

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nina IVANČIČ

**MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST TAL PRED IN
PO REMEDIACIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nina IVANČIČ

MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST TAL PRED IN PO REMEDIACIJI

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MICROBIOLOGICAL ACTIVITY BEFORE AND
AFTER REMEDIATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije.

Delo je bilo opravljeno na Katedri za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poizkus je bil izveden v kletnih prostorih, kemijske analize pa v laboratoriju Katedre za pedologijo in varstvo okolja.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Domen LEŠTAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marjetka SUHADOLC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nina IVANČIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 631.461:504.064 (043.2)
KG Onesnaženost tal/remediacija z EDTA/kakovost tal/mikrobiološka aktivnost/dehidrogenazna aktivnost/s substratom inducirano dihanje
AV IVANČIČ, Nina
SA LEŠTAN, Domen (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2016
IN MIKROBIOLOŠKA AKTIVNOST TAL PRED IN PO REMEDIACIJI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 41 str., 6 pregl., 11 sl., 76 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI S potencialno strupenimi kovinami (PSK) onesnažena tla lahko neposredno ogrožajo zdravje ljudi in so neprimerna za pridelavo hrane. Veliko območij rodovitnih tal je zaradi onesnaženosti postalo neuporabnih za kmetijsko rabo. Obstajajo različne tehnike remediacije tal, izbira tehnike pa je odvisna predvsem od nadaljnje namembnosti zemljine. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako se spreminja mikrobiološka aktivnost tal pred in po remediaciji s spiranjem z EDTA v kontroliranih razmerah. Očiščena tla smo izpostavili izvornim, močno onesnaženim tlom in z izbranimi biotskima kazalcema kakovosti tal (dehidrogenazna aktivnost in s substratom inducirano dihanje) spremljali spremembe po 1., 3. in 6. mesecu poskusa. Pri vseh meritvah so vrednosti DHA in SIR nekoliko višje v onesnaženih tleh, kar pomeni, da je na MA skozi celoten poskus bolj negativno vplivala EDTA kot visoka vsebnost PSK. Takoj po remediaciji je kelat EDTA manj negativno vplival na DHA, saj med onesnaženimi in remediiranimi tlemi ni statistično značilnih razlik, medtem ko se je vrednost SIR z remediacijo zmanjšala s statistično značilnimi razlikami. V izbranem časovnem obdobju se vrednosti DHA in SIR niso statistično značilno povečale, torej tako očiščena tla niso vzpostavila boljše mikrobiološke aktivnosti v primerjavi z močno onesnaženimi tlemi glede na dva izbrana biološka kazalca. Z remediacijo smo iz tal sicer zelo uspešno odstranili večino PSK in zmanjšali njihovo biološko dosegljivost vendar je uporabljen kelat EDTA negativno vplival na MA in tako sprana tla si niso učinkovito "opomogla" v smislu mikrobiološke aktivnosti, v šest mesečnem poskusu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 631.461:504.064 (043.2)

CX contaminated soil/remediation with EDTA soil washing/soil quality/microbiological activity/DHA/SIR

AU IVANČIČ, Nina

AA LEŠTAN, Domen (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2016

TI MICROBIOLOGICAL ACTIVITY BEFORE AND AFTER REMEDIATION

DT Graduation Thesis (University studies)

NO IX, 41 p., 6 tab., 11 fig., 76 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Soil that is contaminated with potentially toxic metals (PTMs) can pose a direct threat to human health and is unsuitable for food production. Many areas of otherwise fertile soil have become unusable for agricultural use due to contamination. There are various soil remediation techniques we can choose from. However, the appropriate choice of an individual technique depends on the future purpose of the soil. The purpose of this thesis was to find out how the microbiological activity has changed in the soil before and after remediation of the soil. The treated soil was washed with EDTA under controlled conditions. Remediated soil was then exposed to highly contaminated soil and analysed with the selected biotic indicators of soil quality (dehydrogenase activity and substrate induced respiration) in order to monitor changes between the soils during the period of one, three and six months. Throughout all stages of the experiment the measured values of the DHA and SIR were higher in the contaminated soil (in comparison to the remediated soil), which means that the EDTA had more negative effect on the MA than the high levels of the heavy metals. Immediately after the remediation a chelating agent EDTA had less negative impact on DHA with no statistically significant differences according to the contaminated soil, while the SIR value had slightly decreased with statistically significant differences. In the selected time period, the values of DHA and SIR did not significantly increase, meaning that the soil did not set up better microbiological activity compared to the heavily polluted soil. With the chosen remediation technology, we have successfully removed most of the PTMs from the soil and also decreased their biological availability but the used EDTA chelate caused negative impact on MA and the remediated soil did not effectively ‘recover’ in their microbiological activity, in the six month of the experiment.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE.....	IX
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA IZDELAVO.....	2
1.2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TLA	3
2.1.1 Funkcionalnost tal in ocena kakovosti tal	3
2.1.2 Mikrobiološka aktivnost tal.....	6
2.1.2.1 Dehidrogenazna aktivnost	7
2.1.2.2 S substratom inducirano dihanje v tleh	9
2.2 ONESNAŽENOST TAL.....	10
2.2.1 Težke kovine	11
2.2.1.1 Kadmij (Cd).....	11
2.2.1.2 Svinec (Pb)	11
2.2.1.3 Cink (Zn)	12
2.2.2 Zakonodaja	12
2.2.3 Frakcionacija in biološka dosegljivost PSK.....	13
2.2.4 Vpliv potencialno strupenih kovin (PSK) na tla.....	14
2.3 REMEDIACIJA ONESNAŽENIH TAL	15
2.3.1 Metoda spiranja tal s kelati.....	16
2.3.2 Toksičnost in posledice spiranja tal z EDTA	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 EKSPERIMENTALNI DEL	19
3.1.1 Lastnosti tal.....	19
3.1.2 Zasnova in postavitve poskusa	19
3.1.3 Potek poskusa	21
3.2 ANALITSKE METODE.....	22
3.2.1 Analiza tal	22
3.2.2 Vsebnost kovin.....	22
3.2.3 pH-vrednost	22

3.2.4	Določevanje biodosegljive frakcije tal z DTPA-ekstrakcijo	23
3.2.5	Biološki kazalci za določanje mikrobiološke aktivnosti tal	23
3.2.5.1	Dehidrogenazna aktivnost	23
3.2.5.2	S substratom inducirano dihanje v tleh	24
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	25
4	REZULTATI	26
4.1	LASTNOSTI ZEMLJINE	26
4.1.1	Skupne koncentracije kovin pred in po remediaciji	26
4.1.2	pH-vrednost	27
4.1.3	Potencialna biodosegljivost onesnažil za rastline, določena z ekstrakcijo DTPA	28
4.2	BIOLOŠKI KAZALCI MIKROBIOLOŠKE AKTIVNOSTI TAL.....	29
4.2.1	Dehidrogenazna aktivnost	29
4.2.2	S substratom inducirano dihanje	30
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	32
5.1	RAZPRAVA	32
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	35
7.1	CITIRANI VIRI	35
7.2	DRUGI VIRI	41
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Biološki kazalci za določanje kakovosti tal in standardne analitične metode (Arias in sod., 2005).	7
Preglednica 2: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za nekatere težke kovine v tleh (Uredba o mejnih ..., 1996).....	12
Preglednica 3: Standardne pedološke lastnosti neremediiranih tal (analize so predhodno opravili na Centru za pedologijo in varstvo okolja v pedološkem laboratoriju)	26
Preglednica 4: Skupne koncentracije svinca, cinka in kadmija, določene z zlatotopko v onesnaženih tleh (Ø), remediiranih tleh po spiranju z EDTA v koncentraciji 40 mmol/kg (R _{EDTA}) in v tleh po dodatnem spiranju z vodo (R ₀) v izpiralni tekočini (I). Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD ter z izračunom določena skupna koncentracija Pb, Zn in Cd v remediiranih tleh (R ₀).	27
Preglednica 5: Potencialna biološka dosegljivost kovin v tleh za rastline pred remediacijo (Ø) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R ₀) in po 1. (R ₁), 3. (R ₃) in 6. mesecu (R ₆) poskusa, rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD.	28
Preglednica 6: DHA na začetku in po 1., 3. in 6. mesecu poskusa v onesnaženih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Potencialni kazalci kakovosti tal (Suhadolc, 2013)	5
Slika 2: Posode s sistemom OxiTop® Control B6/B6M (WTW..., 2016).....	10
Slika 3: Tehnologije remediacije onesnaženih tal (Leštan, 2002).....	15
Slika 4: Strukturna formula EDTA (etilendiamintetraocetna kislina).....	17
Slika 5: Shema poskusa	20
Slika 6: Posoda z onesnaženimi tlemi in z 10 mrežastimi kolonami z remediiranimi tlemi	20
Slika 7: Med poskusom smo odstranjevali mrežaste kolone, analizirali remediirana tla in jih nadomestili s plastičnimi tulci.	21
Slika 8: Vrednost pH v tleh pred remediacijo (\emptyset) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R0) in po 1. (R1), 3. (R3) in 6. mesecu (R6) poskusa, rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.	27
Slika 9: Potencialna biodosegljivost kovin v kontrolnih tleh pred remediacijo (\emptyset) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R0), 1. mesecu (R1), 3. mesecih (R3) in 6. mesecih (R6) poskusa določena z DTPA ekstrakcijo. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.	28
Slika 10: DHA, izračunana kot koncentracija trifenil formazana (TPF) na začetku (\emptyset) in po prvem (1.), tretjem (3.) in šestem (6.) mesecu poskusa v neremediiranih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD.	30
Slika 11: S substratom inducirano dihanje (SIR), izmerjeno kot koncentracija nastalega CO ₂ na začetku (\emptyset), po prvem (1.), tretjem (3.) in šestem (6.) mesecu poskusa v neremediiranih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD.	31

OKRAJŠAVE

<u>Okrajšava</u>	<u>Pomen</u>
ATP	Adenozin trifosfat
Cd	kadmij
CO ₂	ogljikov dioksid
Cu	baker
DHA	dehidrogenazna aktivnost
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTPA	dietilentriamin pentaacetat
EDTA	etilendiamintetraoetna kislina
HCl	klorovodikova kislina
INF	jodonitrotetrazolijev formazan
INT	jodonitrotetrazolijev klorid
MA	mikrobiološka aktivnost
NaOH	natrijev hidroksid
O ₂	kisik
Pb	svinec
S/S	solidifikacija in stabilizacija
SIR	substrat-inducirana respiracija
TK	težke kovine
PSK	potencialno strupene kovine
PTMs	potentially toxic metals
TPF	trifenilformazan
TTC	trifeniltetrazolijev klorid
Zn	cink

1 UVOD

Tla so nenadomestljiv naravni vir, pedogeneza pa zelo počasen naravni proces. Hitra industrializacija, povečana urbanizacija, moderna agronomska praksa in uporaba neprimernih metod odlaganja odpadkov so tla močno degradirala oz. onesnažila. Onesnaženje tal, predvsem s potencialno strupenimi kovinami (PSK), je glavni okoljski problem, saj taka tla predstavljajo neposredno nevarnost za ljudi in so neprimerna za pridelavo hrane.

Onesnaženje tal s PSK je v Evropski Uniji in njenih sosednjih državah zelo razširjeno in čeprav območje ni točno določeno, je ocenjeno, da zavzema nekaj milijonov hektarov (Flathman in Lanza, 1998). V Sloveniji imamo tri glavna žarišča prekomernega onesnaženja s PSK predvsem zaradi izkoriščanja in taljenja rud. V Mežiški dolini so tla onesnažena s svincem, cinkom in kadmijem, v Idriji z živim srebrom, okolica Jesenic pa s svincem, nikljem in kromom. Žal je veliko področij sicer rodovitnih tal zaradi visokih koncentracij škodljivih snovi postalo neuporabnih za kmetijsko rabo.

Veliko študij je tako usmerjenih v razvoj učinkovitih, okolju prijaznih in cenovno dostopnih metod remediacije tal, ki je nujno potrebna operacija v postopku rehabilitacije tal. Izbira ustrezne remediacijske tehnike je odvisna od mnogih dejavnikov, v prvi vrsti pa od namembnosti onesnaženega okolja. V grobem ločimo dva načina, in sicer remediacija z odstranitvijo onesnažil ter remediacija s stabilizacijo le-teh. Solidifikacija in stabilizacija (S/S) onesnažil z dodajanjem aditivov v tla je uporabna metoda, kjer želimo zmanjšati mobilnost in posledično toksičnost onesnažil, tvori pa se monolitni material z bistveno zmanjšanim potencialnim vplivom na okolje (Batchelor, 2006; Baker in Bishop, 1997). Tako stabilizirana tla so uporabna predvsem za gradnjo infrastrukture. Vendar pa hitra rast števila prebivalstva in povpraševanje po hrani, naraščajoče potrebe po biogorivih in že uničene vrhnje plasti tal zaradi erozij zahtevajo povečano uporabo tal za kmetijsko proizvodnjo. Pri taki namembnosti tal se poslužujemo različnih metod remediacije. Kljub temu pa se potencialno strupenih kovin z nobeno tehniko ne da odstraniti v celoti. Cilj vsake metode je odstranitev biološke dosegljive in mobilne frakcije PSK, ki medsebojno vplivata na biološke cilje in predstavljata nevarnost za okolje in zdravje ljudi, ter poskus zmanjšanja skupne koncentracije kovin pod mejo, določeno z zakonodajo (Hamon in McLaughlin, 1999).

Večinoma se uporablja metoda spiranja tal s kelati (npr. etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), ki so fitotoksični in toksični za večino mikroorganizmov v tleh, zato je nadaljnja uporaba teh tal za pridelavo hrane vprašljiva. Večina študij o remediaciji tal z EDTA je osredotočena le na učinkovitost odstranjevanja potencialno strupenih kovin iz tal. O uspehu oz. neuspehu metode izpiranja tal odloča ostanek biološko dosegljivih PSK in sam učinek sanacije na lastnosti ter delovanje tal kot substrata za rastline in mikrobe (posledično celotno živalstvo tal) in primernost nadaljnje uporabe tal v kmetijske namene (Jelušič in sod., 2013).

Talni encimi so zelo občutljivi na prisotnost PSK in se zato lahko uporabljajo kot biološki kazalci kakovosti tal, onesnaženih s PSK (Alvarenga in sod., 2009). Za ocenjevanje biotske kakovosti tal se razvijajo metode, ki temeljijo na ocenah biomase, taksonomske in funkcionalne pestrosti, ter aktivnosti talnih organizmov v tleh, posebno mikroorganizmi so občutljiv in hitro odziven kazalec kakovosti tal (Suhadolc, 2013).

1.1 POVOD ZA IZDELAVO

Iskanje učinkovitejših in cenovno ugodnejših metod remediacije tal, ki so onesnažena s PSK, je že vrsto let glavni cilj Katedre za pedologijo in varstvo okolja Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vse več študij je usmerjenih v ugotavljanje in ocenjevanje posledic, ki jih ima izbrana metoda na kakovost in nadaljnjo uporabo tal z uporabo različnih kazalcev kakovosti tal.

