

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Simon GLUHAR

**BIODOSTOPNOST NEVARNIH KOVIN PO
REMEDIJACIJI ONESNAŽENIH TAL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Simon GLUHAR

**BIODOSTOPNOST NEVARNIH KOVIN PO REMEDIACIJI
ONESNAŽENIH TAL**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

BIOAVAILABILITY OF METALS AFTER REMEDIATION

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija biotehnologije (2. stopnja). Opravljeno je bilo na Katedri za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Centru za pedologijo in varstvo okolja (CPVO) Oddelka za pedologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje biotehnologije je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Domna Leštana.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga 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.

Simon Gluhar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 631.453:504.5:546.47/.48:546.815(043.2)
KG remediacija/potencialno nevarne kovine/*Brassica rapa* var. *chinensis* /*Porcellio scaber*/EDTA/UBM/SOP/model IEUBK/svinec/kadmij/cink/biodostopnost
AV GLUHAR, Simon
SA LEŠTAN, Domen (mentor)
KZ SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN BIODOSTOPNOST NEVARNIH KOVIN PO REMEDIACIJI ONESNAŽENIH TAL
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP IX, 43 str., 11 pregl., 18 sl., 64 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Vzorce tal iz Mežiške doline, ki so močno onesnaženi s potencialno nevarnimi kovinami (svinec, cink in kadmij), smo remedirali v pilotni remediacijski napravi s pranjem z vodno raztopino dinatrijeve soli etilendiamintetraoetne kisline. V remediranih in originalnih tleh smo določili pedološke lastnosti, koncentracijo ter biodostopnost svineca, cinka in kadmija za ljudi in testne organizme. Za določanje biodostopnosti potencialno nevarnih kovin za ljudi smo uporabili dve *in vitro* metodi: enotno metodo za določanje biodostopnosti (UBM) in standardni operativni postopek za *in vitro* določanje biodostopnosti svineca v tleh (SOP). Z modelom IEUBK (the integrated exposure uptake biokinetic model) smo določili verjetno koncentracijo Pb v krvi otrok v Mežiški dolini pred in po remediaciji. Fitodosegljivost potencialno nevarnih kovin smo določali s prevzemom v kitajski kapus (*Brassica rapa*) v lončnem poskusu. Biodosegljivost za talne organizme smo določili z merjenjem bioakumulacije potencialno nevarnih kovin v laboratorijsko gojenih rakah enakonožcih (*Porcellio scaber*). Z remediacijo smo znižali celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd od 11 do 66 %, ter biodostopno koncentracijo Pb do 72 %, Zn do 62 % in Cd do 69 % v želodčni fazi (SOP). V črevesni fazi (UBM) smo biodostopnost Pb znižali do 95 %, Zn do 90 % in Cd do 68 %. Pri lončnem poskusu smo za rastline biodostopno koncentracijo Zn znižali do 73 %, Cd do 79 %; pri Pb pa je bila večina rezultatov pod mejo detekcije. Biodostopnosti Pb in Zn za rake enakonožce smo znižali do 34 % in 39 %. Biodostopnost Cd za rake enakonožce smo v povprečju znižali do 27 %.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 631.453:504.5:546.47/.48:546.815(043.2)
CX remediation/potential toxic metals/ *Brassica rapa var. chinensis*/*Porcellio scaber*/ EDTA / UBM/SOP/IEUBK model/lead/cadmium/zinc/bioavailability
AU GLUHAR, Simon
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Universtiy of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI BIOAVAILABILITY OF TOXIC METALS AFTER POLLUTED SOIL
REMEDICATION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO IX, 43 p., 11 tab., 18 fig., 64 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Samples of soils from Mežica valley, which are heavily contaminated with potential toxic metals (lead, zinc and cadmium), was remediated in pilot-scale extraction plant with aqueous solution of ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt. We analyzed soil samples for pedological properties, toxic metal concentration and lead, zinc and cadmium bioavailability for human and test organisms. The amount of potential toxic metals available for human was determined by two *in vitro* methods: The unified bioaccessibility method (UBM) and Standard operating procedure for *in vitro* bioaccessibility assay for lead in soil (SOP). To determine probable concentration of lead in children`s blood we used IEUBK model (the integrated exposure uptake biokinetic model). For determination of fitoavailability of potential toxic metals we used pot experiment with Chinese cabbage (*Brassica rapa var. chinensis*). Bioavailability for soil organisms we determined with measurements of potential toxic metals bioaccumulation in isopods *Porcellio scaber* in laboratory experiment. With remediation process we decreased total concentration of lead, zinc and cadmium from 11 to 66 %. Bioaccessibility for Pb, Zn and Cd in gastric phase (SOP) was lowered up to 72 %, 62 % and 69 %. In intestinal phase (UBM) Pb, Zn and Cd bioaccessibility decreased up to 95 %, 90 % and 68 %. Remediation also reduced Zn and Cd phytoavailability in pot experiment up to 73 % and 68 %. Fitoavailability for Pb was in almost all results below the limit of detection. We lowered Pb and Zn bioavailability up to 34 % and 39 % for isopods. Bioavailability for Cd was in average lowered up to 27 %.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 CILJ	2
1.2 HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 POTENCIALNO NEVARNE KOVINE.....	3
2.1.1 Svinec	3
2.1.1.1 Svinec in rastline	4
2.1.1.2 Svinec in ljudje	4
2.1.1.3 Svinec in živali	5
2.1.2 Kadmij	5
2.1.2.1 Kadmij in rastline	6
2.1.2.2 Kadmij in ljudje	6
2.1.2.3 Kadmij in živali	6
2.1.3 Cink.....	7
2.1.3.1 Cink in rastline	7
2.1.3.2 Cink in ljudje	8
2.1.3.3 Cink in živali	8
2.2 <i>Porcellio scaber</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA DOLOČANJE BIODOSTOPNOSTI POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH.....	8
2.3 <i>Brassica rapa var. chinensis</i> KOT MODELNI ORGANIZEM ZA DOLOČANJE BIODOSTOPNOSTI POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH.....	9
2.4 REMEDIACIJSKE TEHNOLOGIJE ZA ČIŠČENJE TAL ONESNAŽENIH S POTENCIALNO NEVARNIMI KOVINAMI	10
2.4.1 Ex situ metoda spiranja tal s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	10
2.4.1.1 Testi biodosegljivosti kovin po remediaciji s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)	11

2.4.1.2	Vpliv remediacije s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) na tla.....	12
2.4.1.3	Vpliv remediacije s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) na rast rastlin	12
3	METODE DELA	13
3.1	VZORČENJE VZORCEV TAL.....	13
3.2	REMEDIJACIJA VZORCEV.....	14
3.3	DOLOČANJE POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH.....	15
3.4	FITODOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN	15
3.4.1	Priprava tal	15
3.4.2	Lončni poskus	16
3.4.3	Rastlinski razklop	16
3.5	UBM TEST	17
3.6	STANDARDNI OPERATIVNI POSTOPEK ZA <i>IN VITRO</i> BIODOSTOPNOST SVINCA V TLEH (SOP)	17
3.7	BIDODOSEGLJIVOST V KOPENSKIH RAKIH ENAKONOŽCIH <i>Porcellio scaber</i>	18
3.7.1	Nabiranje živali in priprava tal	18
3.7.2	Gojenje živali na vzorcih tal	18
3.7.3	Kislinski razklop živali	18
3.8	STATISTIČNE METODE	18
3.9	ANALITSKE METODE	18
3.9.1	Merjenje pH	18
3.9.2	Določanje organske snovi in teksturnega razred	19
3.9.3	Določanje karbonatov	19
4	REZULTATI	20
4.1	PEDOLOŠKE LASTNOSTI TAL	20
4.2	VSEBNOST KOVIN V TLEH PRED IN PO REMEDIACIJI.....	21
4.3	ORALNA BIDODOSEGLJIVOST Pb, Zn IN Cd.....	24
4.3.1	Oralna biodosegljivost potencialno nevarnih kovin iz tal v črevesni fazi	24
4.3.2	Oralna biodosegljivost potencialno nevarnih kovin v tleh v želodčni fazi	26
4.4	BIDODOSEGLJIVOST Pb, Zn in Cd V TESTNI RASTLINI <i>Brassica rapa var. chinensis</i>	28
4.5	BIDODOSEGLJIVOST Pb, Zn IN Cd V TESTNIH TALNIH ŽIVALIH <i>Porcellio scaber</i>	29

