ in $n_2=3$: 4

Kritična T-vrednost: 2.78 za 5% napako

Tabela 18: Izračunane T-vrednosti meritev Pb v talnih vzorcih med skupinama rastlin (Pb in Pb-M) iz dveh različnih pogojev. Tabela prikazuje tudi, ali je razlika med nizoma podatkov statistično pomembna ali ne.

Talni vzorec	Izračunana T-vrednost ²¹	Število prostostnih stopenj	Kritična T-vrednost za 5%	Pomembnost razlike
A-Pb A-Pb-M	3.50	4	2.78	Da
O-Pb O-Pb-M	3.40	4	2.78	Da
G-Pb G-Pb-M	3.02	4	2.78	Da

²¹ Glej prilogo 19

Tabela 19: Izračunane T-vrednosti meritev Pb v nadzemnih vzorcih med skupinama rastlin (Pb in Pb-M) iz dveh različnih pogojev. Tabela prikazuje tudi, ali je razlika med nizoma podatkov statistično pomembna ali ne.

Nadzemni vzorec	Izračunana T-vrednost ²²	Stopinje svobode	Kritična T-vrednost za 5%	Pomembnost razlike
A-Pb A-Pb-M	Identične vrednosti	4	2.78	Ne
O-Pb O-Pb-M	0.74	4	2.78	Ne
G-Pb G-Pb-M	2.63	4	2.78	Ne

²² Glej prilogo 19

3. Zaključek

Primerjava meritev sveže biomase skupine rastlin Pb-M in meritev kontrolne skupine podpira del hipoteze, ki pravi, da melatonin ne bo škodil rastlinam, ki so bile zalivane z njegovo raztopino. Kot je razvidno iz tabele številka 13, so razlike med meritvami sveže biomase med tema dvema skupinama nepomembne, le z izjemo teže rastlin pod pogoji O-C in O-Pb-M. Hipoteza, ki pravi, da raztopina melatonina ne zavira rastnega potenciala in ne povzroči vidne poškodbe na rastlini, je s tem le delno podprta (glej figure 17, 18 in 19, ter priloge 14, 15 in 16).

V meritvah sveže biomase med skupinama Pb in Pb-M v splošnem ni bilo statistično pomembnih razlik (izjema je le višina *F. esculentum* (Moench), kot je razvidno iz tabele 12). Ti rezultati ne podpirajo hipoteze, saj dodajanje svinca ni zaviralo rasti rastlin, ki niso bile dodatno zalivane tudi z raztopino melatonina. Pri omenjenih rastlinah prav tako ni bilo opazne škode (razvidno iz figur 17, 18 in 19, ter prilog 14, 15 in 16).

Rezultati, prikazani v figuri 4, podpirajo zastavljeno hipotezo, da bodo rastline, ki bodo od vsega začetka zalivane z raztopino melatonina, sposobne absorbirati večje količine svinca. Iz tal absorbirani svinec pa se je v veliki meri nabiral le v koreninskem sistemu, zato je bila njegova prisotnost večinoma zaznana v vzorcih prsti, medtem ko v višjih delih rastlin prisotnost svinca (skoraj) ni bila zaznana. Kontrolna skupina prav tako ni akumulirala večjih količin svinca. Raztopina melatonina pa je v splošnem močno pripomogla k ekstrakciji svinca, le z izjemo *F. esculentum* (Moench), pri kateri je bila absorpcija svinca večja pri rastlinah, ki so bile zalivane le z raztopino Pb, v primerjavi z rastlinami, ki so bile dodatno zalivane še z raztopino melatonina, in s kontrolno skupino.

Glede na rezultate celotne raziskave, se dodatek melatonina pri *F. esculentum* (Moench) in *S. alba* L. ne odraža v večji absorpciji svinca v višjih delih. Pri vzorcu *B. napus* L. (kot je razvidno iz figure 5) pa se kaže, da je bila absorpcija višja pri rastlinah, ki so bile zalivane z raztopino melatonina, za razliko od tistih, ki dodatka melatonina niso prejele (figura 5), kljub temu pa razlika statistično ni pomembna pri 5% napaki (tabela 19). Visoke vsebnosti svinca so bile zaznane v vzorcih prsti vseh treh vrst rastlin, zalivanih z dodatno raztopino melatonina, razlike so statistično pomembne pri 5% napaki (tabela 19). Ta razlika bi lahko pomenila, da so korenine, ki so bile vsebovane v vzorcih prsti, sposobne akumulirati večje količine svinca, ki so bile večinoma zaznane v primerkih zalivanih z melatoninom, manj pa v primerkih kontrolne skupine in skupin rastlin, zalivanih le s svinčevo raztopino.