V te raziskave se vključuje tudi ta diplomska naloga, ki ugotavlja spreminjanje funkcioniranja tal, določeno z dvema izbranimi biološkima kazalcema, pred in po remediaciji s spiranjem z EDTA v šestmesečnem poskusu v kontroliranih razmerah.

1.2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA

Namen diplomskega dela je na podlagi dveh izbranih bioloških kazalcev kakovosti tal ovrednotiti vpliv remediacije s spiranjem z EDTA na tla ter ovrednotiti spremembe v mikrobiološki aktivnosti v onesnaženih tleh ter v remediiranih tleh, ki smo jih za daljše časovno obdobje izpostavili izvornim onesnaženim tlom.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

- Izbrana tehnika remediacije tal s spiranjem z EDTA učinkovito zniža skupne koncentracije potencialno strupenih kovin ter zmanjša biološko dosegljivost (določena z DTPA) PSK v remediiranih tleh, ki se med staranjem tal ne bo bistveno spreminjala.
- Onesnaženost tal s PSK, kot spiranje tal z EDTA negativno vpliva na mikrobiološko aktivnost v tleh, določeno z izbranimi biološkima kazalcema.
- V izbranem časovnem obdobju z izbranimi biološkima kazalcema (dehidrogenazna aktivnost in s substratom inducirano dihanje) ovrednotiti kako se v remediiranih tleh spreminja mikrobiološka aktivnost v primerjavi z močno onesnaženimi tlemi v 6 mesečnem poskusu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TLA

"Tla so naravni vir, potreben za pridelavo hrane, industrijskih surovin in pridobivanje energetskih virov, pa tudi naravna vrednota, ki jo varujemo kot naravno dediščino. Kot naravni vir, naravna vrednota in kot nosilec prostora, so za obstoj in razvoj človeštva nenadomestljiva. Ohranitev naravnega vira tal pred fizičnim uničenjem in onesnaževanjem ter ohranitev ravnovesja med tlemi in ostalimi deli ekosistema je danes ena pomembnih aktivnosti v slovenskem prostoru" (ARSO, 2016).

Tla nastajajo s fizikalnim in kemičnim preperevanjem matične kamenine in organske snovi ob prisotnosti živih organizmov (Vidic, 1995). Na nastanek tal vplivajo klima, topografija prostora, vegetacija, sestava matične podlage ter prisotnost talnih organizmov (Leštan, 2002).

Tla kot prepereli del litosfere delujejo kot filter, ki z vodo omogoča sproščanje in vezavo snovi, ki je pomembna funkcija tako za naravne kot antropogene ekosisteme. Tla so pomemben življenjski prostor za organizme na površju in mikroorganizme v tleh. Množičnost rastlinskih in živalskih vrst na tleh in v njih ohranja biodiverzitetu, vključno z vidikom genske diverzitete.

Tla so naravni vir, ki nastaja počasi, zato je v človeškem merilu neobnovljiv. Primarna funkcija tal je ekološka, saj omogočajo rast vegetacije in s tem pretvorbo dela sončeve energije v biomaso. Ta vključuje pridelovanje hrane za ljudi, krme za živali, energijo, hranjeno v lesu in premogu, ter ohranjanje aerobne atmosfere.

Tla imajo tudi prostorsko funkcijo, saj nudijo prostor za bivanje, infrastrukturo, obrt, industrijo in rekreacijo.

Kulturna funkcija tal ima pomembno vlogo pri odkrivanju antropogenih arheoloških in naravnih ostankov (fosili), ki so temelj vedenja o razvoju planeta in življenja na njem (Zupan in sod., 2008).

2.1.1 Funkcionalnost tal in ocena kakovosti tal

V preteklosti so bila rodovitna tla pogoj za nastanek naselij. Z naselitvijo in kmetovanjem je človek dobil možnost za sociološko-kulturni in ekonomski razvoj. Z razvojem je tehnologija omogočala pridelavo večje količine pridelkov, po drugi strani pa prispevala k splošni degradaciji okolja in onesnaženju tal. Intenzivna gradnja naselij in druge infrastrukture je prispevala k zmanjševanju zemeljske površine in s tem k zmanjševanju možnega rodovitnega površinskega sloja tal. V svetovnem merilu degradacija tal in drugi antropogeni dejavniki, kot so kisli dež, erozija tal itd., zmanjšujejo kakovost in rodovitnost tal.

Tla so nujno potrebna tako za ravnotežje kot produktivnost v naravnih in agro-eko-sistemih. Stanje tal je predmet mnogih raziskav, ki s pedološkimi, fitocenološkimi, geomorfološkimi in ekološkimi metodami ter s spremljanjem kemijskih in fizikalnih lastnosti tal ter

modeliranjem talnih procesov prispevajo znanja, pomembna za vzdrževanje oziroma izboljšanje kakovosti tal (Zupan in sod., 2008).

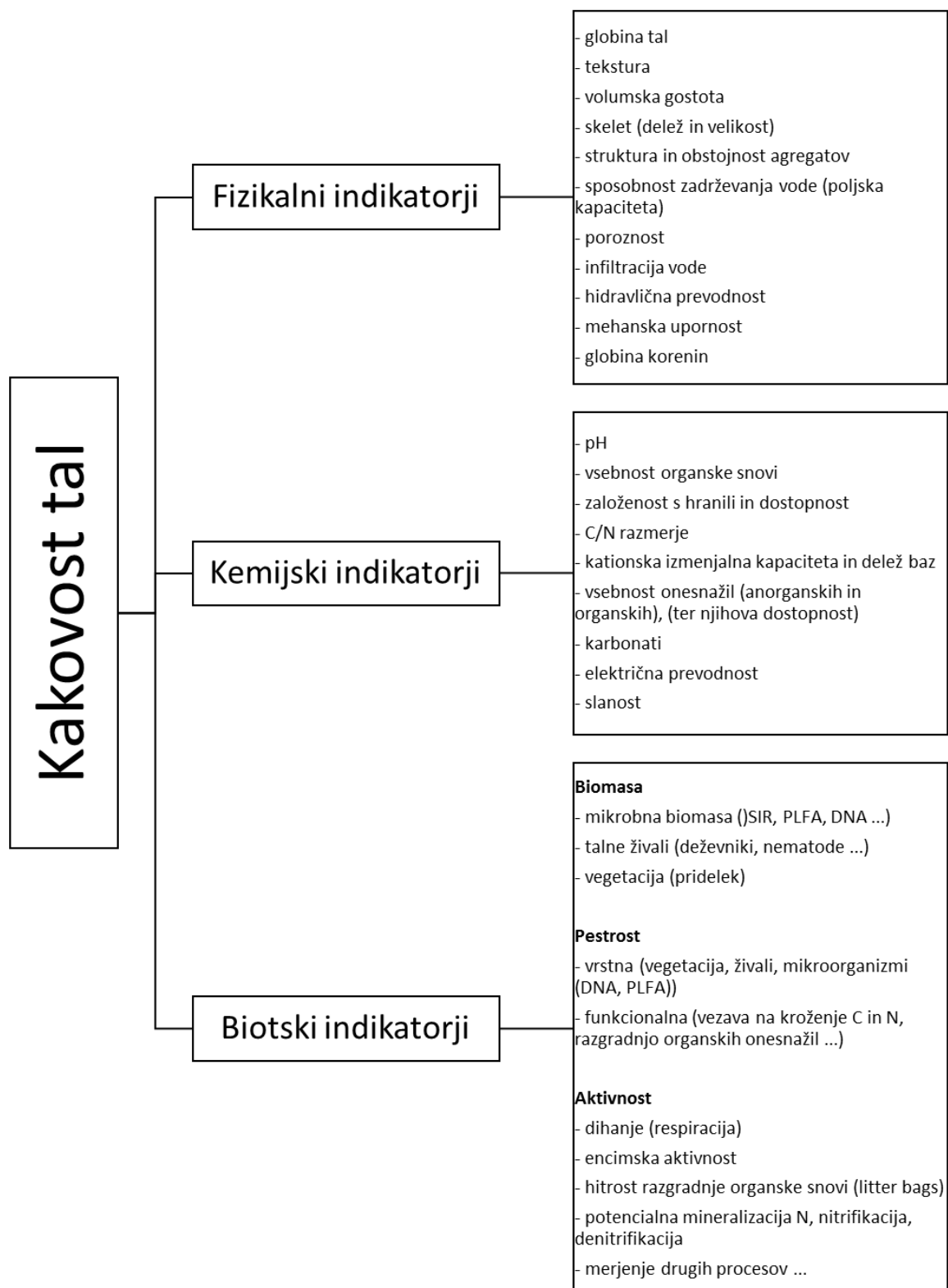
Tla imajo pomembno vlogo ne le pri proizvodnji živil in vlaknin, ampak tudi pri ohranjanju splošne kakovosti okolja, zato je ocena kakovosti tal še kako pomembna (Ridvan in sod., 2004). Konceptualno je kakovost tal opredeljena kot sposobnost tal za delovanje v določenem ekosistemu pri ohranjanju biološke produktivnosti, za ohranjanje kakovosti okolja ter za spodbujanje zdravega rasti in živali (Doran in Parkin, 1994).

Kakovost tal je celostna slika stanja specifičnih tal za določeno specifično uporabo oz. kakovost tal je zmogljivost tal za svoje delovanje (Pierce in Larson, 1993). Mausbach (1996) definira kakovost tal kot skupek vrste tal, njihove naravne sposobnosti delovanja, uporabe in upravljanja.

Funkcije tal so (Karlen in sod., 1997):

- ohranjanje biološke aktivnosti, raznolikosti in produktivnosti,
- porazdelitev talne vode in pretoka,
- filtriranje, vgrajevanje, degradacija, imobilizacija in detoksifikacija organskih in anorganskih snovi, vključno z industrijskimi in gospodinjskimi odpadki ter atmosferskimi depoziti,
- shranjevanje in kroženje hranil in drugih elementov v biosferi Zemlje,
- zagotavljanje podpore socialno-ekonomski strukturi in zaščite arheoloških najdb v okviru človeškega habitata.

Kakovost tal je torej odvisna od kombinacije fizikalnih, kemijskih in biotskih lastnosti tal. Zaradi kompleksnosti talnega ekosistema je izbira kazalcev za določitev kakovosti tal zahtevna. Vključevanje bioloških kazalcev za ocenjevanje kakovosti tal je bistvenega pomena, saj so vsi procesi v veliki meri odvisni od talnih organizmov. V večini se uporabljajo izbrani fizikalno-kemijski kazalci, ki jih je lažje določiti, interpretirati in so manj občutljivi na spremembe kar je pa lahko tudi omejujoč dejavnik, saj je potrebno morebitno poslabšanje kakovosti tal zaznati čim hitreje. Večja občutljivost in hitrejša odzivnost bioloških kazalcev (posebno mikroorganizmov) na spremembe je zato prednost. Obstajajo različni predlogi minimalnega seta kazalcev kakovosti tal, ki vključujejo kombinacijo vseh treh komponent kakovosti (fizikalno-kemijskih in biotskih lastnosti tal). Nabor fizikalno-kemijskih kazalcev je relativno konstanten. Medtem, ko je izbor biotskih kazalcev bistveno bolj težaven (slika 1) (Suhadolc, 2013).



Slika 1: Potencialni kazalci kakovosti tal (Suhadolc, 2013)

Biološke lastnosti tal predstavljajo pomemben vidik kakovosti tal. Mikroorganizmi imajo preko razgradnje organskih snovi in kroženja hranil bistveno vlogo pri rodovitnosti tal in primarni produkciji, zato je ocena biološke aktivnosti tal ključna v okviru splošne funkcije sistema. Tla vsebujejo veliko različnih mikrobnih populacij z vrsto različnih presnovnih procesov, med katerimi so bile nekatere uporabljene tudi za gospodarske namene (npr. proizvodnja antibiotikov) (Ridvan in sod., 2004).

2.1.2 Mikrobiološka aktivnost tal

MA označuje širok spekter dejavnosti, ki jih izvajajo mikroorganizmi v tleh in skupaj s celotno biološko aktivnostjo tal je pomembna za delovanje tal kot ekosistema (Nannipieri in sod., 2003).

Talni organizmi aktivno sodelujejo v številnih procesih v tleh (Suhadolc, 2013):

- pri nastajanju strukturnih agregatov,
- kroženju ogljika in nastanku humusa,
- kroženju hranil,
- razgradnji onesnažil

Na aktivnost mikroorganizmov v tleh vplivajo posamezni fizikalno-kemijski dejavniki (npr. pH, organska snov, vsebnost gline in struktura tal, stabilnost agregatov), biološki dejavniki (npr. pozitivne in negativne interakcije med organizmi) in onesnažila (npr. težke kovine, ksenobiotiki) (Ridvan in sod., 2004).

Mikrobiološko aktivnost lahko določimo na dva načina:

1) Poskusi *in situ* (na terenu) zahtevajo daljše obdobje inkubacije, preden se lahko zaznajo spremembe v koncentraciji produkta. Pri tem je nemogoče izključiti vse dejavnike okolja, ki lahko vplivajo na končni rezultat, končne meritve pa je zaradi številnih interakcij rastlin in drugih organizmov, ki variirajo glede na ekosistem in letni čas, pogosto težko interpretirati.

2) Poskusi *ex situ* (v laboratoriju) se običajno izvajajo bistveno krajši čas s presejanimi vzorci pri standardizirani temperaturi, vsebnosti vode in pH-vrednosti. Take meritve MA vključujejo encimske teste, ki katalizirajo za substrat značilne transformacije, ki so lahko v pomoč pri določitvi primernosti za upravljanje tal, rabo zemljišč in posebnih okoljskih razmer (Joergensen in Emmerling, 2006). Laboratorijske metode imajo prednost, saj se izvajajo pri standardnih razmerah in izključujejo okoljske dejavnike, kar omogoča primerljivost končnih rezultatov iz različnih geografskih lokacij in okoljskih razmer ter tudi rezultatov iz različnih laboratorijev. Pogosto se uporabljajo za pridobivanje podatkov o funkcionalnih skupinah. Laboratorijski rezultati se nanašajo na mikrobiološko sposobnost, ki je določena v optimalnih razmerah – dejavniki, kot so temperatura, razpoložljivost vode in/ali substrata (Schloter in sod., 2003).

Mikroorganizmi imajo ključno vlogo pri razgradnji organske snovi in pri kroženju hranil in s tem močno vplivajo na rodovitnost tal. Z izbranim naborom encimskih testov, odzivnih

na različne pogoje v tleh (vlaga, temperatura, organska snov in PSK) lahko posredno izmerimo biološko aktivnost tal (Jelušič, 2014). Zaradi prepletenosti funkcij, ki jih imajo mikroorganizmi v tleh je nemogoče določiti idealen kazalec za določanje kakovosti tal. V nacionalnih in mednarodnih programih za spremljanje kakovosti tal se trenutno uporablja predvsem metoda za določanje mikrobne biomase, respiratorne aktivnosti, preučevanje mineralizacije dušika, mikrobne raznolikosti in določanje funkcionalne pestrosti mikrobnih združb (Schloter in sod., 2003).