5	RAZPRAVA	32
5.1	SPLOŠNE LASTNOSTI VZORCEV TAL	32
5.2	BIODOSEGLJIVOST KOVIN ZA ČLOVEKA (<i>in vitro</i> metoda).....	33
5.3	BIODOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN ZA RASTLINE (poskus z <i>Brassica rapa var chinensis</i>)	34
5.4	BIODOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN ZA TALNE ŽIVALI (poskus s <i>Porcellio scaber</i>).....	35
6	SKLEPI	37
7	POVZETEK	38
8	VIRI	39
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oznake vzorcev z GPS koordinatami	13
Preglednica 2: Pedološke lastnosti originalnih vzorcev tal	20
Preglednica 3: Pedološke lastnosti remediranih vzorcev tal	20
Preglednica 4: Koncentracija Pb (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Pb iz tal	21
Preglednica 5: Koncentracija Zn (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Zn iz tal	22
Preglednica 6: Koncentracija Cd (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Cd iz tal	23
Preglednica 7: Verjetna koncentracija Pb v krvi otroka (IEUBK model)	28
Preglednica 8: Koncentracija Pb v <i>B. rapa</i>	28
Preglednica 9: Koncentracija Zn v <i>B. rapa</i>	29
Preglednica 10: Koncentracija Cd v <i>B. rapa</i>	29
Preglednica 11: Rezultati statistične primerjave vsebnosti Cd, Pb in Zn v telesu rakov <i>P. scaber</i> , izpostavljenih remediranim in originalnim tlom, z Studentovim t-testom.	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Rak enakonožec (<i>Porcellio scaber</i>)	9
Slika 2: Kitajski kapus (<i>Brassica rapa var. chinensis</i>)	10
Slika 3: Zemljevid Mežiške doline z označenimi vzorčnimi mesti.....	13
Slika 4: Shema procesa remediacije tal s pomočjo spiranja tal z EDTA	15
Slika 5: Shema lončnega poskusa.....	16
Slika 6: Lončni poskus z kitajskim zeljem (<i>B. rapa</i>)	16
Slika 7: Koncentracija Pb v tleh pred in po remediaciji.....	21
Slika 8: Koncentracija Zn v tleh pred in po remediaciji.....	22
Slika 9: Koncentracija Cd v tleh pred in po remediaciji.....	23
Slika 10: Biodostopna koncentracija Pb v tleh.....	24
Slika 11: Biodostopna koncentracija Zn v tleh.....	25
Slika 12: Biodostopna koncentracija Cd v tleh.. ..	25
Slika 13: Biodosegljiva koncentracija Pb v tleh.....	26
Slika 14: Biodosegljiva koncentracija Zn v tleh.....	27
Slika 15: Biodosegljiva koncentracija Cd v tleh.. ..	27
Slika 16: Koncentracija Pb v telesu rakov <i>P. scaber</i> po gojenju na vzorcih tal.....	30
Slika 17: Koncentracija Zn v telesu rakov <i>P. scaber</i> po gojenju na vzorcih tal.....	30
Slika 18: Koncentracija Cd v telesu rakov <i>P. scaber</i> po gojenju na vzorcih tal	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
Na-EDTA	Dinatrijeva sol etilendiamintetraocetne kisline
Pb	Svinec
Zn	Cink
Cd	Kadmij
UBM	Enotna metoda za določanje biodostopnosti
CPVO	Center za pedologijo in varstvo okolja
H ₂ SO ₄	Žveplova (VI) kislina
HCl	Klorovodikova kislina
HNO ₃	Dušikova (V) kislina
FAAS	Plamenski atomski absorpcijski spektrofotometer
MnSO ₄ x 4H ₂ O	Manganov sulfat
NaOH	Natrijev hidoksid
IEUBK model	Integrirani biokinetični model za računanje izpostavljenosti in privzema svinca
SOP	Standardni operativni postopek
IVBA	<i>In vitro</i> biodosegljivost
RBA	Relativna biodosegljivost
ABA	Absolutna biodosegljivost
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>
<i>P. scaber</i>	<i>Porcellio scaber</i>

1 UVOD

Tla so nastala s preperevanjem kamninske osnove in nastajanjem humusa ob razgradnji organskih ostankov v tleh. In ravno zaradi teh procesov, ki so počasni, tla uvrščamo med neobnovljive naravne vire (Zupan in sod., 2008). So edinstven vir, ki nam omogoča življenje na našem planetu. Tega se današnja hitro naraščajoča družba ne zaveda in močno pritiska nanj in ga obremenjuje s svojimi vedno večjimi zahtevami po pridobivanju hrane in energije (Ashraf in sod., 2014). Potrebe po energiji nam večinoma zagotavlja rudarjenje oziroma z njim povezana industrija, ki pa spreminja rodovitna in za gojenje rastlin primerna tla v onesnažena tla. Prav tako rudarska industrija proizvaja ogromne količine drugih odpadkov, ki ob odlaganju zavzamejo velik del pokrajine (Li, 2006). Poleg rudarske industrije na onesnaženost tal vplivajo ali so vplivali tudi osvinčeni bencin in barve, uporaba pesticidov in gnojil, petrokemična industrija, uporaba blata iz čistilnih naprav, izpuščanje odpadne vode v okolje. Problem pri onesnaževanju tal s potencialno nevarnimi kovinami je ta, da se te kovine v tleh lahko zadržujejo dolgo časa, saj se večine od njih ne da razgraditi z mikrobno ali kemijsko degradacijo. Lahko se pojavijo zgolj spremembe v njihovi kemijski formi in biološki dostopnosti (Wuana in Okieimen, 2011).

Ena od najbolj prizadetih lokacij s strani rudarske industrije v Sloveniji je Mežiška dolina. Začetki rudarjenja in taljenje svinca in cinka tam segajo v leto 1665. Celotna dejavnost je trajala kar 329 let. Do druge polovice 19. stoletja so bili rudniki in talilniki razporejeni po celotni dolini. Nato pa so leta 1893 v Žerjavu zgradili centralno talilnico. Prve filtre, ki bi preprečevali prašne emisije, so vgradili leta 1923 in jih nato še večkrat dogradili in tako do leta 1978 za 70-krat zmanjšali izpuste prašnih emisij (Finžgar in sod., 2013). Potencialno nevarne kovine iz tal prehajajo v rastline in živali. Preko njih potencialno nevarne kovine zaidejo tudi v človeško prehrano. Največje tveganje za izpostavljenost ljudi potencialno nevarnim kovinam pa predstavljajo prašni delci, ki prehajajo v naše telo preko dihanja ali z direktnim vnosom onesnaženih tal v usta ter pitjem onesnažene vode (Finžgar in Leštan, 2008).

Ker potencialno nevarne kovine ostajajo v tleh, je za obnovo onesnaženega talnega ekosistema edina rešitev čiščenje oziroma remediacija tal. Obstaja več različnih načinov čiščenja tal. Med najpogostejšimi so imobilizacija, pranje tal in fitoremediacijske tehnike. Pri izbiri metode čiščenja je pomembna ocena tveganja, s katero izberemo cenovno najugodnejšo in okolju najmanj škodljivo metodo (Wuana in Okieimen, 2011).

Za čiščenje tal oziroma remediacijo tal iz Mežiške doline smo izbrali metodo pranja tal s kemijskim ligandom Na-EDTA. Za remediacijo tal smo uporabili pilotno napravo, ki sta jo razvila Voglar in Leštan (2013). S tehniko spiranja tal z EDTA lahko iz tal odstranimo topne in šibko vezane kovine, medtem ko netopne in močno vezane kovine ostanejo v tleh. Ker so močno vezane kovine tudi biološko nedostopne in zato netoksične za organizme, metodo lahko uporabljamo za čiščenje tal (Finžgar in Leštan, 2007).

Biološko dosegljivost kovin v tleh pred in po remediaciji smo opazovali v simuliranih človeških črevesnih raztopinah, v testnih rastlinah kitajskega kapusa (*Brassica rapa var. chinensis*) in v kopenskih rakih enakonožcih (*Porcellio scaber*).

1.1 CILJ

S poskusi bomo ugotovili kolikšen del Pb, Zn in Cd je po izpiranju tal z dinatrijevo soljo etilendiamintetraoetne kisline (Na-EDTA) v pilotni remediacijski napravi dosegljiv v simulirani človeški črevesni raztopini, v testnih rastlinah (*Brasica rapa var. chinensis*) in kopenskih rakih enakonožcih (*Porcellio scaber*).