Rezultati T-testa prikazujejo (tabela 18), da je med sposobnostjo absorbiranja svinca med skupinama Pb in Pb-M statistično pomembna razlika pri vseh vzorcih prsti, med zgornjimi deli rastlin pa te razlike ni bilo. Tako rezultati podpirajo raziskovalno hipotezo, ki pravi, da so večje količine svinca zaznane v rastlinah, katerim jim je bila dodana raztopina melatonina in svinca, v primerjavi s kontrolno skupino in rastlinami, zalivanimi le s svinčevo raztopino. Zadnja ugotovitev je podkrepljena tudi z opravljenim T-testom, ki prikazuje statistično pomembno razliko med izmerjenimi Pb vrednostmi med omenjenima skupinama (tabele od 3 do 8). Malo ali nič svinca ni bilo zaznanega v zgornjih delih rastlin (tabela 15), uporaba melatonina prav tako ni vplivala na kopičenje svinca v višjih delih rastlin, kar je razvidno tudi iz dejstva, da med vzorci rastlin v tem pogledu ni bilo statistično pomembnih razlik (tabela 19).

Poskus je potekal pod nadzorovanimi pogoji in s prstjo, ki ne more natančno predstavljati dejanskih razmer v Mežiški dolini, tako tudi pridobljeni rezultati povsem ne ustrezajo tamkajšnjim pogojem. Sposobnost rasti uporabljenih rastlin v sami Mežiški dolini torej ostaja neznana. Zanimivo bi bilo poskus ponoviti v prsti, ki jo najdemo v raziskovanem področju; tako tudi dodatek svinca ne bi bil potreben, saj ga prst v Mežiški dolini že vsebuje. S tem, ko bi se poskus ponovil na tleh, ki so potrebna fitoremediacije bi bili rezultati bolj reprezentativni in bi lahko pripomogli k nadaljnji uporabi metod in mehanizmov za rehabilitacijo prsti in okolja v Mežiški dolini.

Prvi del poskusa je bil izveden v domačem okolju, brez nekatere potrebne opreme, torej je bilo za izvedbo poskusa potrebno nekaj improvizacije. S shranjevanjem raztopin v kleti je bilo zagotovljeno, da so bile te shranjene v suhem in temnem prostoru (v primerjavi z bolj strokovnim shranjevanjem v specializiranih omarah). Rastline so bile prav tako zalivane z navadno škropilnico, tako da (kljub zelo pazljivemu delu) niso bile vedno zalite s točno 100mL vode, kot je bilo predvideno. Odsotnost potrebne znanstvene opreme in pogojev je treba upoštevati pri pregledovanju rezultatov. Kakršna koli aplikacija ali generalizacija rezultatov naj bo opravljena previdno, priporočen je tudi pregled prej opravljenih raziskav.

Dodatna ovira so lahko meritve zaznavnosti svinca v zgornjih delih *F. esculentum* (Moench), in nekaterih vzorcih *S. alba* L. (tabeli 8 in 7), kjer so bile vrednosti pod zaznavno mejo merilne naprave (<0.003 mg/kg), kar dokazuje, da merilna naprava Univerze v Ljubljani ni dovolj natančna, da bi zaznala manjšo količino svinca v zgornjih delih rastlin. Rezultati bi bilo lahko drugačni, če bi bilo možno uporabiti bolj natančno napravo za merjenje atomske absorpcijske spektroskopije, dostopno prek Javne agencije RS za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP).

4. Reference

Air quality guidelines for Europe. (2000). 2nd ed. Copenhagen, Denmark: WHO Regional Publications, pp.149-154.

Biobrazda.si, (n.d.). Biobrazda. [online] Dostopno preko: <http://www.biobrazda.si/> [Accessed 27 Sep. 2014].