Obstaja veliko metod za preučevanje mikroorganizmov in njihovih aktivnosti na ravni mikrohabitata. Nekatero mikrobiološke lastnosti tal, kot so encimska aktivnost, dehidrogenazna aktivnost in mikrobna biomasa, se uporabljajo kot biološki kazalci za določanje kakovosti tal v okolijskih monitoringih tal (preglednica 1) (Schloter in sod., 2003).

Preglednica 1: Biološki kazalci za določanje kakovosti tal in standardne analitične metode (Arias in sod., 2005).

Biološki kazalec	Metoda
Mikrobna biomasa	<ul style="list-style-type: none"> • direktno štetje pod mikroskopom • fumigacija (kloroform) • SIR • nastajanje CO₂ • mikrobni kvocient • štetje bakterijskih / glivnih kolonij na gojiščih • PLFA
Mikrobiološka aktivnost	<ul style="list-style-type: none"> • sinteza bakterijske DNA • sinteza bakterijskega proteina • nastajanje CO₂
<ul style="list-style-type: none"> • Kroženje ogljika 	<ul style="list-style-type: none"> • dihanje v tleh • metabolični kvocient (qCO₂) • razgradnja organske snovi • encimska aktivnost v tleh
<ul style="list-style-type: none"> • Kroženje dušika 	<ul style="list-style-type: none"> • mineralizacija dušika • nitrifikacija • denitrifikacija • fiksacija N
Biodiverziteta in mikrobiološka prožnost	<ul style="list-style-type: none"> • direktno štetje • selektivna izolacija • vzorci izkoriščanja dušika in ogljika • vzorci ekstracelularnih encimov • PLFA
Biološka dosegljivost onesnažil	<ul style="list-style-type: none"> • bakterije, ki vsebujejo plazmid • bakterije odporne na antibiotik

2.1.2.1 Dehidrogenazna aktivnost

Dehidrogenazna aktivnost (DHA, *ang. Dehydrogenase activity*) se pogosto uporablja pri določanju metabolne aktivnosti talnih mikroorganizmov (Oliveira in Pampulha, 2006). Ker

dehidrogenaze niso ekstracelularno aktivne, je DHA uporabna kot kazalec splošne talne mikrobne aktivnosti in oksidacije organske snovi (Thalman, 1968).

Mikrobna oksidacija organske snovi v aerobnih razmerah je vezana na membransko verigo prenašalcev elektronov, pri katerih je zadnji akceptor kisik. Sistem transporta elektronov je povezan s sintezo ATP, t. i. oksidativna fosforilacija. Ugotovili so, da lahko z merjenjem aktivnosti enega ali več encimov vzdolž dihalne verige ocenijo skupno oksidativno dejavnost v celici. Že v 30. letih so na podlagi meritev dehidrogenazne aktivnosti pričeli posredno meriti skupno mikrobno aktivnost v tleh (Thalman, 1968). V splošnem se dehidrogenazno aktivnost tal določa z uporabo dodanega alternativnega akceptorja elektronov (Natividad in sod., 1998). Najbolj razširjena metoda za določanje dehidrogenazne aktivnosti je 'TTC-metoda'. Pri tej metodi se kot akceptor elektronov uporablja vodotopen trifeniltetrazolijev klorid (TTC), ki se reducira v trifenil formazan (TPF), ki se ga nato izmeri kolorimetrično. Skoraj vsi organizmi so sposobni reducirati TTC v TPF. TTC-metoda temelji na določitvi redukcije TTC do TPF po inkubaciji tal pri 30 °C v 24 h. Pri drugi metodi (INT-metoda) se kot akceptor elektronov uporablja jodonitrotetrazolijev klorid (INT), produkt reakcije pa je jodonitrotetrazolijev formazan (INF), ki se ga določi kolorimetrično po inkubaciji tal pri 40 °C v 2 h.

Omenjajo se tudi pomanjkljivosti uporabe teh spojin. TTC je strupen za mikroorganizme, ima nizko reaktivnost, ki zahteva dolge inkubacijske čase, prav tako ga različni mikroorganizmi reducirajo v različnih razmerjih. Poleg tega redukcija TTC inhibira porabo kisika in le majhen odstotek prenesenih elektronov se lahko dejansko izmeri (evidentira). Po drugi strani pa je produkt TPF težko ekstrahirati. Pri uporabi INT se delno izognemo tem pomanjkljivostim, saj redukcija poteka hitreje, poraba kisika pa se manj inhibira. INT je manj toksičen za mikroorganizme, vendar tudi manj topen, njegova redukcija pa je bolj odvisna od sestave tal. Poleg tega je za ekstrakcijo teh formazanov potrebna uporaba toksičnih organskih topil (Natividad in sod., 1998).

2.1.2.2 S substratom inducirano dihanje v tleh

Žive celice potrebujejo stalni dotok energije, ki za heterotrofne organizme izvira iz razgradnje organske snovi (celuloza, proteini, nukleotidi in humusne snovi). Reakcije, pri katerih se sprošča energija, so redoks reakcije, ki temeljijo na prenosu elektronov od donorja k akceptorju. Dihanje je oksidacija organske snovi s strani aerobnih mikroorganizmov, pri katerem je kisik (O_2) končni akceptor elektronov. V aerobnih razmerah so večinski produkti mikrobne respiracijske presnove organskega ogljika (C), ogljikovega dioksida (CO_2), vode (H_2O) in novo nastale biomase. Produkcija CO_2 ali poraba O_2 je lahko mera za hitrost respiracije oz. metabolno aktivnost mikroorganizmov v tleh (Alef, 1995; Nannipieri in sod., 1990).

Pri ponovnem navlaženju že posušenih tal, ki vsebujejo vir ogljika, se začne sproščati tudi CO_2 , zato je v tem primeru smotrno meriti porabo O_2 (Anderson, 1982; Kieft in sod., 1987). Respiracija pa ni odvisna samo od mikroorganizmov v tleh, ampak tudi od ostalih faktorjev, kot so vlaga, temperatura, dosegljivost hranil, struktura tal.

Metodo inducirane dihanja v tleh (SIR, *angl. substrate induced respiration*), s pomočjo katere se določi ogljik v mikrobni biomasi v talnih vzorcih, sta razvila Anderson in Domsch (1978). Odkrila sta, da bakterijska respiracija po dodatku dostopnega substrata že po nekaj minutah doseže maksimalno aktivnost. Količina CO_2/h je konstantna, od 6 do 8 ur po dodatku substrata, količina CO_2 pa začne zaradi nastanka nove biomase naraščati (Stopar in sod., 2009). Kot substrat se lahko uporabi glukoza, asparagin, škrob idr., začetna hitrost po dodatku v vzorec je merilo za skupno mikrobno biomaso tal na določenem substratu. Metoda ne daje absolutnih vrednosti za biomaso, rezultate pa lahko uporabimo za primerjave.

Predpostavke, na katerih temelji SIR-metoda (Stopar in sod., 2009):

- SIR-odziv različnih mikroorganizmov je konstanten,
- po dodatku substrata začne večina talnih mikroorganizmov z respiracijo in se odziva v času merjenja,
- glukoza je primeren substrat, ki inducira maksimalni odziv,
- delež mikroorganizmov, ki ne metabolizirajo glukoze, je zanemarljiv,
- pred dodatkom substrata je večina mikroorganizmov v fazi mirovanja oziroma v stacionarni fazi.

SIR-metodo se lahko izvaja z enostavnimi tehnikami, kot je inkubacija zemlje v posodah (JAR) (Isermeyer, 1952), v zaprtih petrijevkah (Pochon in Tardieux, 1962) ali v različnih tipih bučk.

CO_2 , ki nastaja zaradi respiracije talnih mikroorganizmov, absorbiramo v natrijevem hidroksidu (NaOH) in ga določimo s titracijo s klorovodikovo kislino (HCl) in indikatorjem preskoka pH. Ostale metode določanja CO_2 so osnovane na električni prevodnosti raztopine NaOH, z uporabo plinske kromatografije ali infrardeče spektroskopije.

Pri našem poskusu smo uporabili manometrično metodo s steklenimi posodami na katerih je nameščen sistem OxiTop® Control B6/B6M, ki meri razliko tlaka (podtlak) zaradi mikrobne porabe kisika in nastanka CO₂ (slika 2).



Slika 2: Posode s sistemom OxiTop® Control B6/B6M (WTW..., 2016)

2.2 ONESNAŽENOST TAL

Nekateri kemijski elementi in spojine so naravni del tal in posledica pedogenetskih procesov, vendar se kemizacija okolja zaradi človekove dejavnosti odraža v večji pestrosti in kemikalijah v tleh (Leštan, 2002). Tla so onesnažena, ko vsebujejo toliko onesnažil, da je zmanjšana njihova očiščevalna sposobnost (Alloway, 1990). Onesnažila v tleh v grobem delimo na organske in anorganske polutante. V tleh so kovine različnih kemijskih oblik in z različnim fizikalnim in kemičnim delovanjem v smislu kemijskih interakcij, mobilnosti, biološke dosegljivosti in potencialne toksičnosti (Leštan in sod., 2008).

Med organska onesnažila štejemo (Leštan, 2002):

- organokovinske spojine,
- goriva,
- sintetične polimere,
- poliaromatske ogljikovodike (PAH),
- pesticide,
- težko razgradljiva organska onesnažila (POP),
- razstreliva.

Med anorganska onesnažila štejemo:

- težke kovine (Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, Hg, Cr idr.),
- radionuklide,
- ostale anorganske snovi, kot so nekovine (As, Se, azbest).

2.2.1 Težke kovine

Težke kovine so elementi, katerih gostota ne presega 5 g/cm^3 , njihova atomska masa pa je med 63,546 in 200,590 g/mol. Naravna vsebnost TK (težkih kovin) v tleh je odvisna predvsem od matične podlage. V splošnem je njihova vsebnost večja v kamninah vulkanskega izvora kot v kamninah sedimentnega izvora (Leštan, 2002). TK večinoma ostanejo v tleh ter niso mobilne in razgradljive (Adriano, 2001).

Težke kovine predstavljajo zaradi svoje vedno večje prisotnosti, strupenosti pri relativno nizkih koncentracijah in kemijskih lastnosti, ki omejujejo učinkovitost remediacijskih tehnik, med vsemi onesnažili v tleh največji problem. Izpusti TK v okolje ogrožajo kakovost tal, zdravje ljudi in pitno vodo (Alpaslan in Yukselen, 2002).

2.2.1.1 Kadmij (Cd)

Kadmij je v tleh naravno redko prisoten, skoncentriranega ga najdemo v glini (seskvioksidi), kot kadmijev sulfid (CdS) ali kadmijev karbonat (CdCO_3) pa na depozitih skrilavcev. Običajno je vezan s cinkom (Zn), svincem (Pb) ali bakrom (Cu) v sulfidno obliko.

Onesnaženost tal s kadmijem je največkrat posledica atmosferskih depozitov iz talilnic rude in izgorevanja fosilnih goriv. V kmetijskih tleh so viri kadmija fosfatna gnojila ter organsko gnojenje s komposti in blatom čistilnih naprav.

Kadmij je mobilan pri nižjem pH, in sicer med 4,5 in 5,5, ko iz trdne faze tal preide v talno raztopino. Tako dostopen je rastlinam ali pa pride do njegovega izpiranja v podtalnico. Pri pH nad 7,5 se mobilnost zniža, nastale hidroksilne oblike pa so najmanj topne pri pH 11. Njegova dvovalentna oblika je mobilna, lahko pa tvori tudi organske komplekse in okside (Mulligan in sod., 2001).

2.2.1.2 Svinec (Pb)

Svinec se nahaja predvsem v vrhnjih slojih tal v čistih mineralnih oblikah kot svinčev sulfid (PbS), svinčev karbonat (PbCO_3), svinčev sulfat (PbSO_4) in kroatit (PbCrO_4).

Vir onesnaženosti tal s svincem so depoziti Pb-Zn, streliv, snovi za spajkanje, stekla, cevi, insekticidov, barv in baterij. Kmetijska tla so onesnažena s svincem zaradi organskega gnojenja s komposti in blatom čistilnih naprav.

Najpogosteje se pojavlja v dvovalentni obliki, zaradi antagonizma v rastlinah pa lahko zamenja kalcij, stroncij, barij in kalij. V tleh je slabo mobilan, v talni raztopini pa ga je običajno zelo malo (Mulligan in sod., 2001). Mobilnost svinca se zniža pri višjih vrednostih

pH, predvsem v razponu med 9 in 11, ko Pb preide v netopno obliko $\text{Pb}(\text{OH})_2$ (Paria in Yuet, 2006; Li in sod., 2001).

2.2.1.3 Cink (Zn)

Cink se v tleh pojavlja večinoma kot cinkov klorid (ZnCl), cinkov oksid (ZnO), cinkov sulfid (ZnS) in cinkov sulfat (ZnSO_4). Vsebnost cinka v tleh določajo tekstura tal, pH, vrsta kamnine matične podlage in vsebnost organske snovi.

Cink, vezan v trdno fazo tal na glinene delce, organsko snov ter seskvioksido, je nemobilen, njegovo dosegljivost za rastline pa znižujejo tudi antagonisti kalcij, kadmij, železo in nikelj. Pri nižjem pH pa se njegova dosegljivost v dvovalentni obliki poveča. Cink hidrolizira pri pH 7–7,5, hidroksilne oblike pa nastajajo pri pH nad 8, pri čemer se zmanjša njegova mobilnost (Mulligan in sod., 2001).

2.2.2 Zakonodaja

Zaradi toksičnosti težkih kovin so številne države omejile pridelavo hrane na onesnaženih območjih in določile meje dovoljenega letnega vnosa komposti in blata čistilnih naprav na obdelovalna zemljišča. V Sloveniji obravnava organska in anorganska onesnažila v tleh Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (Uredba o mejnih ..., 1996). Mejne, opozorilne in kritične vrednosti za težke kovine so navedene v preglednici 2.

Preglednica 2: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za nekatere težke kovine v tleh (Uredba o mejnih ..., 1996)

Nevarna snov	Mejna vrednost (mg/kg suhih tal)	Opozorilna vrednost (mg/kg suhih tal)	Kritična vrednost (mg/kg suhih tal)
Cd	1	2	12
Cu	60	100	300
Ni	50	70	210
Pb	85	100	530
Zn	200	300	20
Cr	100	150	380
Cr6+			25
Hg	0,8	2	10
Co	20	50	240
Mo	10	40	200

2.2.3 Frakcionacija in biološka dosegljivost PSK

Biološka dosegljivost je opredeljena kot delež celotnega onesnažila v tleh ali sedimentu, ki je takoj razpoložljiv organizmu, oz. potencial za sprejetje kemikalij iz hrane ali okolice in vključitev v metabolizem (Navarro in sod., 2006).