1.2 HIPOTEZA

Z remediacijo odstranimo topne in šibko vezane kovine iz tal, v tleh preostale kovine pa so predvidoma za testne organizme biološke nedostopne, ker so netopne in močno vezane v tleh.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 POTENCIALNO NEVARNE KOVINE

Kemijska definicija kovine se glasi: »Elementi, ki prevajajo elektriko, imajo kovinski sijaj, so kovni in prožni, tvorijo katione in imajo osnovne okside.« Ta definicija je zelo široka in lahko predstavlja številne elemente. Danes v izrazoslovju obstajajo številni izrazi, ki poskušajo določiti posamezne skupine kovin, vendar tudi pri teh izrazih najdemo številne pomanjkljivosti. Težava pri vseh izrazih, ki jih uporabljamo, je, da zajamejo elemente, ki so si povsem različni tako po svoji funkcionalnosti kot v bioloških ali toksikoloških lastnostih. Poleg tega pa se seveda v izrazu »kovina« po navadi obravnava tudi številne skupine spojine določenega elementa. Poenostavljanje in razvrščanje je lahko zelo uporabno in za elemente, ki imajo podobne lastnosti, zelo lahko, težavno pa postane pri kovinskih elementih. Res je, da imajo določene lastnosti, ki so jim skupne, vendar pa je vsak element drugačen in ima svoje lastne fizikalno-kemijske karakteristike, ki določajo njegove biološke in toksikološke lastnosti in kako se bodo gibali v okolju. Poleg tega pa vsak element lahko obstaja še kot del različnih kemijskih spojin, ki imajo lahko povsem drugačne lastnosti (Duffus, 2002).

Zaradi vseh zgoraj naštetih dejstev in težavnosti pri iskanju izraza, ki bi zajel vse tri obravnavne elemente v moji magistrski nalogi, sem se odločil, da bom za svinec, kadmij in cink, ki jih po kemijskih lastnostih oziroma glede na periodni sistem ne moremo uvrstiti v nobeno skupino (Duffus, 2002), za poimenovanje teh treh elementov ter njihovih komponent uporabljali izraz potencialno nevarne kovine oziroma izraze svinec, kadmij in cink. Ob tem se zavedam dejstva, da izraz kovina ni najbolj primeren, kajti nakazuje na to, da imajo kovina ter njene kemijske spojine enake fizikalno-kemijske, biološke in toksikološke lastnosti, kar pa ne drži (Duffus, 2002). Za ta izraz sem se odločil, ker te tri elemente na področju Mežiške doline, ki je obravnavana v tem magistrskem delu, označujemo kot potencialno nevarnost za žive organizme v tem okolju.

2.1.1 Svinec

Svinec je kovina, ki spada v IV skupino in 6 periodo v periodnem sistemu. Njegova molska masa je $207,2 \text{ mol g}^{-1}$, tališče pa je pri $327,4 \text{ °C}$. V naravi se pojavlja kot sivo-modra kovina, ki jo pogosto najdemo v mineralih, kjer je združena z drugimi elementi, kot sta na primer žveplo ali kisik. Njegova koncentracija v skorji zemlje variira med 10 do 30 mg kg^{-1} , v vrhnjih tleh pa med 10 do 67 mg kg^{-1} (Wuana in Okieimen, 2011). V naravni svinčevi rudi najdemo predvsem svinčev sulfid, svinčev sulfat, svinčev karbonat in svinčev kloroarzenat ter svinčev klorofosfat (Childhood lead ..., 2010). Najpogostejše oblike Pb, s katerimi onesnažujemo tla, so ionske oblike (Pb^{2+}), svinčevi oksidi, hidroksidi ter svinčeno-kovinski oksoanionski kompleksi (Wuana in Okieimen, 2011).

Glavni viri onesnaževanja s Pb so: osvinčeni bencin, svinec aktivne industrije (predvsem rudarjenja), barve in pigmenti, spajkanje konzerv, vodovodni sistemi s svinčenimi pipami in cevmi, svinec iz hrane, ki se onesnaži zaradi onesnaženih tal, seveda tudi ostanki svinca v tleh zaradi nekdanje industrije (Childhood lead ..., 2010), ne smemo pa pozabiti na vplive iz kmetijstva, kot so gnojila in pesticidi (Sharma in Dubey, 2005). Večino tega

svinca se tako sprošča v zrak, kjer lahko manjši delci prepotujejo velike razdalje. Velikost delca je zelo pomembna, saj odloča, kako daleč bo delec prepotoval. Večji delci s premerom nad 2 μm prepotujejo kratko razdaljo okrog 25 metrov, medtem ko manjši delci lahko prepotujejo več 1000 kilometrov. Pri topilnicah je mediana premera delcev 1,5 μm , od tega jih ima 86 % manjšega od 10 μm . Delci v zraku se nato z dežjem sperejo iz ozračja in padejo na tla ali v nadzemne vode. Ko svinec pristane v tleh, se močno veže na talne delce in ostaja v zgornjih slojih tal. Zato, če prav danes večina zgoraj naštetih dejavnosti ne uporablja več svinca, ima pretekla uporaba še vedno vpliv na količino svinca v tleh. Svinec se tako zadržuje znotraj tal in njegovo premikanje je odvisno od lastnosti tal in seveda oblike svinca, ki se je sprostila v tla. Svinec se tako skozi leta lahko kopiči v tleh (Case studies..., 2010).

2.1.1.1 Svinec in rastline

Svinec iz tal lahko prehaja v rastline in se v njih koncentrira. Pri rastlinah je večino svinca prisotnega na njihovi površini kot posledica delcev, ki se nanjo posedejo iz ozračja, nekaj svinca pa je prisotnega tudi v notranjih rastlinskih tkivih. Glavni mehanizem vstopa svinca v notranja tkiva rastline je skozi koreninski sistem (Case studies ..., 2010). Sama absorpcija svinca v rastlino je močno odvisna od lastnosti tal (velikost talnih delcev, katinska izmenjevalna kapaciteta tal) in seveda lastnosti rastline (velikost korenin, koreninski izločki, mikorizacija korenin, hitrost transpiracije). Svinec se v zemlji nahaja kot šibka Lewisova kislina, ki tvori ionske ali kovalentne vezi v tleh ali rastlini. Posledica tega je tudi, da je navadno v tleh močno vezan na organske ali koloidne delce ali pa je prisoten kot precipitat. Vse te lastnosti svinca zmanjšujejo možnosti za večji prenos svinca v korenine (Sharma in Dubey, 2005). Pot vnosa svinca po koreninskem sistemu navadno poteka po apoplastni poti, ker pa ga je več kot 90 % v netopni obliki, se ga večina veže na zunanje dele celične stene, preostali del pa se akumulira v endodermisu, kjer mu Kasparijeva proga preprečuje nadaljnjo pot v poganjke. Seveda se ga del vseeno lahko prenese po simplastni poti v poganjke. Pri nizkih koncentracijah svinca ta v simplast vstopa le v hitrodelečih se celicah, ki še nimajo dobro razvite celične membrane, medtem ko pri visokih koncentracijah pride do porušitve celične membrane in zato začne svinec zelo hitro prehajati v simplast, čemur lahko sledi tudi odmrtnje rastline. Eden glavnih mehanizmov prehajanja svinca v simplast naj bi pri normalnih pogojih bili Ca-kanalčki (Sharma in Dubey, 2005; Pourrut in sod., 2013).

2.1.1.2 Svinec in ljudje

Svinec je kovina, ki ima velik vpliv na zdravje ljudi. Visoke koncentracije svinca praktično vplivajo na vse organe in organske sisteme. Predvsem so prizadeti centralni in periferni živčni sistem, ledvice in krvotvorni organi. Svinec lahko deluje akutno- in kronično-nevrotoksično. Skupina z največ tveganja so otroci stari do 7 let (Juričič in sod., 2013). Otroci absorbirajo 40–50 % zaužitega svinca, medtem ko ga odrasli zgolj 10 %. Otroci v telesu zadržijo tudi do 30 % absorbiranega svinca, medtem ko ga odrasli zgolj 1 %. Toksična raven svinca v krvi za otroke je 10 $\mu\text{g dL}^{-1}$ ali več, čeprav raziskave kažejo, da tudi nižja raven svinca že škoduje razvoju in kognitivnim funkcijam otroka, zato se danes nagibajo k vzpostavitvi meje 5 $\mu\text{g dL}^{-1}$ (Exposure to cadmium ... 2010). Vodilni zdravstveni inštitut v Združenih državah Amerike je že leta 2012 priporočal znižanje meje

koncentracije Pb v krvi na $5 \mu\text{g dL}^{-1}$, saj so njihove raziskave pokazale, da praktično ni mogoče določiti neke meje, pri kateri koncentracija svınca v otrokovi krvi ne bi škodovala otrokovemu zdravju (Stewart in sod., 2014). Mielke in sod. (2011) so odkrili povezavo med izpostavljenostjo otrok svincu ter njihovim učnim sposobnostim. Povečana absorbcija svınca v otrocih je posledica hitre rasti in hitrega razvoja možganov v času odraščanja, zato je v času odraščanja otrok zelo pomembno, da so otroci čim manj izpostavljeni svincu. Posebej je pomembno obdobje nosečnosti, saj so koncentracije svınca v krvi matere enake koncentraciji svınca v krvi otroka. Zavedati se moramo tudi, da nam količina svınca v krvi pove zgolj kakšna je bila izpostavljenost svınca pred kratkim časom, šele meritve svınca v kosteh nam lahko povedo, kakšna je bila dejanska dolgotrajna izpostavljenost svincu. In ker vemo, da se v nosečnosti poveča odstranjevanje svınca iz kosti matere in se tako koncentracije v krvi povečajo, so pomembne za zdravje otrok tudi prejšnje dolgotrajne izpostavljenosti svincu.