Edsenga, D., Reese, M. and Richards, D. (n.d.). Advantages and Disadvantages. [online] Dostopno preko: <http://Cem.msu.edu/>, 'Advantages And Disadvantages'. Web. 8 Feb. 2015. [Accessed 8 Feb. 2015].

Evangelou, M., Kutschinski-Kl"oss, S., Ebel, M. and Schaeffer, A. (2007). Potential of *Borago officinalis*, *Sinapis alba* L. and *Phacelia boratus* for phytoextraction of Cd and Pb from soil. Water, air, and soil pollution, 182(1-4), pp.407--416.

Frost, J. (2011). Variability and Statistical Power | Minitab. [online] Blog.minitab.com. Dostopno preko: <http://blog.minitab.com/blog/adventures-in-statistics/variability-and-statistical-power> [Accessed 21 Dec. 2014].

Google.si, (2014). Google Maps. [online] Dostopno preko: <https://www.google.si/maps?source=tldsi&hl=sl> [Accessed 10 Dec. 2014].

Honda, M., Tamura, H., Kimura, T., Kinoshita, T., Mastsufuru, H. and Sasto, T. (2007). Control of Pb polluted leachate in a box-scale phytoremediation test using common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grown on Pb contaminated soil. Environmental technology, 28(4), pp.425--431.

ISO 11466(1995). Soil quality -- Extraction of trace elements soluble in aqua regia

ISO 11047(1998) Soil quality — Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, Pb, manganese, nickel and zinc — Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods

Ivartnik, M. and Pavlič, H. (n.d.). Sanacija onesnaženega okolja v Zgornji Mežiški dolini. [online] Sanacija-svinec.si. Dostopno preko: <http://www.sanacija-svinec.si/> [Accessed 16 Sep. 2014].

J. H. Traunfeld and D. L. Clement, "Pb in Garden Soils. Home and Garden," Maryland Cooperative Extension, University of Maryland, 2001, Dostopno preko: http://www.hgic.umd.edu/_media/documents/hg18.pdf.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. (1984). Trace elements in soils and plants. 1st ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press. P.315.

KUGONIČ, N., ZUPAN, M. Vsebnost Pb, Cd in Zn v tleh in nekaterih rastlinah v Zgornji Mežiški dolini. V: RIBARIČ-LASNIK, Cvetka (ur.), POKORNY, Boštjan (ur.), PAČNIK, Leopolda (ur.). Problem težkih kovin v Zgornji Mežiški dolini : zbornik referatov. Velenje: ERICo, Inštitut za ekološke raziskave, 1999, str. 66-78

Laaniste, P., Joudu, J., & Eremeev, V. (2004). Oil content of spring oilseed rape seeds according to fertilization. Agronomy Research, 2, 83–86.

- Mandal, A. (2012). Melatonin in Plants. [online] News-Medical.net. Dostopno preko: <http://www.news-medical.net/health/Melatonin-in-Plants.aspx> [Accessed 16 Sep. 2014].
- Ministry of Agriculture and the Environment, (2007). Opis avtohtonih in tradicionalnih sort kmetijskih rastlin. p.1.
- Moore, G. (1999). Living with the earth. 1st ed. Boca Raton, Fla.: Lewis Publishers.
- Park, J., Kim, J. and Kim, K. (2012). Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals using *Brassica napus*. *Geosystem Engineering*, 15(1), pp.10--18.
- Pfaf.org, (n.d.). *Sinapis alba* White Mustard PFAF Plant Database. [online] Dostopno preko: <http://www.pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Sinapis+alba> [Accessed 27 Sep. 2014].
- Pivetz, B. (2001). Ground Water Issue. 1st ed. [ebook] Ada, Oklahoma, pp.1-2, 14-16. Dostopno preko: <http://www.epa.gov/> [Accessed 16 Sep. 2014].
- RIBARIČ-LASNIK, C. (urednik), POKORNY, B. (urednik), PAČNIK, L. (urednik). Problem težkih kovin v Zgornji Mežiški dolini : zbornik referatov. Velenje: ERICo, Inštitut za ekološke raziskave, 1999. IV, 134 str., ilustr., tabele. ISBN 961-90729-1-X
- Sigmaaldrich.com, (2010). Pb(II) carbonate, ACS reagent | PbCO_3 | Sigma-Aldrich. [online] Dostopno preko: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/336378?lang=en®ion=SI> [Accessed 8 Jan. 2015].
- Super-nutrition.com, (n.d.). DHEA, 7 KETO, Melatonine, Pregnenolone - Melatonin 3 mg - Super-Nutrition. [online] Dostopno preko: <http://www.super-nutrition.com/en--Hormonal-supplementation--Melatonin-3-mg--H004> [Accessed 8 Jan. 2015].
- Tan, D., Manchester, L., Helton, P. and Reiter, R. (2007). Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signal Behav*, 2(6), pp.514--516.
- Turan, M. and Esringu, A. (2007). Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *Plant Soil and Environment*, 53(1), p.7.
- Wikipedia,(n.d.). Phytoremediation. [online] Dostopno preko: <http://en.wikipedia.org/wiki/Phytoremediation#Phytoextraction> [Accessed 28 Sep. 2014].
- Wikipedia,(n.d.). Rapeglejd. [online] Dostopno preko: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rapeglejd> [Accessed 27 Sep. 2014].