Biološka dosegljivost in s tem dejanska toksičnost TK v tleh je odvisna od mineralne oblike, v kateri se nahaja v tleh, velikosti delcev in strukturne vezave z drugimi minerali, glino in organsko snovjo tal (Leštan, 2002).

Biološko dosegljivi frakciji TK v tleh sta:

- ioni, raztopljeni v talni raztopini,
- ioni kovin, ki so izmenljivo absorbirani na površini talnih koloidov.

Biološko nedosegljive frakcije so:

- kovine, ki so koordinativno vezane na železove in manganove okside,
- kovine, izoborjene kot karbonati, sulfati in fosfati,
- kovine, vezane na netopno organsko snov tal,
- kovine, ki so vključene v kristalne rešetke glinenih materialov.

Z metodo sekvenčnih ekstrakcij določimo deleže PSK v posameznih frakcijah tako, da z reagenti, ki imajo različne kemijske lastnosti, spremenimo razmere v tleh in s tem omogočimo ekstrakcijo kovin iz različnih talnih frakcij (Leštan, 2002).

Biološka dosegljivost kovin je odvisna od porazdelitve PSK med trdno fazo tal in talno raztopino. Prehajanje kovin iz ene frakcije v drugo pa poteka pod vplivom kationske izmenjave, preperevanja mineralov, tvorjenja kompleksov, izpiranja, adsorpcije in desorpcije na organsko-mineralne koloide, biološke mobilizacije in imobilizacije. Potek reakcij je odvisen od prevladujočih fizikalno-kemijskih razmer v tleh (pH, prezračenost, redoks potencial, zasičenost z vodo) in lastnosti tal (tekstura tal, vsebnost organske snovi, vsebnost in tip glinenih mineralov, vsebnost Fe, Al in Mn oksidov) (Rieuwerts in sod., 1998).

Od vsega naštetega je odvisna biološka dosegljivost in posledično vstop PSK kovin v prehranjevalno verigo ter dejanska toksičnost TK (Plavc, 2007).

Splošno priznано je, da je pH najpomembnejši parameter tal za izmenjavo Pb, Zn in ostalih kovin med talno raztopino in trdno fazo tal zaradi tekmovanja PSK za adsorpcijska mesta na talnih koloidih s H⁺ ioni v kislih tleh (Janssen in sod., 1997). Topnost kovin se poveča pri manjših pH vrednostih in zmanjša pri večjih pH vrednostih. Prisotnost glinenih mineralov, Fe in Mn oksidov povečuje adsorpcijo kovin in s tem zmanjšajo njihovo topnost, medtem ko je učinek organske snovi in redoks potenciala bolj nejasen. Tudi drugi dejavniki, kot so kationska izmenjevalna kapaciteta, mikrobna aktivnost in temperatura tal lahko vplivajo na

biološko dosegljivost kovin, vendar v manjšem obsegu v primerjavi s vplivom pH vrednosti in ostalih talnih lastnosti (Rieuwerts in sod., 1998).

Delež biološko dosegljivih PSK lahko spremenimo s spremembo pH v tleh, dodajanjem organske snovi ter drugih snovi kot so organske kisline (citronska, očetna in jabolčna kislina) in ligandi. S spiranjem tal bistveno zmanjšamo biodosegljivost kovin, v tleh pa pustimo preostanek kovin v nedosegljivih oblikah, ki ne predstavljajo tveganja za okolje in organizme. Spremembo potencialne biološke dosegljivosti PSK za rastline smo v diplomski nalogi ovrednotili z ekstrakcijo z dietilentriamin pentaacetatom (DTPA).

2.2.4 Vpliv potencialno strupenih kovin (PSK) na tla

V zadnjih desetletjih se zaradi različnih antropogenih virov, kot so industrijski odpadki, avtomobilске emisije, rudarske dejavnosti in kmetijske prakse (odpadno blato, gnojila in pesticidi) nenehno povečuje vnos PSK v okolje (Oliveira in Pampulha, 2006). Uporaba površin za kmetijsko pridelavo z nizko do srednjo stopnjo onesnaženosti s PSK je zaradi posledic za zdravje ljudi in kakovost tal zaskrbljujoča. Preko rastlin oziroma prehranjevalne verige vstopajo PSK v organizme in ogrožajo njihovo zdravje.

Vpliv potencialno strupenih kovin v tleh (Plavc, 2007):

- zavirajo rast,
- ovirajo delovanje encimov in različnih metabolnih poti,
- vplivajo na respiracijo in vsebnost koencima ATP,
- zmanjšajo aktivnost fotosinteznega aparata,
- povzročijo oksidativni stres in pojav kloroz,
- lahko porušijo razmerje sprejema nujno potrebnih/esencialnih elementov v rastlino

Številne laboratorijske in terenske študije poročajo o učinkih PSK na talne mikroorganizme. Mikrobiološka aktivnost tal ter endocelularni in ekstracelularni encimi kažejo precejšnje spremembe, povezane z onesnaženostjo tal s PSK (Oliveira in Pampulha, 2006; Dahlin in sod., 1997). Toksičnost PSK se kaže v inaktivaciji encimov, blokiranju funkcionalnih skupin biološko pomembnih molekul in poškodbah membran (Leštan, 2002).

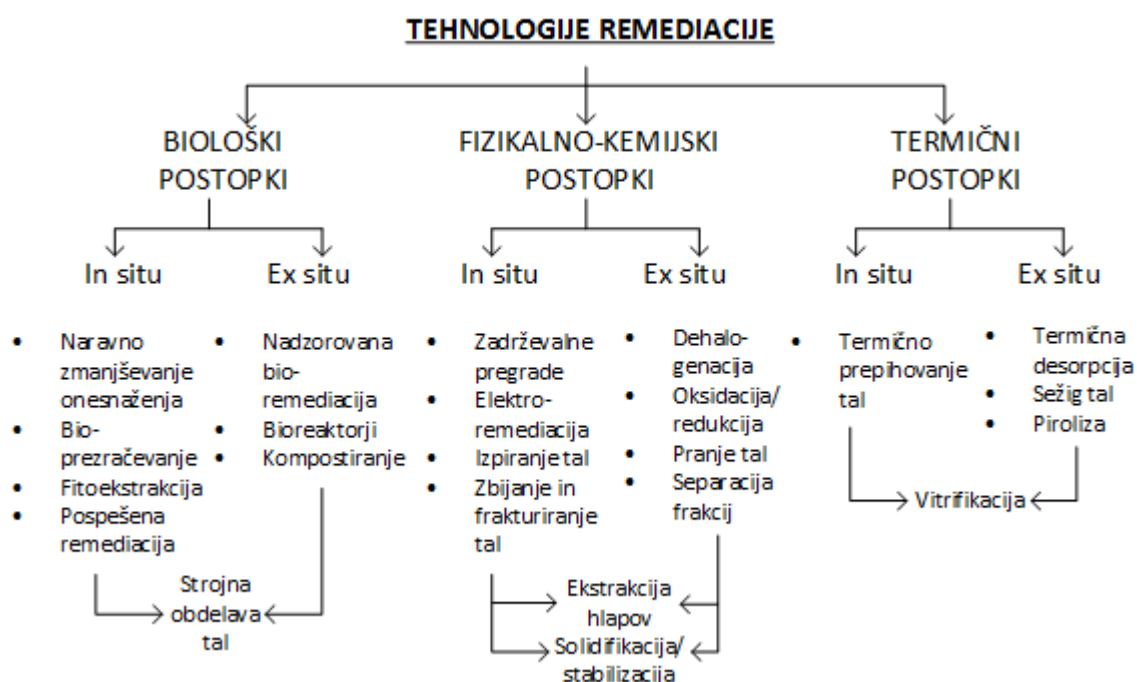
2.3 REMEDIACIJA ONESNAŽENIH TAL

Ker so onesnažena tla nevarna za okolje, jih je potrebno očistiti. Izbira metode čiščenja tal je odvisna od zakonodaje, ki predpisuje dovoljene koncentracije onesnažil v tleh z določeno uporabnostjo, socioloških vidikov, razpoložljivosti finančnih sredstev, zahtevane stopnje očiščenja tal, koncentracije ter vrste onesnažil in fizikalno-kemijskih lastnosti onesnaženih tal (Leštan, 2002).

Remediacija lahko poteka *in situ*, na mestu onesnaženja, ali šele po izkopu, torej *ex situ*.

V grobem delimo metode očiščevanja tal na dva tipa (Peters, 1999):

1. Metode, pri katerih kovine ostanejo v tleh (imobilizacija onesnažil oz. zmanjšanje njihove mobilnost): solidifikacija in stabilizacija, vitrifikacija.
2. Metode, pri katerih so kovine iz tal odstranjene (prenos onesnažila v tekočo fazo tal z desorpcijo in raztapljanjem): Izpiranje tal je lahko fizikalni ali kemijski proces. Po separaciji in segregaciji se zmanjša količina onesnažil ali spremeni kemijska oblika onesnažila v neškodljivo obliko. Običajno so metode, opravljene *in situ*, bolj ekonomične in varnejše kot tehnologije *ex situ*, pri katerih je potreben izkop zemljine.



Slika 3: Tehnologije remediacije onesnaženih tal (Leštan, 2002)

2.3.1 Metoda spiranja tal s kelati

Izpiranje tal se večinoma izvaja z vodo, ki ji dodamo kisline, baze, kelate ali druge dodatke, s katerimi omogočimo boljšo ekstrakcijo onesnažil (Peters, 1999). Izpiranje tal vključuje separacijo onesnažil iz talnih delcev v talno raztopino. Tehnologija se v večini uporablja *ex situ*. Potrebno je očistiti tudi vso vodo, ki zupušča postopek čiščenja tal (Leštan, 2002).

Faktorji, ki vplivajo na proces spiranja tal, vključujejo (Leštan in sod., 2008):

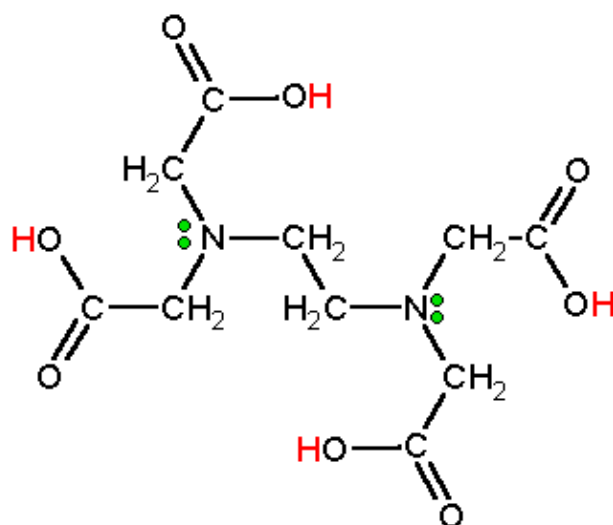
- vsebnost gline (ki ovira odstranitev onesnažil),
- kompleksnost onesnažil v tleh (vseh hkrati ne moremo odstraniti),
- visoka vsebnost humusa (onemogoči odstranitev onesnažil),
- koncentracija PSK,
- mineralogija PSK (vpliva na proces obnašanja in vezavo onesnažil),
- razporeditev talnih delcev/tekstura tal (vpliva na odstranitev odpadne snovi).

Načini, s katerimi lahko mobiliziramo kovine iz tal (Peters, 1999):

- sprememba pH (zakisanje),
- sprememba ionske moči raztopine,
- sprememba redoks potenciala,
- formacija topnih kompleksov PSK.

V praksi se najpogosteje uporablja metoda pranja tal s kisljinami in kelati. Kelati so ligandi PSK, ki vsebujejo dva ali več prosta elektronska donorja, preko katerih se tvori koordinacijska vez s kovinskimi ioni. Ligandi v tleh vežejo kovine v kovinsko-kelatne komplekse, kar povečuje njihovo topnost in nudi možnost odstranitve le-teh iz tal.

EDTA je zaradi učinkovitosti, dostopnosti in relativno nizke cene najpogosteje uporabljeni ligand za ekstrakcijo PSK iz tal. Ker talni Ca, Fe, Mg, in Al tekmujejo s PSK za mesta vezave na kelate, je za zagotovitev zadostne odstranitve onesnažil potrebna večja količina vnesenega kelata. Pri dodani EDTA v molarnem razmerju s Pb 2 : 1 (EDTA/Pb) je bilo odstranjenih 95% Pb v tleh. Učinkovitost odstranitve je bila nižja pri razmerju 1 : 1 (Elliott in Brown, 1989). Stabilnost konstante formacije kompleksa kovina-kelat in s tem učinkovitost ekstrakcije je odvisna od pH. Večje količine so bile odstranjene pri manjših pH vrednostih. Tvorba kompleksov v tleh je odvisna od kinetike reakcij, adsorpcije v trdno fazo tal, mineralne oblike PSK in možne biološke degradacije kelata ali njegovega kovinskega kompleksa. Take interakcije je težko predvideti, odvisne so od onesnažil in lastnosti tal. Uporaba večkratnih manjših odmerkov kelata v večini bolj odstrani toksične kovine kot uporaba enega večjega odmerka (Leštan in sod., 2008; Finžgar in Leštan, 2007).



Slika 4: Strukturna formula EDTA (etilendiamintetraocetna kislina)

2.3.2 Toksičnost in posledice spiranja tal z EDTA

Veliko študij je že več kot 50 let usmerjenih v preučevanje vpliva kelatov na okolje, saj le-ti vplivajo na naravno speciacijo kovin in njihovo biološko dosegljivost (Nowack, 2008).

Postopek remediacije s spiranjem tal z EDTA vpliva na (Leštan, 2014):

- kemijske lastnosti tal: frakcionacija toksičnih elementov, pH, vsebnost organske snovi in karbonatov, C:N razmerje, koncentracija P and mikro-hranil, kationsko-izmenjalna kapaciteta tal,
- fizikalne lastnosti tal: struktura in vodni potencial tal,
- biološke lastnosti tal.

Zaradi velike vodotopnosti kovinskih kelatov pride skozi talni profil v podtalnico do izpiranja le-teh. Njihova sposobnost, da zadržijo kovinske ione in remobilizirajo PSK iz blata čistilnih naprav ali drugih usedlin ali sedimentov, predstavlja potencialno nevarnost za onesnaženje pitne vode. Zaradi hitrega sprejema v rastline (fitoekstrakcija) lahko taki kompleksi prehajajo v zelene dele rastlin in s tem v prehranjevalno verigo živali in ljudi (Kos in Leštan, 2003).

EDTA je slabo oz. biološko nerazgradljiva ter v naravi zelo stabilna snov. V evropskih rekah je že zaznati porast koncentracije EDTA, tudi do 100 µg/l, zaradi široke uporabe in počasne razgradnje, kar predstavlja nevarnost za okolje in zdravje ljudi (Jaworska in sod., 1999; Nowack, 2008).