Glavna pot vstopa svınca v telo je sicer požiranje onesnažene zemlje in prahu. V povprečju naj bi otrok med prvim in šestim letom zaužil 100–400 mg prahu in zemlje na dan (Exposure to cadmium ..., 2010). Večina svınca (od 95 do 99 %), ki vstopi skozi prebavni trakt, se v telesu veže na eritrocite in se razprši po mehkih tkivih in kosteh, lahko pa ga najdemo tudi v laseh in nohtih. Glavni mehanizem shranjevanja svınca v kosteh je podoben mehanizmu kalcija. V krvi svinec ostane do 30 dni, potem pa se izloči z urinom, medtem ko v kosteh lahko ostane tudi več kot 20 let in se ob pojavu osteoporoze začne ponovno sproščati v kri (Rosin, 2009).

2.1.1.3 Svinec in živali

Okolje, ki je zaradi rudniške in talilne industrije onesnaženo s svincem, je škodljivo tudi za živali, ki lahko svinec pridobijo preko prehranskih verig ali s požiranjem onesnaženih tal. Določanje okoljskih kriterijev za dovoljene koncentracije Pb, ki še ne bi škodile organizmu, je težko zaradi različnih poti vstopa svınca v telo živali ter različne občutljivosti nanj. Okoljsko tveganje za prostoživeče živali tako temelji na določanju sprejemljivega odmerka svınca, ki ga žival še lahko zaužije. Ta temelji na laboratorijskih toksikoloških študijah in modelih, ki določajo, kakšna je možna izpostavljenost živali preko prehranjevalne verige. Za razliko od človeka, kjer je pri določanju nevarne koncentracije v krvi pomemben predvsem nevrolški razvoj, je pri prostoživečih živalih pomemben zgolj vpliv na razmnoževanje in rast. Tako je za sesalce določena meja koncentracije svınca v krvi pri $35 \mu\text{g/dL}$, za ptice pa kar $50\text{--}100 \mu\text{g/dL}$ (Buekers in sod., 2009).

2.1.2 Kadmij

Kadmij je kovina, ki spada v 12 skupino in 5 periodo periodnega sistema. Okarakteriziramo ga kot mehko srebrno-belo ali modro-belo kovino. Kadmij večinoma najdemo v cinkovih, bakrenih in svinčevih rudah. Znotraj zemeljske skorje se njegova koncentracija giblje med $0,1$ in $0,5 \text{ mg g}^{-1}$. Večino kadmija se danes pojavlja kot stranski proizvod pri pridobivanju in taljenju neželeznih rud, kot so cink, svinec in baker. Zato ga najdemo tudi v okoljih, ki imajo večletno zgodovino rudarjenja s temi rudami. Zaradi njegovih unikatnih fizičnih, mehanskih in elektrokemijskih lastnosti se danes uporablja kot

pigment, stabilizator, v elektronskih zlitinah in sestavinah, največ (85 %) pa se ga uporabi za nikelj-kadmijeve baterije (International Cadmium association, 2015). Kadmij je zaradi svoje visoke toksičnosti in dobre topnosti v vodi okarakteriziran kot zelo močni onesnaževalec (Benavides in sod., 2005).

2.1.2.1 Kadmij in rastline

Kadmij je neesencialni element, ki zelo negativno vpliva na razvoj in rast rastlin. Je zelo mobilni in že pri nizkih koncentracijah povzroča poškodbe na rastlinah. Večinoma kadmij v rastlino vstopa skozi korenine in te seveda tudi najprej doživijo poškodbe s strani kadmija. Nato potuje po apoplastni in simplastni poti do ksilema, preko katerega se lahko transportira v nadzemne dele rastline. Vendar se le majhen del absorbiranega kadmija prenese v nadzemne dele rastline, večino ga namreč ostane v koreninah. Kadmij v celice vstopa preko kationskih prenašalcev. Večino se ga veže na celične stene, nekaj pa tudi na zunaj-celične ogljikove hidrate (Benavides in sod., 2005).

2.1.2.2 Kadmij in ljudje

Prehrana je glavni vir izpostavljenosti kadmija iz okolja za nekadilce. Kadmij iz zraka se namreč poseda na tla in jih tako onesnažuje, ter tem povečuje vnos kadmija v rastline, ki jih gojimo za človeško prehrano (Järup in Åkesson, 2009). Poleg tega pa je problem tudi vdihavanje prahu, onesnaženega s kadmijem, kajenje in onesnažen zrak (Hogervorst in sod., 2006). Tolerantni tedenski vnos kadmija glede na Statement on tolerable weekly intake for cadmium (2011) je $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ telesne mase.

Pri kadmiju so pomembne 3 poti vnosa: skozi prebavila, skozi dihala ali preko kože. V povprečju se 5 % kadmija, ki ga zaužijemo, tudi absorbira v črevesju v naše telo. Najpomembnejši presnovi parameter, ki določa vnos kadmija v telo, je pomanjkanje železa. Ljudje z nizko ravnjo železa imajo za kar 6 % večji vnos kadmija kot ljudje, ki imajo železa v telesu dovolj. Zato so v večji nevarnosti ljudje z anemijo, otroci in ženske z menstruacijo. Glavnina kadmija v krvi se prenaša preko proteinov, kot so albumin in metalotioneini. Glavni organ, v katerem se kadmij kopiči, so ledvice. Kadmij se v ledvicah v povprečju zadržuje do 10 let. Zato vse življenjsko kopičenje na koncu privede do poškodbe ledvičnih kanalčkov (tubulov) (Godt in sod., 2006). Poškodbo odkrijemo preko povečanega izločanja nizko molekularnih proteinov v urinu. Kadmij in njegove komponente obravnavajo tudi kot karcinogene snovi, ki lahko povzročajo raka pljuč ali raka na prsih. Visoke koncentracije Cd pa lahko povzročajo tudi hude poškodbe kosti oziroma bolezen Itai-itai (Ke in sod., 2015).

2.1.2.3 Kadmij in živali

Kadmij v telesu živali deluje tako, da zmoti normalno stanje celic. Ker ima podobno strukturo kot cink in kalcij, lahko v telo vstopa preko absorpcijskih kanalov teh dveh elementov. Ko kadmij pride v telo, se skladišči v jetrih in ledvicah živali. Kadmij je strup, ki se skozi leta kopiči in lahko škoduje skoraj vsem glavnim organskim sistemom ter vpliva na reprodukcijo (Korff, 2014). Do danes še ni znano, da bi bil kadmij *esencialni* element za katerikoli organizem. Podobno, kot za vse potencialno nevarne kovine, je tudi

pri kadmiju njegova koncentracija v živali odvisna od njene starosti, spola, prehranskih navad, sezonskega nihanja koncentracije v živali in še od številnih drugih faktorjev. Poleg tega pa obstajajo tudi številne poti izločanja Cd iz telesa. Med drugim lahko živali Cd izločajo v jajčne lupine in puh. Podobno, kot pri človeku, so tudi pri ostalih sesalcih in verjetno tudi vretenčarjih najbolj kritični organ ledvice. Ledvice so prvi organ, ki nam pokaže toksične učinke Cd. Se pa koncentracija Cd iz telesa živali verjetno, glede na podatke pri človeku, zelo počasi odstranjuje. Poleg tega se lahko prenaša tudi na potomce. Za večino živalskih vrst imamo malo raziskav vpliva Cd nanje. Za manjše sesalce je škodljiva meja 350 µg/g suhe teže ledvic, vendar določene raziskave kažejo tudi že na škodljivost 120 µg/g suhe teže ledvic. Pri pticah je meja postavljena nekje pri 40 µg/g. Pri vretenčarjih so meje nizke, saj so bolj dovzetni za vplive Cd kot ptice in sesalci (Burger, 2008).