5. Priloge

Priloga 1 (Sigmaaldrich.com, 2010)

Tabela 20: Tabela s specifikacijami uporabljenega PbCO_3 .

Test	Specifikacija
Videz (barva)	Bela
Videz (oblika)	Prah
Infrardeč spektrum	Ustreza strukturi
Netopna snov	0.020 %
Kadmij (Cd)	0.002 %
Vsebnost klora	0.002 %
Železo (Fe)	0.005 %
Cink (Zn)	0.003 %
Natrij (Na)	0.050 %
Kalij (K)	0.020 %
Kalcij (Ca)	0.010 %
Ustreza ACS zahtevam	Trenutna ACS specifikacija

Specifikacija izdelka

Ime izdelka: Pb (II) karbonat ACS reagent

Številka izdelka: 336378

CAS številka: 598-63-0

MDL: MFCD00064631

Formula: CO_3Pb

Formula teže: 267.21 g/mol

Varnostna opozorila

Simboli:



GHS07, GHS08, GHS09

Priloga 2 (Super-nutrition.com, n.d.)

Dnevno odmerjanje: 1 Tableta

Število odmerkov v embalaži: 60

Količina melatonina v odmerku: 3 mg

Druge sestavine: mikrokristalna celuloza, stearinska kislina (E570), magnezijev stearat (E572), silikonov dioksid (E551).

Sintetični melatonin se proizvaja iz surovin farmacevtske kakovosti v laboratorijih GMP (dobre proizvodne prakse). Njegova molekularna zgradba in fiziološke aktivnosti so enake zgradbi in aktivnostim melatonina, ki ga telo naravno proizvaja. Čistost našega melatonina je več kot 99 %.

Priloga 3



Figura 6: Mlin za mletje suhih vzorcev korenin in nadzemnih delov rastlin (RETSC ZM100) uporabljen v pripravi vzorcev na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. (Hrobat, 2014)

Priloga 4



Figura 7: Mars mikrovalovna pečica uporabljena v pripravi vzorcev na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. (Hrobat, 2014)

Priloga 5



Figura 8: Atomski absorpcijski spectrophotometer (AAS Varian) uporabljen v pripravi vzorcev na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. (Hrobat, 2014)

Priloga 6



Figura 9: Uporabljena prst z biobrazda gnojilom. (Hrobat, 2014)

Priloga 7



Figura 10: Vseh 120 posajenih rastlin. Od leve proti desni: *S. alba* L., *B. napus* L. in *F. esculentum* (Moench). (Hrobat, 2014)

Priloga 8



Figura 11: Uporabljen *Fagopyrum esculentum* (Moench) semena. (Hrobat, 2014)

Priloga 9



Figura 12: Uporabljen *Brassica napus* L. var. *oleifera* semena. (Hrobat, 2014)

Priloga 10



Figura 13: Uporabljena *Sinapis alba* L. semena. (Hrobat, 2014)