Mikroorganizmi v tleh so prvi, ki se odzovejo na negativni vpliv onesnažil v tleh, njihova biomasa, pestrost in aktivnost so lahko parametri za določanje stopnje onesnaženosti okolja. Dodatek EDTA v tla zmanjša mikrobiološko aktivnost določeno z merjenjem presnovne aktivnosti mikroorganizmov (Mühlbachova, 2011 cit. po Ultra in sod., 2005) in

dehidrogenazno aktivnost (Epelde in sod., 2008). Na drugi strani pa študije dokazujejo, da v daljšem času onesnaženi zemljini aplikacija EDTA manj negativno vpliva na mikrobnio biomaso kot v tleh z nizko onesnaženostjo z Zn (Chander in Joergensen, 2008) ter da je aplikacija EDTA (0,5 in 1,5 mg/kg) zelo povečala topnost Pb, Cd, Zn in Cu v zemlji brez negativnega vpliva na mikroorganizme (Mühlbachova, 2011 cit. po Sapoundjieva in sod., 2003). Prosti kovinski ioni so namreč najbolj toksični in vezani na komplekse z organskimi spojinami ter niso direktno dosegljivi mikroorganizmom. V končni fazi pa se lahko mikroorganizmi v daljšem časovnem obdobju močno adaptirajo na učinke PSK (Mühlbachova, 2011).

Obstajajo pa tudi nasprotujoči si rezultati. V študiji Jelušičeve in sod. (2013) je remediacijski postopek značilno zmanjšal mikrobnio biomaso in spremenil strukturo mikrobne združbe, vendar 7 tednov kasneje razlik v mikrobnio biomaso in splošni strukturi mikrobne združbe med originalnimi (onesnaženimi) in remediiranimi tlemi z uporabljenimi metodami v študiji ni bilo več moč zaznati. Omenjena študija je pokazala na pomen enakih okoljskih razmer za biomaso in strukturo mikrobnih združb, ki s staranjem tal prevladajo nad negativnimi učinki pranja tal z EDTA na mikrobne združbe. Kot problematično se je izkazalo le kopičenje Pb, Zn in Cd v zelenih delih rastline, kar le nakazuje pomembnost učinkovitega izpiranja tal po remediaciji, da bi iz tal odstranili ali imobilizirali vse EDTA-mobilizirane PSK.

PSK, ki ostanejo po remediaciji v tleh, so po navadi v kemijsko stabilni mineralni obliki in vezane na nelabilne talne frakcije (Udovič in sod., 2007). Kot take so manj mobilne in biodosegljive ter tudi manj toksične v primerjavi s prvotnimi razmerami pred samo sanacijo. Predvsem cink in svinec, ki sta z močnimi vezmi vezana na trdno fazo tal, je največkrat nemogoče odstraniti v celoti, predvsem iz tal z veliko vsebnostjo organske snovi in gline. Vprašanje je, ali je zmanjšana mobilnost in biodosegljivost ostankov kovin v tleh trajni ali le začasni uspeh. Zemlja je dinamično telo in po remediaciji lahko različni abiotični (klimatski, hidrološki) in biotični dejavniki (mikroorganizmi in favna) povzročijo prehajanje ostankov kovin iz manj v bolj mobilne/dosegljive oblike in s tem povzročijo spremembo njihove toksičnosti (Udovič in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1.1 Lastnosti tal

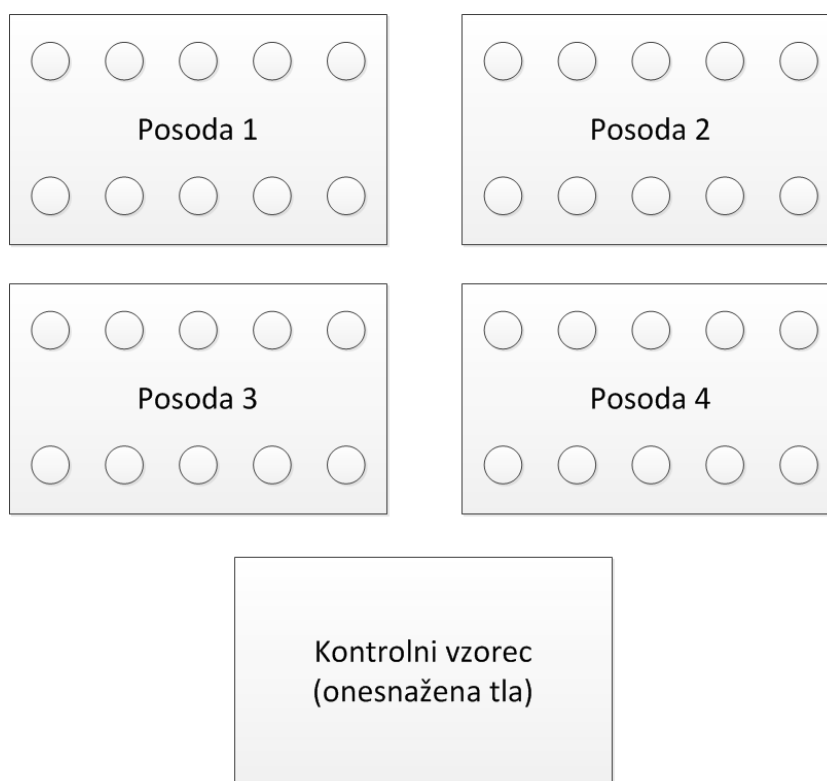
Pri poskusu smo uporabili s svincem, kadmijem in cinkom močno onesnažena tla iz Mežiške doline ($x = 489.300$ m in $y = 152,300$ m G.K. koordinacijski sistem), kjer je več kot 300 let aktivno delovala topilnica rude. Vsebnost PSK močno presega kritične vrednosti, določene v Uredbi 86/827/EEC (1986), ki velja v evropskem prostoru za uporabo odpadne vode in aktivnih blat iz čistilnih naprav na onesnaženih tleh (3 mg/kg Cd in 300 mg/kg za Pb in Zn).

Za poskus smo uporabili remediirana tla, ki so bila sprana z EDTA v koncentraciji 40 mmol/kg. Tla smo še dodatno izpirali z vodo (50 l) in s tem zmanjšali koncentracijo preostalih z EDTA mobiliziranih PSK. Tako očiščena tla smo izpostavili izvornim (onesnaženim) tлом za daljše časovno obdobje in pri tem z izbranima biološkima kazalcema MA spremljali spremembe v funkcionalnosti tal.

3.1.2 Zasnova in postavitve poskusa

Poskus je potekal v prostorih Katedre za pedologijo in varstvo okolja Biotehniške fakultete v Ljubljani. Poskus je trajal šest mesecev (december 2008–junij 2009) v kletnih prostorih. S tem smo zagotovili konstantno vlago (89–92 %) in temperaturo (15–18° C) in tako izključili morebitna odstopanja v rezultatih zaradi vpliva okolja.

Remediirana tla smo s simulacijo vključili v onesnažena tla, tako da smo na začetku poskusa izdelali mrežaste kolone iz standardnega plastičnega materiala za ograde (velikost rež 0,7 cm x 0,7 cm), ki so služile kot površinsko minimalna pregrada med remediiranimi in močno onesnaženimi tlemi. Kolone niso povzročale kemijskih reakcij ali kakorkoli vplivale na končni rezultat. Mrežaste kolone so imele površino $1166,11 \pm 182,45$ cm², vsaka je vsebovala 172 g suhih R-tal. Onesnažena tla smo porazdelili v štiri plastične posode in v vsako dali 10 mrežastih kolon z očiščenimi tlemi.



Slika 5: Shema poskusa

Kot kontrolni vzorec smo imeli peto posodo, v kateri so bila samo onesnažena tla. Da bi preprečili dodatno izhlapevanje vode, so bile vse posode pokrite s črno PVC-folijo, ki smo jo 2 x na teden za 2 h odkrili in omogočili zadostno zračenje. Na podlagi povezave med začetno težo suhih tal v posodi (onesnažena tla + kolone) in začetno zadrževalno kapaciteto smo skozi celoten poskus tla tehtali in z dodajanjem vode ohranjali zadrževalno (poljsko) kapaciteto 75 - 85 %.



Slika 6: Posoda z onesnaženimi tlemi in z 10 mrežastimi kolonami z remediiranimi tlemi

3.1.3 Potek poskusa

Uporabljena tla smo izkopal v Mežiški dolini (junij 2008) in jih na terenu presejali skozi 1 cm sito in jih shranjevali v 50 L plastičnih posodah v rastlinjaku pri standardnih pogojih. Pred remediacijo so bila tla predhodno osušena. Uporabljena je bila remediacija tal s spiranjem z 40 mmol/kg EDTA (peristatična črpalka, 48h). Pred poskusom smo R-tla še dodatno izpirali v koloni s 50L vode, da smo odstranili morebitne ostanke EDTA. R- tla in O-tla so bila nato shranjena v kletnih prostorih fakultete pri standardnih pogojih. Po homogenizaciji tal smo z R-tlemi napolnili mrežaste kolone in jih vstavili v posode z onesnaženimi tlemi. Vzorce smo analizirali z izbranimi metodami na začetku poskusa (december 2008) in po 1., 3. in 6. mesecu od postavitve poskusa. Po odstranitvi kolon se je zmanjševala teža posode in je bila metoda s spremljanjem teže za ohranjanje zadrževalne kapacitete težje izvedljiva zato smo preverjali zadostno vlago zemljine s prstnim odtisom. Odstranjene kolone smo nadomestili s plastičnimi tulci. Onesnažena tla iz vseh štirih posod smo vzorčili ločeno v enakih odmerkih in jih homogenizirali. Previdno smo homogenizirali tudi očiščena tla za vsako vzorčenje iz šestih kolon.



Slika 7: Med poskusom smo odstranjevali mrežaste kolone, analizirali remediirana tla in jih nadomestili s plastičnimi tulci.

3.2 ANALITSKE METODE

3.2.1 Analiza tal

Osnovne pedološke lastnosti zemljine, ki smo jo uporabili za poskus, so v skladu s standardno prakso izmerili v Centru za pedologijo in varstvo okolja (Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). Za standardno pedološko analizo smo v suspenziji 0,01 CaCl₂ (razmerje tla : raztopina = 1 : 2) izmerili pH zemljine, z metodo Walkley-Black določili s titracijo količino organske snovi, z amonij-acetatno metodo kationsko izmenjevalno kapaciteto, z mehansko analizo teksturo tal in po Egner-Domingovi metodi, kolorimetrično, dostopen fosfor (v obliki P₂O₅) (Kalra in Maynard, 1991).

3.2.2 Vsebnost kovin

Vsebnost kovin (Pb, Cd in Zn) smo določili po razklopu z zlatotopko (kislinska mešanica koncentrirane dušikove kisline (65 % HNO₃) in koncentrirane klorovodikove kisline (37 % HCl) v razmerju 1 : 3) (SIST ISO 11466: 1996).

Tri vzorce s po 1 g zračno suhih tal smo zmleli v ahatni terilnici, jih presejali čez 160 µm sito, jo razklopili in dobljeno reakcijsko mešanico pustili stati čez noč. Naslednji dan smo po dveh urah segrevanja v termobloku raztopino prefiltrirali v 100 mililitrski bučki in razredčili z deionizirano vodo do končnega volumna. Skupno vsebnost Pb, Zn ter Cd smo določili z metodo atomske absorpcijske spektrofotometrije AAS (Parkin-Elmer 1100-B, Norwalk, Ct, USA). Zaradi natančnosti meritev smo v vsak razklop vključili tudi slep vzorec ter v vsako serijo razklopa standardni material z znanimi koncentracijami, s katerimi smo preverjali pravilnost postopka in meritev. Meritev smo na začetku poskusa opravili na onesnaženih (Ø), remediiranih (R_{EDTA}) z 40 mmol/kg z EDTA tleh in v izpiralni tekočini (I). Z izračunom smo nato določili vsebnost kovin v tleh, ki smo jih uporabili v poskusu (remediirana tla (R₀)).

3.2.3 pH-vrednost

Pred vsako meritvijo smo umerili pH-meter s pufri.

Za meritev pH-vrednosti zemljine smo 10 g suhega in presejanega vzorca (< 2 mm) dodali 20 ml 0,01 M raztopine CaCl₂ (razmerje 1 : 2). Vzorce smo pustili, da so se prepojili z raztopino, jih nato večkrat premešali, pustili, da se posedejo pribl. 30 min ter merili pH-vrednost supernatanta (pH-meter Consort R305). Meritve smo izvedli v treh ponovitvah in upoštevali povprečje.

pH smo merili v ekstraktih onesnažene zemlje na začetku poskusa in remedirane zemlje na začetku poskusa in po 1., 3. in 6. mesecu.

3.2.4 Določevanje biodosegljive frakcije tal z DTPA-ekstrakcijo

Skupne koncentracije onesnažil v tleh ne smemo enačiti z biološko dosegljivo koncentracijo kovin. Biološko dosegljiva koncentracija se nanaša na frakcijo skupne koncentracije toksičnih kovin, ki jo organizem lahko privzame oz. ki ima dejanski vpliv na biološki material (Greebelen in sod., 2003). Kovine, dosegljive za rastline, so bile določene z ekstrakcijo DTPA (dietilentriaminpentaocetna kislina), ki je bila prvotno mišljena za hkratno ekstrakcijo rastlinam dosegljivega Zn, Fe, Mn in Cu v skoraj nevtralni in apnenčasti zemlji in uporabljena kot merilo za biodosegljivost in ekotoksičnost kovin.

DTPA ekstrakcijska raztopina vsebuje 0,005 M DTPA, 0,01 M CaCl_2 in 0,1 M TEA (trietanolamin). Raztopina je obstojna več mesecev. Za pripravo 10 l ekstrakcijske raztopine smo raztopili 149,2 g TEA, 19,67 g DTPA in 14,7 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ s približno 200 ml deionizirane vode. Ko so se vse snovi raztopile, smo raztopine dopolnili do volumna 9 l in jim z razredčeno solno kislino (1 : 1 = N : HCl) uravnavali pH do vrednosti $7,30 \pm 0,05$. Raztopino nato dopolnimo do volumna 10 l (Lindsay in Norvell, 1978).

V posodah (125 ml) smo 10 g zračno suhih tal v treh ponovitvah prelili z 20 ml ekstrakcijske raztopine. Zamašene posode smo za dve uri vstavili v stresalnik s 120 obr./min. Po stresanju smo suspenzijo gravimetrično filtrirali (Whatman No.42) in v filtratu določili koncentracijo elementov.

Meritve smo opravili za onesnaženo zemljo na začetku poskusa in za remedirano zemljo na začetku poskusa in po 1., 3. in 6. mesecu.

3.2.5 Biološki kazalci za določanje mikrobiološke aktivnosti tal

3.2.5.1 Dehidrogenazna aktivnost

DHA smo uporabili za določitev splošne mikrobne aktivnosti v tleh. Pri TTC-metodi se kot akceptor elektronov uporablja vodotopni trifeniltetrazolijev klorid. Mikroorganizmi reducirajo TTC v TPF, ki ga določimo kolorimetrično.