2.1.3 Cink

Cink je kovina, ki spada v 12 skupino in 4 periodo periodnega sistema. Je naravno prisoten v zemeljski skorji in pomemben element našega okolja. Najdemo ga v kamninah in različnih tleh, poleg tega pa še v zraku, vodi in v biosferi. Cink najdemo tako v rastlinah, kot v živalih in ljudeh. V povprečju v zemeljski skorji najdemo 70 mg/kg cinka glede na suho težo tal, njegove vrednosti pa se gibljejo med 10 in 300 mg/kg. Cink v naravi v rudah najdemo v obliki cinkovega sulfida ali v obliki cinkovega železovega sulfida. V tleh pa se navadno pretvori v okside ali karbonate (International zinc association, 2015). Cink se v okolje večinoma prenaša preko antropogenih virov, kot so rudarjenje in metalurgija. Največ ga v tla pride preko odlaganja žlindre in metalurških odpadkov, jalovine, premoga in elektrolitskega pepela. Poleg tega pa še z uporabo komercialnih produktov, ki vsebujejo cink, kot so na primer gnojila ali lesni preparati. Cink navadno ostaja absorbiran v tleh, čeprav se lahko iz odlagališč tudi izpira. Večina onesnaženja je omejena na lokacije blizu vira onesnaženja (Public health statement ..., 2005).

2.1.3.1 Cink in rastline

Rastline cink iz tal pridobijo iz talne raztopine navadno v obliki Zn^{2+} , lahko pa tudi v kompleksu z organskimi ligandi. Vstopa skozi korenine in preko ksilema naprej v nadzemne dele. Potuje tako po simplastni kot po apoplastni poti. Kot pri ljudeh je tudi pri rastlinah Zn ena ključnih esencialnih kovin. Ob pomanjkanju cinka lahko pride do hudih poškodb, kot so nekroza koreninskega vršička, ob manjšem pomanjkanju pa nastajajo kloroze, porjavenje ter s pomanjkanjem avksina povezane poškodbe (krajšanje internodija, kodranje listov ter zmanjšanje velikosti listov). Toksičnost cinka je manj pogosta od njegovega pomanjkanja, vendar se vseeno pojavlja predvsem v kontaminiranih tleh blizu rudnikov in talilnic ter drugih antropogenih virov cinka. Toksične simptome najprej opazimo pri večji koncentraciji svinca od 300 mg na kilogram suhe teže listov, nekatere rastline pa kažejo simptome tudi že pri koncentraciji nižji od 100 mg cinka na kilogram suhe teže listov. Je pa meja toksičnosti različna tudi znotraj posamezne vrste (Broadley in sod., 2007).

2.1.3.2 Cink in ljudje

Cink je eden najpomembnejših elementov v sledih v telesu in je nujno potreben za rast in razvoj. Najdemo ga v vseh telesnih tkivih in izločkih v visokih koncentracijah. Večino, kar 85 %, ga najdemo v mišicah in kosteh, 11 % v koži in jetrih, 4 % pa je razdeljenih med ostala tkiva, od katerih najbolj izstopata prostata in del oči. Povprečna količina cinka v odraslem človeku je 1,4 - 2,3 gramov. Cink je edina kovina, ki je kofaktor več kot 300 encimov in igra glavno vlogo pri stabilizaciji velikemu številu proteinov. Je zelo pomemben element pri človeškemu zdravju, saj že zelo nizko pomanjkanje lahko povzroči katastrofo in številne zdravstvene težave, kot so anoreksija, izguba apetita, izguba voha in okusa ter okvara imunskega sistema, ki lahko povzroči tudi arteriosklerozo in anemijo. Minimalna potreba po cinku je odvisna od prehrane, klimatskih pogojev in stresa. V povprečju pa je priporočen dnevni vnos 15 mg. Vnos ne sme presegati 25 mg na dan (Chasapis in sod., 2011). Po izpostavljenosti se cink veže v kosti in kri, kjer lahko ostane nekaj dni, nato pa se iz telesa izloči preko urina in blata. Visoke koncentracije Zn lahko povzročajo različne poškodbe, vendar je bolj nevarno, če nam cinka primanjkuje (Public health, 2005).

2.1.3.3 Cink in živali

Cink je pomemben esencialni element pri vseh živih organizmih, vendar pa je pri visokih koncentracijah lahko tudi škodljiv za organizme. Cink se bioakumulira v vseh organizmih, tudi tam, kjer so koncentracije cinka v okolju nizke. Največja težava je bioakumulacija cinka na onesnaženih področjih. To so navadno ostanki rudnikov in topilnic cinka. Živali za svojo rast potrebujejo ravno pravšnjo količino cinka, kajti škodo lahko povzroča tako prenizka kot previsoka koncentracija v krvi. Cink je najbolj nevaren za vodne organizme, medtem ko so ptice in sesalci relativno tolerantni nanj. Škodljivost pri pticah se začne, ko koncentracija cinka v ledvicah ali jetrih preseže 2100 mg/kg suhe teže organa, pri sesalcih pa 274 mg/kg suhe teže ledvic ali 464 mg/kg suhe teže jeter (Guidelines for interpretation..., 1998). Visoke koncentracije cinka pri talnih nevretenčarjih vplivajo na zmanjšano možnost preživetja, na rast in razmnoževanje. Pri pticah vpliva na slabo delovanje trebušne slinavke ter zmanjšuje rast in težo. Pri sesalcih pa povzroča težave pri razvoju, poškodbe srca in ožilja, imunskega sistema, težave z jetri, ledvicami ter krvnim sistemom, nevrološke težave ter težave pri reprodukciji (Eisler, 1993).

2.2 *Porcellio scaber* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA DOLOČANJE BIODOSTOPNOSTI POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH

Porcellio scaber (slika 1), po slovensko kočič ali mokrica, spada v red enakonožcev. Trup je segmentiran, raven in elipsasto oblikovan. Deli se na sedem segmentov in v vsakem je en par nog. Telo delimo na tri dele: glavo, pereon (oprsje) in pleon (zadek). Na dveh pleopodijih (zadkovih okončinah) imajo psevdotraheje, ki jim omogočajo dihanje s psevdopljučji. Te je mogoče opaziti kot bele lise na njihovem abdomnu. Imajo sestavljene oči in dva para anten. Navadni prašiček se tudi ni sposoben zviti v kroglico (Riggio, 2013).

Zaradi svojega eksoskeleta, ki nima povoščene kutikule, se zadržujejo predvsem v vlažnih, temnih prostorih, da preprečujejo svojo izsušitev. Prehranjujejo se večinoma z rastlinskimi

ostanki oziroma z razkrajajočim organskim materialom, ki ima v sebi visoke koncentracije mikroorganizmov. V svojem prebavilu imajo tudi simbiotske bakterije, ki jim omogočajo razkrajanje celuloze (Riggio, 2013).

Enakonožci so najbolj primerni modelni organizem za raziskave bioakumulacije kovin iz tal v talne organizme, saj lahko akumulirajo visoke koncentracije kovin. Poleg tega o njih tudi veliko vemo in jih je enostavno gojiti v laboratoriju. Glavni organ, v katerem enakonožci skladiščijo kovine, je hepatopankreas. V tem predelu se kovine vežejo na specifične, nizkomolekularne peptide ali se shranjujejo v netopnih granulah. Koncentracija kovin v živalih je odvisna od koncentracije kovin v tleh (Udovič in sod., 2009).



Slika 1: Rak enakonožec (*Porcellio scaber*) (Bugguide, 2015)

2.3 *Brassica rapa* var. *chinensis* KOT MODELNI ORGANIZEM ZA DOLOČANJE BIODOSTOPNOSTI POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH

Brassica rapa var. *chinensis* (kitajski kapus) je rastlina, ki izvira iz vzhodne Azije. Spada v rod kapusnic. Je enoletna, pokončna, listnata zelenjava, ki lahko zraste od 15 do 30 cm visoko. Med vegetativno fazo rasti so listi spiralno razporejeni v rozeto. Kitajski kapus raste najboljše v hladnejših delih leta. Najboljša temperatura za njegovo rast je med 18 in 22 °C. Za svojo rast potrebuje veliko vode ter raste lahko na več različnih tipih prsti (Chinese cabbage ..., 2013). Sudmoon in sodelavci (2015) so v svojem članku opisali zmožnost akumulacije visokih koncentracij kadmija v kitajskem kapusu. Yahua in sod. (2004) pa so v svojem članku opazovali tudi vpliv EDTA na vnos svinca v kitajski kapus, kjer je prisotnost kompleksa EDTA in svinca povečala akumulacijo svinca v rastlini. Kitajski kapus je med dvokaličnicami v poskusu akumuliral najmanj kovin.