Priloga 11

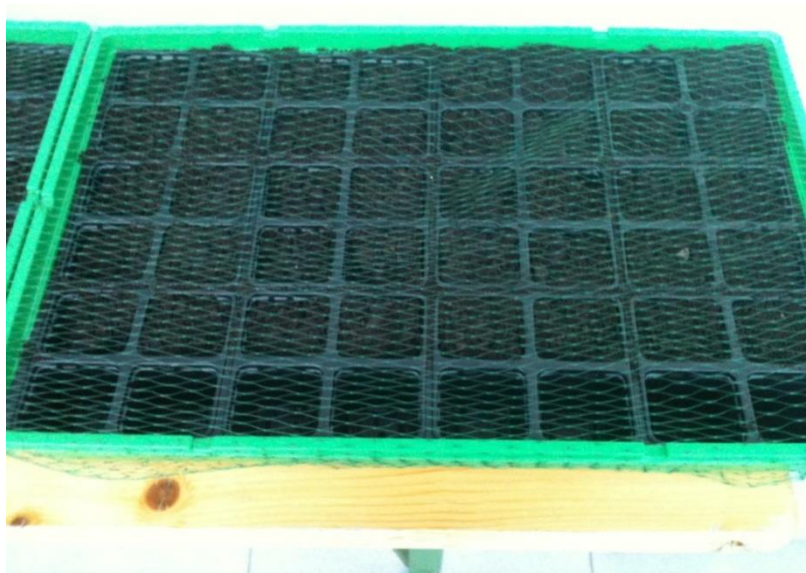


Figura 14: Razporeditev posajenih semen, pokritih z zaščitno mrežo. Prvi trije lončki iz leve predstavljajo rastline, ki so bile zalivane z raztopinama Pb in melatonina, drugi trije predstavljajo rastline, ki so bile zalivane z raztopino Pb in mineralno vodo brez CO₂, zadnja dva lončka predstavljata rastline kontrolne skupine, ki so bile zalivane z melatoninom in mineralno vodo brez CO₂. (Hrobat, 2014)

Priloga 12



Figura 15: Fotografija uporabljenih papirnatih vrečk, v katerih so shranjeni sveži nadzemni deli rastlin. Enake vrečke so bile uporabljene tudi za shranjevanje in sušenje talnih vzorcev. (Hrobat, 2014)

Priloga 13



Figura 16: Fotografija uporabljene BINDER vacuum sušilne peči za sušenje vzorcev. (Hrobat, 2014)

Priloga 14



Figura 17: Fotografija dokazuje odsotnost vidne škode in inhibirane rasti pri rastlinah sorte *S. abla* L.; iz leve proti desni prvi trije lončki predstavljajo G-Pb-M skupino, drugi trije G-Pb in zadnja dva lončka predstavljata kontrolno skupino rastlin (G-C). (Hrobat, 2014)

Priloga 15



Figura 18: Fotografija dokazuje odsotnost vidne škode in inhibirane rasti pri rastlinah sorte *B. napus* L.; iz leve proti desni prvi trije lončki predstavljajo O-Pb-M skupino, drugi trije O-Pb in zadnja dva lončka predstavljata kontrolno skupino rastlin (O-C). (Hrobat, 2014)

Priloga 16



Figura 19: Fotografija dokazuje odsotnost vidne škode in inhibirane rasti pri rastlinah sorte *F. esculentum* (Moench); iz leve proti desni prvi trije lončki predstavljajo A-Pb-M skupino, drugi trije A-Pb in zadnja dva lončka predstavljata kontrolno skupino rastlin (A-C). (Hrobat, 2014)

Priloga 17

Formula za izračun srednje vrednosti

$$\mu = \bar{x} = \frac{\sum x}{n};$$

$\sum x$ = seštevek vseh vrednosti

n = število vrednosti v nizu

Priloga 18

Formula za izračun standardnega odklona

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n}};$$

$$\sum = \text{seštevek}$$

x = posamezna vrednost v nizu

$\bar{x}$ = povprečje vseh vrednosti v nizu

n = število vrednosti v nizu

Priloga 19

T-test izračun

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Where

- $\bar{x}_1$ = povprečje vzorca 1
- $\bar{x}_2$ = povprečje vzorca 2
- n_1 = število meritev v vzorcu 1
- n_2 = število meritev v vzorcu 2
- s_1^2 = verjetnost distribucije vzorca 1 = $\frac{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2}{n_1}$
- s_2^2 = verjetnost distribucije vzorca 2 = $\frac{\sum(x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_2}$

Vse T-vrednosti so bile izračunane z uporabo TI-84 Plus Texas Instruments GDC.