Na začetku smo pripravili reagente za reakcijo:

- Tris-HCl pufer (100 mM): 12,1 g tris aminometana (hidroksimetil) raztopimo v 700 ml deionizirane vode. S HCl uravnavamo pH 7,4 za nevtralna tla ter dopolnimo z dH_2O do končnega volumna 1000 ml.
- TTC raztopina: glede na tip tal raztopimo TTC v tris pufer v koncentraciji in dopolnimo z istim pufrom do 100 ml.
- Kot ekstraktant smo uporabili aceton.
- TPF standardna raztopina: v acetonu (80 ml) raztopimo TPF (50 mg) in dopolnimo z acetonom do končnega volumna 100 ml.

TTC in TPF sta občutljiva na svetlobo, zato je priporočljivo, da meritve opravimo v temi oziroma pod difuzno svetlobo. V reakcijske epruvete (60 ml) smo dali 5 g vlažnih tal, dodali

5 ml raztopine TTC in premešali. Epruvete smo zatisnili z gumijastimi zamaški, odpornimi na toploto, in inkubirali za 24 h pri 37 °C. Kontrola je vsebovala samo 5 ml tris pufra brez TTC. Po inkubaciji smo dodali 40 ml acetona, epruvete pretresli in jih ponovno inkubirali v temi za 2 h. Med inkubacijo smo jih v 15-minutnih intervalih pretresli. Zamaške je potrebno dobro zatesniti, ker se med inkubacijo odpirajo. Suspenzijo smo filtrirali in izmerili absorpcijo pri 546 nm (rdeča barvila).

Suspenzije za kalibracijsko krivuljo smo pripravili tako, da smo v 50-mililitrske bučke odpipetirali po 0, 05, 1, 2, 3 in 4 ml TPF standardne raztopine ter dodali 5,3 ml tris pufra in z acetonom dopolnili do 50 ml, da smo dobili koncentracije 0, 5, 10, 20, 30 in 40 µgTPF/ml.

Izmerjene koncentracije TPF smo korigirali s kontrolnimi koncentracijami in izračunali DHA:

$$DHA_{TPF} = \frac{TPF \cdot V_r}{dwt \cdot m_t} = \frac{TPF \cdot 45}{dwt \cdot 5}, \quad \dots (1)$$

kjer je DHA_{tpf} dehidrogenazna aktivnost [µg/g DW], dwt suha teža 1 g vlažnih tal [g], m_t masa uporabljenih (mokrih) tal [g] z vrednostjo 5 g in V_r prostornina raztopine [l], ki smo jo dodali talnemu vzorcu z vrednostjo 45 l.

Meritve smo opravili za onesnaženo zemljo in za remediirano zemljo na začetku poskusa in po 1., 3. in 6. mesecu.

3.2.5.2 S substratom inducirano dihanje v tleh

V laboratoriju smo uporabili manometrične merilne glave OxiTop (WRW), ki so nameščene na steklenih posodah in merijo nastali podtlak v tem zaprtem sistemu, ki je sorazmeren koncentraciji kisika, porabljenega za razgradnjo (diferenčno merjenje pritiska z elektronskim senzorjem na osnovi piezoupornosti). Ogljikov dioksid, ki ga izločijo mikroorganizmi, se absorbira na natrijev hidroksid, ki je nameščen v plastični posodici nad vzorcem in določen s titracijo s HCl.

100 g tal (preračunano na suho težo) smo presejali skozi 5-milimetrsko sito in dali v litrske steklene kozarce. Tlom smo dodali sterilno raztopino glukoze v količini, da smo zagotovili koncentracijo 10 µmol/g in vlažnost 90 % poljske kapacitete. V steklene posode smo dodali 10 ml 25 % NaOH v plastični posodici. Posode smo pokrili z manometričnimi merilnimi glavami (oxiTop, WTW, Weilheim). Posode smo inkubirali pri stalni temperaturi 20 °C v temi za 24 h. Meritve smo opravili za onesnaženo zemljo in za remediirano zemljo na začetku poskusa in po 1., 3. in 6. mesecu.

Na ta način smo po plinski enačbi izračunali množino (n) nastalega CO₂. Večja množina nastalega CO₂ pomeni večjo mikrobno aktivnost v tleh.

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T, \quad \dots (2)$$

kjer je R splošna plinska konstanta [J/mol/K], P izmerjeni tlak [Pa], V prostornina kozarcev [m³], T temperatura inkubacije [K] in n množina snovi [mol].

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate kemijskih analiz smo statistično obdelali. Statistično značilne razlike med obravnavanji smo ugotavljali po metodi analize variance ANOVA ($p < 0,05$) razlik med povprečji. Pri izračunih smo upoštevali 5-odstotno tveganje. Uporabili smo program Statgraphics plus za Windows.

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI ZEMLJINE

Standardne pedološke lastnosti tal iz Mežiške doline pred remediacijo so podane v preglednici 3. Tako močno onesnažena tla smo v poskusu uporabili kot osnovo, v katero smo nato vložili kolone z remediiranimi tlemi.

Preglednica 3: Standardne pedološke lastnosti neremediiranih tal (analize so predhodno opravili na Centru za pedologijo in varstvo okolja v pedološkem laboratoriju)

Lastnosti zgornjega sloja tal (0–30 cm) v Mežiški dolini

Teksturni razred	Peščena ilovica (PI)
pH (CaCl ₂)	6,4
Organska snov (%)	14,2
Skupni dušik (%)	0,50
Pesek (%)	50,9
Grobi melj (%)	19,0
Fini melj (%)	23,5
Glina (%)	6,6

4.1.1 Skupne koncentracije kovin pred in po remediaciji

Iz preglednice 4 je razvidno, da z zlatotopko določene skupne koncentracije Pb, Zn in Cd pred remediacijo v zemljini močno presegajo kritične vrednosti nevarnih snovi v tleh (tj. 530 mg/kg za Pb, 720 mg/kg za Zn in 12 mg/kg za Cd), določene v Ur. l. RS št. 68 (1996).

Rezultati remediacijskega postopka spiranja tal z EDTA v koncentraciji 40 mmol/kg so podani v preglednici 4. Po spiranju tal z EDTA smo zmanjšali skupno koncentracijo Pb za 5,7-krat, Zn za 2,8-krat in Cd za 4-krat. Tla smo v kolonah še dodatno spirali z vodo (50 l) in dosegli zmanjšanje povprečne skupne koncentracije svinca za 82,68 %, cinka za 65,42 % in kadmija za 77,01 %. Očiščena tla (R0) smo vstavili v kolone in jih izpostavili izvornim, močno onesnaženim tlom.

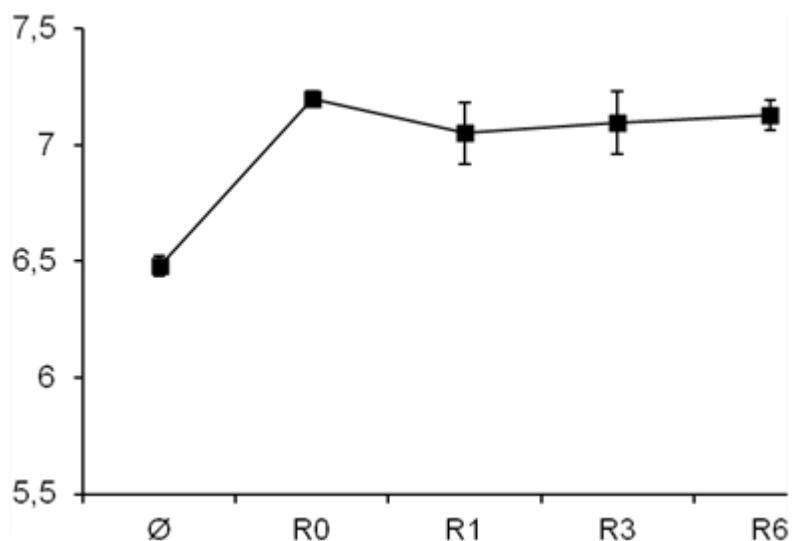
Preglednica 4: Skupne koncentracije svineca, cinka in kadmija, določene z zlatotopko v onesnaženih tleh (\emptyset), remediiranih tleh po spiranju z EDTA v koncentraciji 40 mmol/kg (R_{EDTA}) in v tleh po dodatnem spiranju z vodo (R_0) v izpiralni tekočini (I). Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD ter z izračunom določena skupna koncentracija Pb, Zn in Cd v remediiranih tleh (R_0).

Potencialno strupene kovine	Onesnažena tla (\emptyset)	Po spiranju z EDTA (40 mmol/kg) (R_{EDTA})	Izpiralna tekočina (I)	Remediirana tla (R_0)
Pb (mg/kg)	5837,52 \pm 167,54	1025,03 \pm 402,72	14,21 \pm 8,95	1010,82
Zn (mg/kg)	1926 \pm 50,96	680 \pm 17,40	14,07 \pm 0,88	665,93
Cd (mg/kg)	33,43 \pm 1,49	8,21 \pm 0,09	0,53 \pm 0,06	7,68

4.1.2 pH-vrednost

Poskusna tla so bila pred remediacijo (\emptyset) zmerno kislila, s povprečno vrednostjo pH 6,48. Z remediacijskim postopkom se je pH-vrednost povprečno povečala na 7,19.

Po remediaciji (R_0) se je vrednost pH tako povečala, da so tla skozi ves poskus ostala v nevtralnem območju (pH 6,6–7,2). Z naraščanjem pH-vrednosti talne raztopine pada topnost PSK in že na splošno velja, da se vsebnost PSK v talni raztopini zmanjšuje z večanjem pH tal (slika 8).



Slika 8: Vrednost pH v tleh pred remediacijo (\emptyset) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R_0) in po 1. (R_1), 3. (R_3) in 6. mesecu (R_6) poskusa, rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.

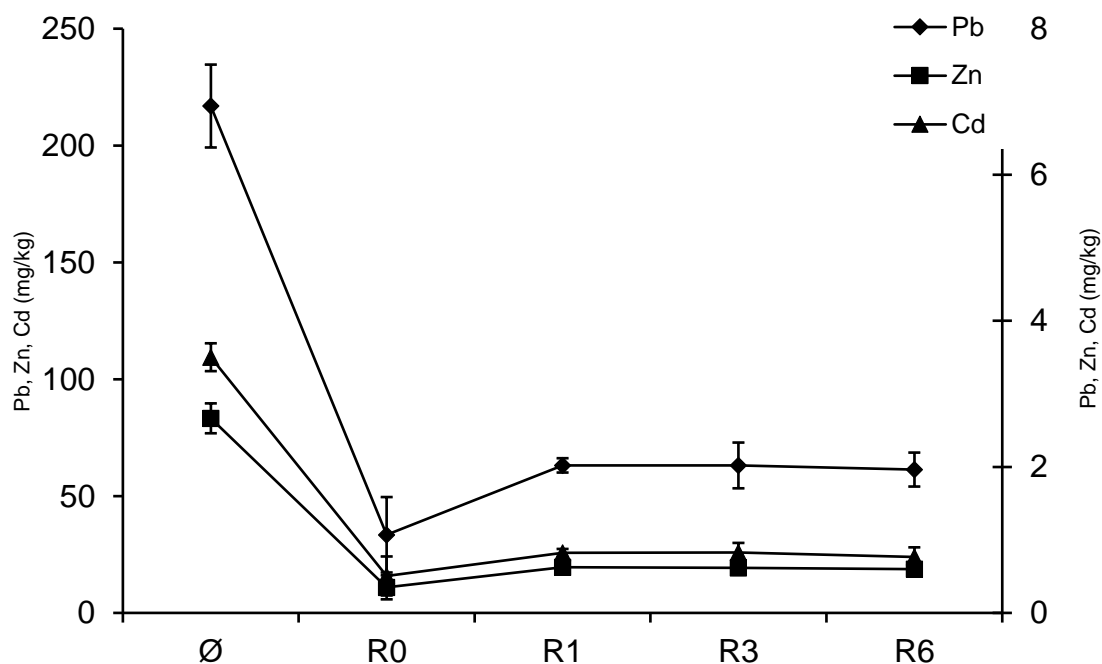
4.1.3 Potencialna biodosegljivost onesnažil za rastline, določena z ekstrakcijo DTPA

Rezultati DTPA-ekstrakcije PSK iz onesnaženih tal na začetku poskusa in časovna dinamika biološke dosegljivosti PSK, določena z DTPA-ekstrakcijo, so podani v preglednici 5.

Preglednica 5: Potencialna biološka dosegljivost kovin v tleh za rastline pred remediacijo (\emptyset) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R0) in po 1. (R1), 3. (R3) in 6. mesecu (R6) poskusa, rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.

Meritve	Cd (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)
\emptyset	3,50 \pm 0,19	216,90 \pm 17,73	83,27 \pm 6,40
R0	0,51 \pm 0,27	33,44 \pm 16,14	10,95 \pm 5,13
R1	0,82 \pm 0,05	63,14 \pm 3,06	19,56 \pm 1,11
R3	0,83 \pm 0,13	63,11 \pm 9,78	19,34 \pm 2,99
R6	0,77 \pm 0,13	61,35 \pm 7,27	18,79 \pm 2,65

S postopkom remediacije spiranja tal s 40 mmol/kg EDTA in vodo se je uspešno zmanjšala potencialna biodosegljivost kovin v tleh s statistično značilnimi razlikami ($p < 0,05$). Takoj po spiranju tal se je zmanjšal delež dosegljivih kovin za rastline, in sicer pri Pb za 84,6 %, Zn za 86,8 % in Cd za 85,5 %, ki smo ga izmerili takoj po postopku spiranja tal. Po prvem mesecu poskusa se je delež biodosegljivih kovin nekoliko povečal in sicer svinca za 13,7 %, cinka za 10,3 % in kadmija za 9,0 %. V nadaljnjih petih mesecih je biološko dosegljiva koncentracija onesnažil v remediiranih tleh ostala praktično enako nizka brez statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) (slika 9).



Slika 9: Potencialna biodosegljivost kovin v kontrolnih tleh pred remediacijo (\emptyset) in v remediiranih tleh takoj po remediaciji (R0), 1. mesecu (R1), 3. mesecih (R3) in 6. mesecih (R6) poskusa določena z DTPA ekstrakcijo. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.