Slika 2: Kitajski kapus (*Brassica rapa var. chinensis*)

2.4 REMEDIACIJSKE TEHNOLOGIJE ZA ČIŠČENJE TAL ONESNAŽENIH S POTENCIALNO NEVARNIMI KOVINAMI

Uporaba prave remediacijske tehnologije in pravilna obravnava kontaminiranih tal s potencialno nevarnimi kovinami je težko in stroškovno zahtevno vprašanje (Leštan, 2014). Danes poznamo več različnih tehnologij čiščenja tal: fizikalne, kemijske in biološke remediacije. Znotraj fizikalnih najdemo metodo zamenjave tal z neonesnaženimi ali metodo toplotne desorpcije. Metoda toplotne desorpcije temelji na segrevanju tal s pomočjo pare, mikrovalovnih ali infrardečih valov in s tem hlapenju onesnažila. Znotraj bioloških remediacij najdemo remediacije s pomočjo rastlin, živali ali mikroorganizmov. Med kemijskimi metodami pa ločimo: kemijsko spiranje, kemijsko stabilizacijo, elektrokinetično remediacijo ter metodo posteklenitve tal s pomočjo visoke temperature (Yao in sod., 2012).

2.4.1 Ex situ metoda spiranja tal s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)

Metoda spiranja z EDTA kemijskim ligandom daje veliko obetov, saj ima minimalen vpliv na tla glede na uporabo drugih kemijskih ligandov. Obenem ima veliko učinkovitost odstranjevanja potencialno nevarnih kovin iz tal predvsem iz biološko dosegljivega dela talne frakcije. EDTA je kemijski produkt, ki se proizvaja komercialno, saj ga uporabljamo v številnih vsakodnevnih stvareh, kot so detergenti, kozmetični pripomočki, hrana in gnojila. Je citotoksičen in zelo nizko genotoksičen, vendar ni karcinogen. Metoda temelji na principu kemijskih vezi, ki jih EDTA tvori s kovinami. Te povzročijo, da kovine postanejo topne in jih tako lahko s pomočjo pralne tekočine izperemo iz tal. EDTA ima sposobnost kelirati skoraj vsak pozitivno nabiti ion, pri katerem so kompleksi s kovinskimi onesnažili bolj stabilni kot kompleksi z ioni iz talnih delcev. Z nastankom kelatov postanejo potencialno nevarne kovine topne in se lahko izpirajo iz tal, zato je v postopku pomemben korak izpiranja tal. Pri tem nastane velika količina vode, ki jo je potrebno očistiti oziroma reciklirati. V te namene so na laboratorijski ravni razvili številne predloge za reciklacijo EDTA in vode. Obstajajo številne metode za reciklacijo EDTA, ki ob

odpadanju različnih kemijskih snovi omogočajo precipitacijo potencialno nevarnih kovin. Ena izmed metod temelji na dodajanju Fe^{3+} v odpadno vodo pri kisli pH vrednosti le-te. Fe^{3+} se veže na EDTA in izrine kovine, ki jih potem precipitiramo z dodatkom fosfata pri nevtralnem pH vrednosti. Poznamo tudi metode dodajanja nič-valentne bimetalne mešanice ali Na_2S , ki delujeta na podoben način kot zgornja. Ena od možnosti je tudi elektrolitsko tretiranje pralne raztopine s souporabo substitucijskih in precipitacijskih reakcij v ustreznem pH območju za recikliranje EDTA. Ta metoda poleg recikliranja EDTA omogoča tudi čiščenje in recikliranje pralne raztopine (Leštan, 2014). To metodo sta Voglar in Leštan (2013) tudi prenesla na pilotno raven.

2.4.1.1 Testi biodosegljivosti kovin po remediaciji s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)

Glavna nevarnost pri potencialno nevarnih kovinah je odvisna od njihove mobilnosti, zato je pomembno, da po remediaciji preverimo, ali se je njihova mobilnost zmanjšala. Mobilnost predvsem omogoča biodosegljivost kovine za rastline, živali in človeka. Znanost je v te namene razvila številne *in vitro* metode, s katerimi lahko določimo tveganje za zdravje po remediaciji ali pred njo. Tako poznamo *in vitro* metode, ki simulirajo biodostopnost potencialno nevarnih kovin za človeka. Glavna vstopna pot potencialno nevarnih kovin je namreč skozi prebavila s požiranjem onesnaženih tal ali vdihavanjem prahu (Leštan, 2014). Pri tem moramo upoštevati dve merili: oralno biodosegljivost in oralno biorazpoložljivost kovine. Prvo merilo je koncentracija Pb, ki lahko preko črevesnega prebavnega traku doseže krvni obtok, medtem ko je pri drugem merilu pomembna frakcija, ki je topna v prebavnem traktu in je tako dosegljiva za absorpcijo (Wragg in Cave, 2003).

Za simulacijo lahko uporabljamo več metod in sicer: enotno biodostopnostno metodo (UBM), fiziološko baziran ekstrakcijski test (PBET) in relativno biodostopnostno izpiralno proceduro (RBALP) ali poenostavljen ekstrakcijski test biodosegljivosti (SBET). Prvi dve metodi, med katerima je PBET starejša, simulirata celoten človeški prebavni trak in tako dajeta boljšo potencialno oceno biodosegljivosti kovin po zaužitju onesnažene hrane ali prahu. Metoda RBALP ali SBET pa nam pokaže zgolj oceno oralne biorazpoložljivosti, saj simulira le želodčni del prebavnega traktu (Leštan, 2014; Zia in sod., 2011; Wragg in Cave, 2003). Ne smemo pozabiti, da obstaja še veliko drugih *in vitro* testov. Večina teh testov splošno temelji na parametrih za otroke od 0 do 3 let. Ta skupina je tudi najbolj ogrožena zaradi velikega procenta zaužitih kontaminiranih tal, obenem pa lahko absorbira veliko večji procent potencialno nevarnih kovin iz njih. *In vitro* testi se uporabljajo za predvidevanja, saj nam ne dajo absolutnih podatkov o biodosegljivosti kovine, to bi namreč lahko dosegli zgolj z *in vivo* tehniko. Ampak, ker je cena in čas, potreben za izvedbo *in vitro* metod, majhen v primerjavi z *in vivo* metodami, in z njimi lahko obdelamo bistveno več vzorcev, se te metode pogosto uporabljajo. *In vivo* tehnike pa je tudi praktično nemogoče izvajati na človeških prostovoljcih, zato za *in vivo* študije navado uporabljajo prašiče ali druge laboratorijske živali (Wragg in Cave, 2003).

Biodostopnostne metode so še vedno na začetku razvoja, saj še vedno ni ene mednarodno priznane metode oziroma standarda. Informacije o kakovosti podatkov, ki jih pokaže metoda, so še vedno redke. Natančnost metod je prav tako omejena, saj imamo zelo malo

ali nič podatkov o medlaboratorijski ponovljivosti. Prav tako ni nobenega standardnega materiala, ki bi omogočal stalen nadzor nad potekom metode. Rezultate testov biodosegljivosti navadno podamo kot relativno biodosegljivost (razmerje med koncentracijo onesnažila mobiliziranega med prebavo in koncentracijo onesnažila v tleh pred prebavo). Tu pa se spet pojavi problem v definiciji celokupne koncentracije kovine v tleh pred prebavo, saj laboratoriji uporabljajo različne metode za določanje celokupne koncentracije. Wragg in Cave (2003) predlagata, da zaradi tega rezultate za biodostopnost podajmo v mg kg^{-1} trdne snovi skupaj s celotno koncentracijo in opisom metode, ki je bila uporabljena za pridobitev teh rezultatov.

2.4.1.2 Vpliv remediacije s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) na tla

Jelušič in Leštan (2013) sta se ukvarjala z vplivom remediacije s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) na tla. Sama remediacija je vplivala na pH vrednost tal, na količino organske snovi v tleh, na koncentracijo fosforja in kalija v tleh ter vsebnost karbonatov. Vrednost pH tal se je po remediaciji rahlo povečala. Količina organske snovi, koncentracija K in P ter tudi vsebnost karbonatov v tleh se je zmanjšala. Poleg tega pa Jelušič in sod. (2013) pišejo o pomanjkanju večine mikrohranil v remediranih tleh. Zmanjšanje koncentracije kalija pojasnujeta s tem, da so bila tla večinoma sprana z Na-EDTA. Pri tem procesu se namreč sprosti velika količina Na^+ ionov, ki tako zamenjajo K^+ ione, vezane na talne delce, in zato se koncentracija K zmanjša. Zmanjšanje vsebnosti karbonatov naj bi bila posledica raztapljanja kalcijevih karbonatov s protonsko obliko EDTA. Pri remediranih tleh sta opazila tudi zmanjšanje zadrževalne kapacitete vode v tleh. Poleg tega pa v tleh po remediaciji lahko ostane še tudi znaten del EDTA, za katerega še ni jasno, kaj se z njim dogaja v daljšem časovnem obdobju v tleh. Seveda je glavno vodilo remediacije, da zmanjšamo deleže potencialno nevarnih kovin v skoraj vseh frakcijah tal (Jelušič in Leštan, 2013).