4.2 BIOLOŠKI KAZALCI MIKROBIOLOŠKE AKTIVNOSTI TAL

4.2.1 Dehidrogenazna aktivnost

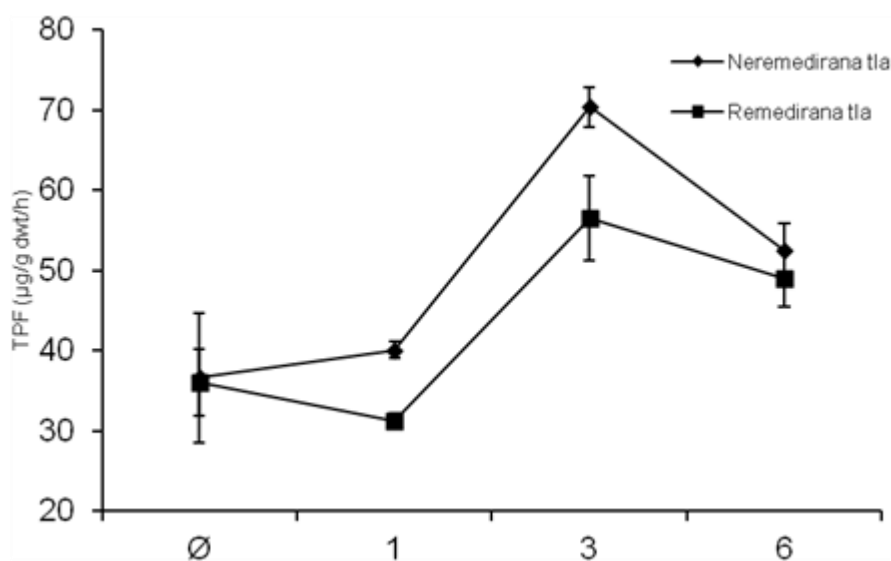
Vrednosti dehidrogenazne aktivnosti (DHA) tal, izražene kot izmerjene koncentracije trifenil formazana (TPF), so podane v preglednici 6. Grafično so rezultati prikazani v grafu (slika 10).

Preglednica 6: DHA na začetku in po 1., 3. in 6. mesecu poskusa v onesnaženih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD

Dehidrogenazna aktivnost	\bar{X} / R_0	1. mesec	3. mesec	6. mesec
Onesnažena tla				
TPF $\mu\text{g/g dwt/h}$	36,6 \pm 8,1	40,1 \pm 1,0	70,3 \pm 2,4	52,5 \pm 3,4
Remediirana tla				
TPF $\mu\text{g/g dwt/h}$	36,0 \pm 4,2	31,2 \pm 1,0	56,5 \pm 5,3	49,1 \pm 3,6

Sam postopek remediacije ni bistveno vplival na DHA v tleh, saj med vzorci onesnaženih tal in vzorci remediiranih tal na začetku poskusa in pri zadnji meritvi, po 6. mesecih, ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$). Čez čas se je vrednost DHA sicer nekoliko povečala in dosegla najvišje vrednosti po treh mesecih poskusa. Pri onesnaženih tleh se je vrednost povečala za 1,9-krat, pri remediiranih tleh pa za 1,5-krat. Skozi celotni poskus je koncentracija reduciranega TCC pri vseh meritvah višja pri močno onesnaženih tleh, med vsemi obravnavanji O- in R-tal ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$).

DHA se je v R-tleh od začetka do konca poskusa sicer povečala s statistično značilnimi razlikami ($p < 0,05$), vendar le za faktor 1,3 a vrednost ostaja nižja kot pri onesnaženih tleh. To pomeni, da dehidrogenaze, (znotrajcelični encimi, ki se nahajajo v vseh živih organizmih) niso bistveno povečale svoje aktivnosti v spranih tleh v izbranem časovnem obdobju poskusa.



Slika 10: DHA, izračunana kot koncentracija trifenil formazana (TPF) na začetku (Ø) in po prvem (1.), tretjem (3.) in šestem (6.) mesecu poskusa v neremediranih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD.

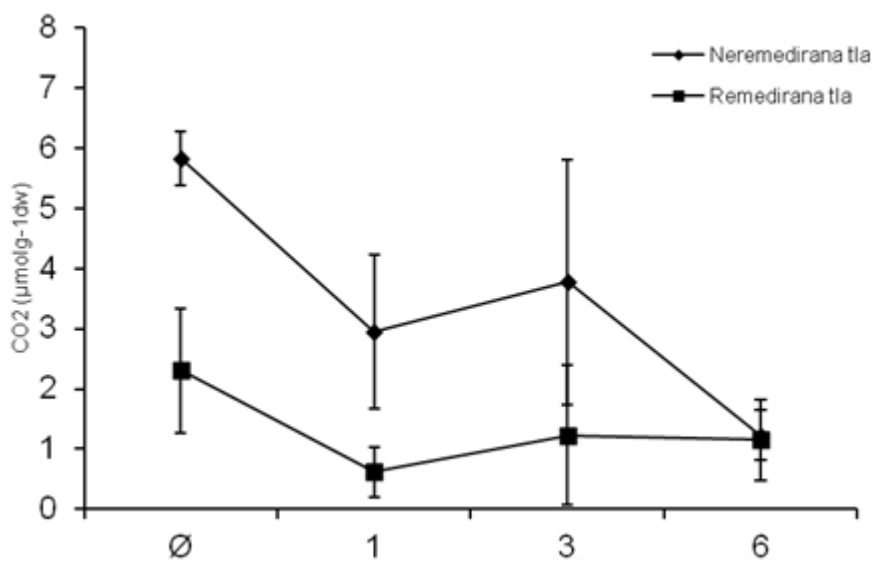
4.2.2 S substratom inducirano dihanje

Rezultati s substratom (glukozo) inducirane dihanja (SIR) v tleh, izraženega kot koncentracija sproščenega CO_2 , so za onesnažena in remediirana tla za celoten poskus predstavljeni v grafu (slika 11).

Majhna stopnja SIR v onesnaženih tleh kaže na slabo funkcionalno stanje tal, še nižja stopnja (2,5-krat manj) v očiščenih tleh pa na negativne posledice spiranja tal z EDTA. Med rezultati meritev na začetku poskusa v O- in R-tleh so statistično značilne razlike ($p < 0,05$).

Rahla porast SIR v obeh analiziranih tleh po treh mesecih poskusa je zanemarljiva, saj je še vedno nižja kot na začetku poskusa.

Po šestih mesecih poskusa je vrednost SIR za faktor 4,7 manjša v onesnaženih tleh in za faktor 2 v remediiranih tleh v primerjavi z začetnimi meritvami. Med rezultati na začetku in po šestih mesecih v R-tleh ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) torej se metabolna aktivnost mikroorganizmov v tleh ne poveča. Pri O-tleh je dinamika SIR negativna za kar lahko sklepamo, da so se med poskusom razmere za aerobne mikroorganizme poslabšale zaradi delovanja PSK. Vendar pa so končne vrednosti SIR pri R- in O-tleh brez statistično značilnih razlik ($p > 0,05$), kar nakazuje, da so učinki inherentnih lastnosti tal in enake razmere "staranja" prevladali nad začetnim negativnim učinkom remediacije tal



Slika 11: S substratom inducirano dihanje (SIR), izmerjeno kot koncentracija nastalega CO₂ na začetku (Ø), po prvem (1.), tretjem (3.) in šestem (6.) mesecu poskusa v neremediranih in remediiranih tleh, rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Večino raziskav o čiščenju onesnaženih tal je osredotočenih na zmanjšanje skupne in dosegljive koncentracije kovin v tleh, a zanemarile vpliv liganda in samega postopka čiščenja na kakovost in funkcionalnost tal (Zhang in sod., 2010). Tako kompleksen pojem kot je kakovost tal je težko direktno izmeriti, zato ga lahko zgolj ocenimo s pomočjo t.i. kazalcev kakovosti. Z izbranimi biološkima indikatorjema (encimskima testoma) smo tako posredno, a le deloma, izmerili biološko aktivnost tal in s tem ugotovili dinamiko MA v remediiranih tleh, ko so ta "vrnjena" v okolje.

Postopek remediacije s spiranjem tal z EDTA je zelo uspešno iz tal odstranil skupne PSK (preglednica 4), potencialna biodosegljiva onesnažila (slika 9) in ugodno vplival na druge fizikalno-kemijske pogoje kot je pH vrednost (slika 8), vendar pa je negativno vplival na MA, ki smo jo določili z DHA (slika 10) in SIR (slika 11).

S spiranjem tal s 40 mmol/kg EDTA in dodatnim spiranjem kolon z vodo smo uspešno odstranili več kot 75 % skupne koncentracije PSK iz tal in več kot 85% za rastline potencialno biodosegljivega deleža Pb, Cd in Zn (preglednica 5). S postopkom se je povišala pH-vrednost tal, in sicer iz kislega v nevtralno območje. S tem so mikroorganizmi pridobili optimalne razmere in smo lahko izključili vpliv preveč kislih ali alkalnih tal na njihovo aktivnost. pH-vrednost namreč vpliva tako na dosegljivost hranil in PSK v tleh (Janssen in sod., 1997) kot na aktivnost talnih mikroorganizmov (Ridvan in sod., 2004). Med 6-mesečnim poskusom v remediiranih tleh ni prišlo do statistično značilnih razlik pH-vrednosti. Čeprav smo remediirana tla izpostavili onesnaženim tlom z minimalno pregrado (mrežaste kolone) in bi lahko pričakovali, da se bodo PSK prehajale iz O-tal v R-tla, ni prišlo do statistično značilnega povečanja deleža biološke dosegljivosti PSK v R-tleh v šestih mesecih (slika 9).

Z merjenjem DHA v tleh lahko sklepamo o celičnem dihanju in ocenimo celotno mikrobo aktivnost v tleh (Alvarenga in sod., 2009). Vrednosti dehidrogenazne aktivnosti so bile v onesnaženih in remediiranih tleh na začetku poskusa praktično enake. Rahlo začetno tendenco zniževanja DHA pri R-tleh lahko pripišemo negativnim učinkom spiranja tal s kelatom. Skozi celotni poskus je vrednost DHA višja v O-tleh, kar pomeni, da je kljub visoki vsebnosti PSK toksičnost EDTA bolj negativno vplivala na delovanje dehidrogenaz. V izbranem časovnem obdobju so se meritve v R-tleh statistično značilno spremenile, a le za faktor 1,3, kar pomeni, da se tla niso dobro opomogla in vzpostavila naravnega ravnovesja, saj slaba MA v tleh kaže na slabšo »zdravje tal« (Arias, 2005).

S substratom inducirano dihanje v tleh (SIR) je velikokrat uporabljen test za oceno strupenosti potencialno strupenih kovin za talne mikroorganizme. V onesnaženih tleh je mikroba rast zavirana zaradi slabih pogojev, ki jih povzročijo PSK na neodvisne talne parametre (biodosegljivost PSK, pH idr.), ki posredno ali neposredno vplivajo na delovanje talnih mikroorganizmov (Brookes, 1995). S postopkom spiranja tal se je stopnja SIR statistično značilno znižala predvidoma zaradi toksičnosti kelata na mikroorganizme. V prvem mesecu se je vrednost SIR znižala tudi v kontrolnih tleh. Prav tako smo s tem

biološkimi kazalci lahko ugotovili, da se remediirana tla v izbranem časovnem obdobju niso "opomogla" do te mere, da bi obstajale statistično značilne razlike v primerjavi z začetnimi vrednostmi, so se pa vrednosti SIR približale vrednostim v kontrolnih tleh. Zatorej lahko sklepamo, da so tla zelo počasi začela s svojo "regeneracijo" vendar so vrednosti še vedno nižje kot v onesnaženih tleh.

Različni rezultati, ki jih lahko najdemo v literaturi, potrjujejo spremenljivost v odzivu encimov na neodvisne talne parametre, na katere vpliva tako onesnaženost tal (Zhang in sod., 2010) kot tudi postopki remediacije z različnimi aditivi (Garau in sod., 2007). Vplivi onesnaženosti tal na encimsko aktivnost so kompleksni. PSK lahko bodisi posredno zavirajo MA (vpliv na mikrobnost populacijo) in/ali neposredno vplivajo na delovanje zunajceličnih encimov (Lee in sod., 2009). PSK vplivajo tudi na druge fizikalno-kemijske lastnosti tal in s tem neposredno na encimsko aktivnost. Prav tako ne smemo zanemariti negativnega učinka neselektivnega kelata EDTA, ki sicer odstrani večino PSK vendar odstrani tudi esencialne ione, kot so Mn, Cu, Mg, Ca in Fe, ki so nujno potrebni za biotsko raznovrstnost tal in zmanjšala vodno-zadrževalne lastnosti remediiranih tal (Jelušič, 2014). V poskusu so vrednosti DHA in SIR ostale nizke tako v onesnaženih kot v remediiranih tleh.

Okrevanje remediiranih tal in potencialno izboljšanje njihove kakovosti je potrebno oceniti tako z določanjem kemijskih lastnosti tal kot tudi s pomočjo merjenja obnovljenih funkcij tal s pomočjo ustreznih kazalcev kakovosti tal (Lee in sod., 2009). V poskusu smo z remediacijo sicer zelo uspešno odstranili PSK iz tal in s tem zmanjšali njihovo biološko dosegljivost vendar na podlagi dveh bioloških kazalcev MA, nismo dokazali izboljšanja funkcionalnosti tal, ki je veliko širši pojem. Zemlja je dinamično telo, vendar so vsi procesi v njej zelo počasni. Za oceno izboljšanja stanja tal z vidika njihove MA po postopku remediacije s spiranjem z EDTA bi morali poskus opravljati še veliko dlje časa in vključiti druge kazalce kakovosti tal. Medtem ko je vpliv remediacije na kemijske in fizikalne lastnosti v veliki meri že raziskan, preučevanje vplivov na mikrobnost aktivnost in procese v tleh zahteva dodatne raziskave.

5.2 SKLEPI

- Izbrana tehnika remediacije tal s spiranjem z EDTA je učinkovito znižala skupne koncentracije potencialno strupenih kovin ter zmanjšala biološko dosegljivost PSK v remediiranih tleh, ki se med staranjem tal ni bistveno spreminjala.
- Mikrobiološka aktivnost, ki smo jo določili z DHA in SIR metodo je nizka tako v onesnaženih (izvornih) tleh kot tudi z EDTA spranimi tlemi. V 6 mesečnem poskusu so vrednosti DHA in SIR v onesnaženih tleh višje kot v remediiranih tleh.
- V izbranem časovnem obdobju, na podlagi dveh izbranih bioloških kazalcev MA v remediiranih tleh nismo dokazali izboljšanja funkcionalnosti tal, ki pa je veliko širši pojem.

6 POVZETEK

Tla so najbolj kritičen neobnovljivi vir. Obravnavana tla iz Mežiške doline so močno onesnažena s PSK. V povprečju skupna koncentracija svinca 11-krat presega predpisano kritično vrednost, koncentracija cinka 2,5-krat in koncentracija kadmija skoraj 3-krat. Kovine so škodljive za rastline, živali in človekovo zdravje ter jih v nasprotju z organskimi snovmi ne moremo razkrojiti (Ghosh in Singh, 2005). Zemljina na območju Mežiške doline ni primerna za pridelavo rastlin v prehrabne namene ljudi in živali ter za zadrževanje in filtriranje vode in jo je kot tako potrebno očistiti. Veliko študij je usmerjenih v ugotavljanje najbolj učinkovite metode remediacije tal, ki iz tal odstrani/stabilizira PSK vendar se je zaradi splošnega pomanjkanja rodovitnih tal potrebno usmeriti v raziskovanje kako takim tlam vrniti kakovost in s tem funkcionalnost. Tudi raziskava Jelušičeve (2014) je pokazala na potrebo po učinkovitem načinu revitalizacije, ki bi povrnil sposobnost remediiranih tal, da funkcionirajo kot varen in ploden rastlinski substrat (Jelušič, 2014).