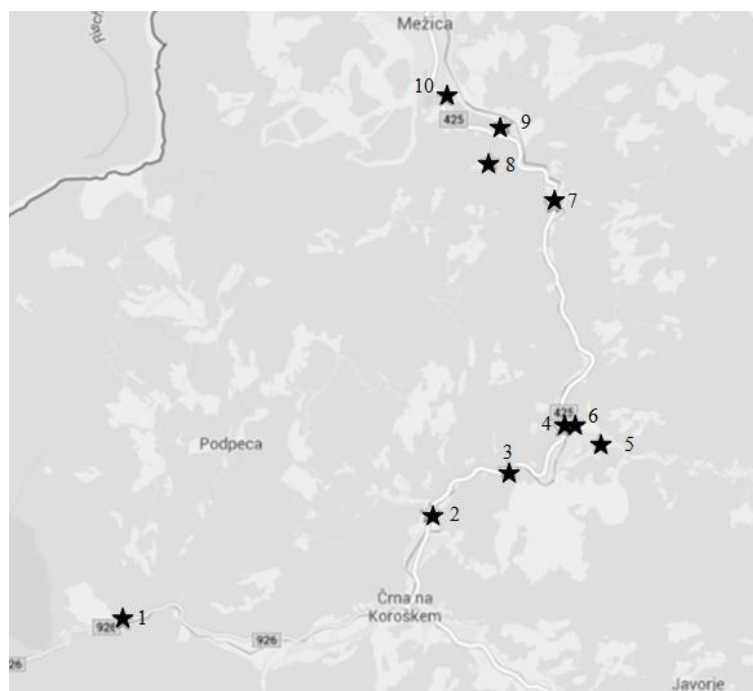
2.4.1.3 Vpliv remediacije s kemijskim ligandom etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) na rast rastlin

Remediacija zaradi zmanjšanja biodosegljivih koncentracij kovin v tleh vpliva tudi na manjšo vsebnost kovin v rastlinah. V poljskem poskusu, ki so ga izvedli Jelušič in sod. (2013), so bile vse koncentracije potencialno nevarnih kovin v rastlinah, ki so bile gojene na remediranih tleh nižje od zakonsko določene meje EU. Vendar pa se poleg potencialno nevarnih kovin iz tal izpere tudi velik delež mikrohranil, zato je bila biomasa rastlin, ki so rastle na remediranih tleh, v primerjavi s tistimi, ki so rastle na originalnih tleh, manjša.

3 METODE DELA

3.1 VZORČENJE VZORCEV TAL

Vzorčenje tal je potekalo v Mežiški dolini v okolici krajev Črna na Koroškem in Mežica. Odvzeli smo 30 – 40 kg tal. Vzorci so bili odvzeti na njivah in vrtovih.



Slika 3: Zemljevid Mežiške doline z označenimi vzorčnimi mesti

Preglednica 1: Oznake vzorcev z GPS koordinatami

Oznaka vzorca tal	Lokacija vzorca (GPS koordinate)
1	dolžina: 14,81394675, širina: 46,46919111
2	dolžina: 14,85295849, širina: 46,47898174
3	dolžina: 14,86291347, širina: 46,48224179
4	dolžina: 14,86975561, širina: 46,48593839
5	dolžina: 14,87457763, širina: 46,48475607
6	dolžina: 14,87136990, širina: 46,48630006
7	dolžina: 14,86891435, širina: 46,50566777
8	dolžina: 14,86056605, širina: 46,50928385
9	dolžina: 14,86213459, širina: 46,51256960
10	dolžina: 14,85514355, širina: 46,51489132

3.2 REMEDIACIJA VZORCEV

Iz vzorcev tal smo odvzeli 12 kg tal ter jih remedirali. Postopek remediacije so izvedli sodelavci CPVO.

Proces remediacije tal je potekal v 8 korakih, ki so spodaj opisani in označeni v sliki 4:

1. Spiranje tal

Onesnažena tla smo zmešali z enako količino pralne raztopine, ki vsebuje 120 mmol raztopljenega Na-EDTA na kilogram tal. Vse skupaj smo v velikem mešalcu mešali 2h.

2. Separacija in spiranje materiala, ki je prevelik za proces

Po končanem procesu smo s pomočjo 2 mm sita ločili večje delce (kamni, pesek) od gošče tal. Vse večje delce smo sprali z 40 L pralne raztopine nato pa še z 5L sveže vode.

3. Stiskanje tal v preši in spiranje tal

Goščo tal in ostalo goščo iz 2. koraka smo prečrpali v filtrno stiskalnico. V tem koraku se trdna in tekoča faza ločita. Nato smo tla v preši sprali z 98 L očiščene procesne vode ter še z 42 L vode iz pipe.

4. Obdelava očiščenih tal

Očiščena tla smo naribali čez 5 mm sito ter jim dodali frakcijo peska, ki smo ga odstranili pri 2. koraku.

5. Alkalna substitucija in precipitacija kovin

Procesne vode smo obdelali z hidriranim apnom, da smo dosegli pH vrednost med 12,03 in 12,11. Pri tej pH vrednosti Ca zamenja potencialno nevarne kovine v EDTA kompleksu. Nastane kalcijev EDTA ter kovinski hidroksidi, ki so netopni v alkalni procesni raztopini in jih zato lahko s pomočjo kontinuirne centrifuge odstranimo iz nje.

6. Kislinska precipitacija in reciklacija EDTA

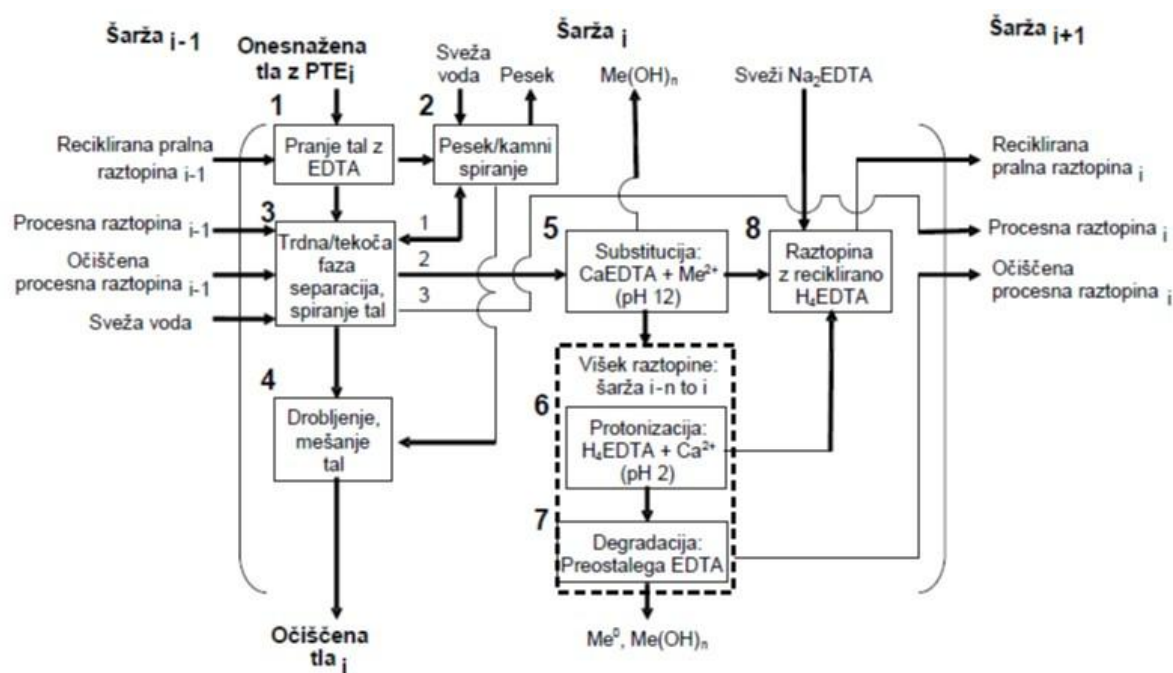
Po končanem koraku 5 sledi zakisanje procesne raztopine s pomočjo H_2SO_4 na pH vrednost med 2,04 in 2,11. Večina EDTA se pri tem pH precipitira in jo lahko s pomočjo filtracije odstranimo iz procesne raztopine.