V poskusu smo tla smo s spiranjem z etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) remediirali in jih ponovno izpostavili izvornim tlam. Z izbrano tehniko remediacije se je uspešno zmanjšala skupna ter rastlinam dosegljiva koncentracija PSK v tleh. Pod kontroliranimi pogoji (vzdrževanje stalne vlage, temperature, nevtralen pH, nizka stopnja biodosegljivih PSK idr.) smo z izbranimi biološkima kazalcema ugotovili tako negativni vpliv PSK v onesnaženih tleh kot negativni vpliv EDTA v remediiranih tleh. V šest mesečnem poskusu so bile vrednosti DHA in SIR višje v onesnaženih tleh kar dokazuje toksičnost EDTA, ki je nespecifični ligand in iz tal poleg PSK izpere tudi za življenje esencialne kovine, ki so nujne za dobro aktivnost encimov. Do podobnih rezultatov so prišli v študiji Jelušičeve (2014), kjer so ugotovili, da sta bili aktivnost talnih encimov in mikrobna biomasa kljub onesnaženosti s PSK višji v O-tleh kot v R-tleh. Zabeležili so spreminjanje aktivnost talnih encimov in SIR glede okoljske dejavnike (letni čas, rastlinska odeja, idr.) a kljub temu aktivnost encimov v R-tleh tudi po sedmih mesecih ni dosegla aktivnosti encimov O-tal. V isti študiji, pa so ugotovili tudi, da so remediirana tla (ob dodatku hidrogela in Mn) lahko primerna in plodna podlaga za izbrane okrasne rastline in trave in s tem potencialno primerna izbira za revitalizacijo onesnaženih območij. Remediacija je postopek, ki povzroči spremembe v lastnostih in funkcioniranju tal. Pred končno uporabo jim je treba dodati hranila in izboljšati njihove strukturne lastnosti ter mikrobno aktivnost.

Vedno več raziskav je torej usmerjenih tudi v ugotavljanje uspešnosti remediacijske tehnike v okviru vpliva na funkcionalnost in kakovost tal, določenih z različnimi biološkimi kazalci in ugotavljanje možnosti popolne revitalizacije remedirane zemljine. Študije se morajo izvajati za daljše časovno obdobje, saj obnovitveni procesi v tleh potekajo zelo počasi, učinkovito delovanje tal kot substrata za rastline in mikrobe pa je odvisno od mnogih medsebojnih biotskih in abiotskih dejavnikov.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Adriano D. C. 2001. trace elements in terrestrial environments; biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2 izdaja. New York, Springer-Verlag: 867 str.
- Alef K. 1995. Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. V: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Alef K., Nannipieri P. (ur.). London, Academic Press: 123-191
- Alloway B. J. 1990. The origin of heavy metals in soils. V: Heavy metals in soils. Alloway B.J. (ed.). London, New York, Willey: 29-39
- Alpaslan B., Yukselen M. A. 2002. Remediation of lead contaminated soils by stabilization/ solidification. *Water, Air and Soil Pollution*, 133: 253-263
- Alvarenga P., Palma P., Gonçalves A. P., Fernandes R. M., De Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha-Queda A. C. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) Effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere*, 74: 1301-1308
- Anderson J. P. E., Domsch K. H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 215-221
- Anderson J. P. E. 1982. Soil respiration. V: Methods of Soil Analysis Part 2, Chemical and Microbiological Properties. Page A. L., Miller R. H. (ur.). Madison, WI, American Society of Agronomy: 831-871
- Arias M. E., Gonzalez-Perez J. A., Gonzalez-Vila F. J., Ball A. S., 2005. Soil health-a new challenge for microbiologists and chemists. *International Microbiology*, 8: 13-21
- ARSO. Agencija RS za okolje in prostor. Tla. Varstvo okolja. <http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/> (17. 5. 2016)
- Baker P. G., Bishop P. L. 1997. Prediction of metal leaching rates from solidified/stabilized wastes using the shrinking unreacted core leaching procedure. *Journal of Hazardous Materials*, 52: 311-333
- Batchelor B. 2006. Overview of waste stabilization with cement. *Waste Management*, 26: 689-698
- Brookes P. C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 269-279

- Chander K., Joergensen R. G. 2008. Decomposition of Zn-rich *Arabidopsis halleri* litter in low and high metal soil in the presence and absence of EDTA. *Water, Air and Soil Pollution*, 188: 195-204
- Dahlin S., Witter E., Martensson A., Turner A., Baath E. 1997. Where's the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low level of metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1405-1415
- Doran J. W., Parkin T. B. 1994. Defining and assessing soil quality. V: Defining soil quality for a sustainable environment. Madison, Soil Science Society of America: 3-21
- Elliott H. A., Brown G. 1989. Comparative evaluation of NTA and EDTA for extractive decontamination of Pb-polluted soils. *Water, Air and Soil Pollution*, 45: 361-369
- Epelde L., Javier Hernández-Allica J. H., Becerril J. M., Blanco F., Garbisu C. 2008. Effects of chelates on plants and soil microbial community: comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction. *Science of the Total Environment*, 401: 21-28
- Finžgar N., Leštan D. 2007. Multi-step leaching of Pb and Zn contaminated soils with EDTA, *Chemosphere*, 66: 824-832
- Flathman P. E., Lanza G. R. 1998. Phytoremediation: Current views on an emerging green technology. *Journal of Soil Contamination*, 7: 415-432
- Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P., Melis P. 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. *Geoderma*, 142: 47-57
- Ghosh M., Singh, S. P. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products'. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 1: 1-18
- Greebelen W., Adriano D. C., Van der Leile D., Mench M., Carleer R., Clijsters H., Vangronsveld J. 2003. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant and Soil*, 249: 217-228
- Hamon R. E., McLaughlin M. J. 1999. Use of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* for bioavailable contaminant stripping. Wenzel, W.W, (Ed.) *Proceeding of the Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*, Vienna, Austria: 908-909
- Isermeyer H. 1952. Eine Einfache Methode sur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 56: 26-38

- Janssen R. P. T., Peijnenburg W. J. G. M., Posthuma L., Van Den Hoop M. A. G. T. 1997. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. 1. Relationship between metal partitioning coefficient and soil characteristics. *Environmental Toxicology Chemistry*, 16: 2470-2478
- Jaworska J. W., Schowanek D., Feijtel T. C. J. 1999. Environmental risk assessment for trisodium (S,S)-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent application. *Chemosphere*, 38: 3597-3625
- Jelušič M. 2014. Kakovost in funkcioniranje onesnaženih vrtnih tal po remediaciji. Dokt. Disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 105 str.
- Jelušič M., Grčman H., Vodnik D., Suhadolc M., Leštan D. 2013. Functioning of metal contaminated garden soil after remediation. *Environmental Pollution*, 174: 63-70
- Joergensen R. G., Emmerling C. 2006. Review Article Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 295-309
- Karlen D. L., Mausbach M. J., Doran J. W., Cline R. G., Harris R. F., Schuman G. E. 1997. Soil quality: Concept, rationale, and research needs. *Soil Science Society of America Journal*, 61: 4-10
- Kieft L. T., Soroker E., Firestone M. K. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when a dry soil is wetted. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 119-126
- Kos B., Leštan D. 2003. Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant and Soil*, 253: 403-11
- Lee S. H., Lee J. S., Choi Y. J., Kim J. G. 2009. In situ stabilization of cadmium-, lead- and zinc-contaminated soil using various amendments. *Chemosphere*, 77: 1069-1075
- Leštan D. 2002. Ekopedologija (ekologija in varstvo tal). Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (interno gradivo)
- Leštan D. 2014. Kakovost in funkcioniranje onesnaženih vrtnih tal kot rastlinski substrat po remediaciji. Raziskovalni projekt J4-3609, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. <http://www.dlib.si/?URN=URN:NBN:SI:DOC-3HCPWFZD> (12. 2. 2015)
- Leštan D., Luo C., Li X. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal contaminated soil: A review. *Environmental Pollution*, 153: 3-13
- Li X. D., Poon C. S., Sun H., Lo I. M. C., Kirk D. W. 2001. Heavy metal speciation and leaching behaviors in cement based solidified/stabilized waste materials. *Journal of Hazardous Materials A*, 82: 215-230

- Mausbach M. J. 1996. Soil Quality Considerations in the Conversion of CRP Land to Crop Production Presented at CRP-96 Conference: Preparing for Future CRP Land use in the Central and Southern Great Plains, October, Marillo, Texas: 22-23
- Mühlbachova G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. *Ecological Engineering*, 37: 1064-1071
- Mulligan C. N., Young R. N., Gibbs B. F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193-207
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M. T., Landi L., Pietramellara G., Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54: 655-670
- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. V: *Soil Biochemistry*, 6. Bollag J. M., Stotzky G. (ur.). New York, Marcel Dekker: 293-355
- Natividad A., Timoneda J., Batlle-Sales J., Bordás V., Murgui A. 1998. New Method for Measuring Dehydrogenase Activity in Soils. Symposium 41.
<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56b1d94364e9b22e608b45a0&assetKey=AS%3A324994207895580%401454496065820> (25. 4. 2014)
- Navarro M. C., Pérez-Sirvent C., Martínez-Sánchez M. J., Vidal J., Marimón J. 2006. Lead, cadmium and arsenic bioavailability in the abandoned mine site of Cabezo Rajao (Murcia, SE Spain). *Chemosphere*, 63: 484-489
- Nowack B. 2008. Chelating agents and the environment. *Environmental Pollution*, 153: 1-2
- Oliveira A., Pampulha M. E. 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 3: 157-161
- Paria S., Yuet P. K. 2006. Solidification-stabilization of organi and inorganic contaminants using portland cement: a literature review. *Environmental Reviews*, 14: 217-255
- Peters R. W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 66: 151-210

- Pierce F. J., Larson W. E. 1993. Developing criteria to evaluate sustainable land management. V: Proceedings of the Eighth International Soil Management Workshop: Utilization of Soil survey Information for Sustainable Land Use. Kimble J. M. (ur.). Lincoln, National Soil Survey Center: 7-14
- Plavc Ž. 2007. Frakcionacija in biodosegljivost svinca in cinka v glistinah deževnikov pred in po remediaciji tal, Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 30 str.
- Pochon J., Tardieux P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition de la Tourelle, Saint Mandé, INRA Press, Paris, France
- Rieuwerts J. S., Thornton I., Farago M. E., Ashmore M. R. 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10, 2: 61-75
- Ridvan K., Tayfun A., Betül B., Mustafa S. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology*, 40, 2: 95-102
- Sapoundjieva, K., Kartalska, Y., Vassilev, A., Naidenov, M., Kuzmanova, I., Krastev, S. 2003. Effects of the chelating agent EDTA on metal solubility in the soil, metal uptake and performance of maize plants and soil microorganisms. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 9: 659-663
- Schlöter M., Dilly O., Munch J. C. 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98, 1-3: 255-262
- Stopar D., Stres B., Mahne I. 2009. Praktikum iz mikrobne ekologije za študente mikrobiologije. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.
- Suhadolc M. 2013. Biotski indikatorji kakovosti tal. V: Novi izzivi v agronomiji 2013: zbornik simpozija. Zreče, 2013. Ljubljana, Slovensko agronomsko društvo: 50-55
- Thalmann A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden 504 mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC): *Landwirtschaftliche Forschung*, 21: 249-259
- Udovič M., Plavc Z., Leštan D. 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere*, 70: 126-134
- Ultra Jr. V. U., Yano A., Iwasaki K., Tanaka S., Kang-YuMei, Sakurai, K. 2005. Influence of chelating agent addition on copper distribution and microbial activity in soil and copper uptake by brown mustard (*Brassica juncea*). *Soil Science and Plant Nutrition*, 51: 193-202

Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996.
Ur. l. RS, št. 68/96

Vidic J. N. 1995. Material za vaje iz geologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Univerze
v Ljubljani, Katedra za pedologijo, prehrano rastlin in ekologijo (interno gradivo)

WTW. Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG.

<http://www.wtw.com/en/products/product-categories/benchtop-meters/oxitopr-measuring-systems/oxitopr-control-b-6.html> (14.2.2013)

Zhang F.P., Li C. F., Tong L. G., Yue L. X., Li P. 2010. Response of microbial characteristics to heavymetal pollution of mining soils in central Tibet, China. *Applied Soil Ecology*, 45: 144-151

Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 68 str.

7.2 DRUGI VIRI

- Ananyeva N. D., Polyanskaya L. M., Susyan E. A., Vasenkina I. V., Wirth S., Zvyagintsev D. G. 2008. Comparative Assessment of Soil Microbial Biomass Determined by the Methods of Direct Microscopy and Substrate-Induced Respiration, *Mikrobiologiya*, 77, 3: 404-412
- Chu H., Lin X., Fujii T., Morimoto S., Yagi K., Hu J., Zhang J. 2007. Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 2971-2976
- Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B., Leštan D. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil*, 235: 105-114
- Kızılkayaa R., Aşkınb T., Bayraklıa B., Sağlamc M. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology*, 40, 2: 95-102
- Lindsay W. L., Norvell W. A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428
- Seybold C. A., Herrick J. E., Brejda, J. J. 1999. Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Science*, 164: 224-234
- Suhadolc M., Schroll R., Gattinger A., Schloter M., Munch J. C., Leštan D. 2004. Effects of modified Pb-, Zn-, and Cd-availability on the microbial communities and on the degradation of isoproturon in a heavy metal contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1943-1954
- Tica D. 2013. Dostopnost kovin v onesnaženih tleh po remediaciji z metodo stabilizacije, Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta Ljubljana: 101 str.
- Tica D., Udovič M., Leštan D. 2013. Long-term efficiency of soil stabilization with apatite and Slovakite: The impact of two earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Dendrobaena veneta*) on lead bioaccessibility and soil functioning, *Chemosphere*, 91: 1-6
- Udovič M., Leštan D. 2009. Pb, Zn and Cd mobility, availability and fractionation in aged soil remediated by EDTA leaching, *Chemosphere*, 74: 1367-1373
- Wu L. H., Luo Y. M., Xing X. R., Christie P. 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102: 307-318

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Domnu Leštanu za ponujeno možnost, spodbudo in strokovne nasvete ter pomoč pri pregledu diplomskega dela.

Posebej bi se rada zahvalila asist. dr. Metka Udovič, univ. dipl. inž. biol., ki mi je stala ob strani pri praktični izvedbi poskusa.

Posebna pozornost in zahvala za ponovno obujen, pozabljen, nedolžen otroški pogled na svet pa gre hčerkama Naii in Rei.

Hvala tudi zaročencu Aleksandru za razumevanje, potrpežljivost, uspešno spodbujanje in vso podporo pri izdelavi dela.

Velika zahvala gre tudi mojim staršem in bratu, ki so mi ta študij omogočili in me v vseh teh letih podpirali in spodbujali.