7. Elektrolitska razgradnja preostalega EDTA v procesni raztopini

Preostali del EDTA, ki ostane v procesni raztopini, razgradimo s pomočjo oksidativne razgradnje z uporabo elektrolitskih celic z grafitno anodo in dvema katodama iz nerjavečega jekla.

8. Priprava reciklirane pralne raztopine

EDTA, ki smo jo precipitirali v koraku 6, dodamo v pralno raztopino ter vsemu skupaj dodamo še ustrezen delež sveže EDTA, da zagotovimo ustrezno koncentracijo EDTA za novo šaržo (Voglar in Leštan, 2013).



Slika 4: Shema procesa remediacije tal s pomočjo spiranja tal z EDTA (Voglar in Leštan, 2013)

3.3 DOLOČANJE POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN V TLEH

Priprava vzorcev

Pripravljene vzorce remediranih ter originalnih tal smo s pomočjo ahatne terilnice zmleli ter presejali čez 150 μm sito. Nato smo natehtali 0,5 g vzorca v reakcijske posode.

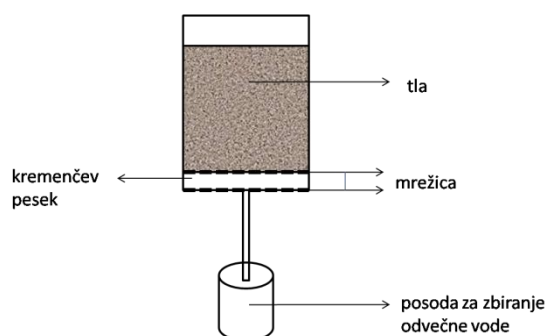
Kislinski razklop tal

Vsak vzorec smo počasi prelili z 9 mL HCl, nato pa še s 3 mL HNO₃. Reakcijske posode smo zaprli ter jih prenesli v mikrovalovni sistem. Na napravi smo izbrali ustrezen program. Program poteka tako, da najprej vzorce iz sobne temperature segreje na 175°C, nato program to temperaturo vzdržuje 15 minut, potem sledi 45 minutno hlajenje. Po končanem programu smo suspenzijo prelili čez papirnate filtre (satorius stedium; dia 125 mm (391)) v 50 mL bučke. Ko je tekočina odtekla, smo filtre zavrgli, bučke pa do oznake napolnili z destilirano vodo. Vzorce smo shranili ter jih nato analizirali s FAAS.

3. 4 FITODOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN

3.4.1 Priprava tal

Fitodosegljivost potencialno nevarnih kovin v naših tleh smo določili z lončnim poskusom. Najprej smo pripravili posode za lončni poskus (slika 1). Na dno posode smo dali kremenčev pesek, nanj položili mrežico ter nato v vsako posodo dodali 7,8 L tal. V tla smo dodali 14 g zmletega mineralnega gnojila, ki je vseboval 20 % pepela. Remedirana tla smo zalili z 0,5 L vode z 0,5 g MnSO₄x 4 H₂O, originalna tla pa samo z 0,5 L vode iz pipe.



Slika 5: Shema lončnega poskusa

3.4.2 Lončni poskus

V vsako posodo smo posadili 3 sadike kitajskega zelja (*B. rapa*) stare 48 dni ter zalili z 1,5 L vode. Sadike smo v rastlinjaku gojili 1 mesec in vsak teden oziroma po potrebi dolivali 0,5 L vode. Nato smo zgornji zeleni del sadik pobrali in posušili v sušilniku na 60 °C. Suh material smo zmleli v centrifugalnem mlinu ter vzorce shranili pri sobni temperaturi.



Slika 6: Lončni poskus z kitajskim zeljem (*B. rapa*)

3.4.3 Rastlinski razklop

Suh in zmlet material smo razklopili v zlatotopki. 0,6 g vzorca smo zatehtali v polipropilensko posodo, prelili z 6,5 mL HNO_3 ter toplotno obdelali v mikrovalovnem sistemu. Program poteka tako, da najprej vzorce iz sobne temperature segrejemo na 200°C, program to temperaturo vzdržuje 10 minut, potem sledi 45 minutno hlajenje. Po končnem razklopu smo raztopino prelili v 10 mL steklene bučke in jih dopolnili z destilirano vodo. Vzorce smo analizirali z FAAS.

3.5 UBM TEST

Za oceno oralne biodostopnosti potencialno nevarnih kovin v človeški organizem smo izvedli t.i. UBM test (UBM procedure ..., 2012; Wragg in sod., 2011). Protokol vsebuje dva vzporedna postopka ekstrakcije in simulira kemijske procese, ki se odvijajo v ustih, želodcu in črevesju, z uporabo sintetičnih prebavnih raztopin in upoštevanjem zadrževalnih časov. UBM postopek simulira človeški gastro-intestinalni trakt skozi 3 različne stopnje: usta (5 min), želodec (1 h) in črevesje (4 h). Za vsak talni vzorec pridobimo dve biodostopni frakciji: prvo po izteku želodčne faze in drugo na koncu črevesne faze. Izmerili smo samo drugo frakcijo. Med prvo ekstrakcijo, ki simulira želodčno fazo, smo presejane ($< 250 \mu\text{m}$) suhe talne vzorce (0,6 g) prelili z 9 mL raztopine umetne sline (pH $6,5 \pm 0,5$). Po ročnem stresanju vzorcev (10 s), smo dodali 13,5 mL želodčne raztopine (pH $1,1 \pm 0,1$) in pH raztopine v vzorcih uravnali na vrednost $1,2 \pm 0,05$ s 37 % HCl in 1 M NaOH. Vzorce smo inkubirali 1 h pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na rotacijskem mešalniku (simulacija želodčne peristaltike). Ker mora biti končna vrednost pH po izteku inkubacije v območju 1,2-1,5 smo med 1 h inkubacijo umerjali pH tako, da smo vzorcem po 5, 10, 15, 30 in 45 minutah z 37 % HCl uravnavali pH vrednost. Po izteku inkubacije smo preverili pH. V kolikor je bil v območju 1,2-1,5, smo nadaljevali postopek, sicer smo vzorec zavrgli. Za simulacijo črevesne faze smo uporabili pripravljene vzorce za določanje želodčne frakcije, ki smo jim dodali 27 mL umetne črevesne raztopine (pH $7,4 \pm 0,2$) in 9 mL umetne žolčne raztopine ($8,0 \pm 0,2$) ter pH suspenzije uravnali na $6,3 \pm 0,5$. Vzorce smo 4 h inkubirali na rotacijskem mešalu v vodni kopeli s temperaturo $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Po izteku inkubacije smo suspenzijo centrifugirali (15 min pri 4500 rpm) in centrifugat do opravljanja meritev shranili pri temperaturi pod 4°C . Vsak vzorec smo izvedli v treh ponovitvah, pripravili smo tudi slepi vzorec.

Vzorce smo nato analizirali z FAAS.

3.6 STANDARDNI OPERATIVNI POSTOPEK ZA *IN VITRO* BIODOSTOPNOST SVINCA V TLEH (SOP)

Za dodatno preverjanje oralne biodostopnosti svinca, cinka in kadmija smo uporabili SOP za *in vitro* biodostopnost svinca v tleh (Standard Operating Procedure ..., EPA, 2012). *In vitro* test je potekal v 0,4 M raztopini glicina, ki smo ji z HCl pH vrednost nastavili na $1,5 \pm 0,5$. Uporabili smo 0,4 g suhih in presejanih ($< 250 \mu\text{m}$) tal v 40 mL 0,4 M raztopine glicina. Vzorce smo inkubirali 1 h pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$ na rotacijskem mešalniku. Po koncu inkubacije smo vzorcem preverili pH vrednost. Vrednost pH je morala biti med 1,0 – 2,0, če ne smo vzorce zavrgli. Iz vzorcev, ki so imeli ustrezen pH, smo s pomočjo brizge odvzeli 20 mL tekočine ter jo prefiltrali čez $0,45 \mu\text{m}$ filter. V tekočino smo dodali 0,5 mL HNO_3 ter vzorce shranili na 4°C .

Vzorce smo analizirali z FAAS. Iz rezultatov svinca smo izračunali IVBA (*in vitro* biodosegljivost), RBA (relativna biodosegljivost) in ABA (absolutna biodosegljivost). Vrednost ABA smo vstavili v prosto dostopen IEUBK model, ki napove, kolikšna naj bi bila koncentracija svinca v krvi otrok, ki živijo na s Pb onesnaženem okolju. (Standard Operating Procedure ..., EPA, 2008)

3.7 BIDOSEGLJIVOST V KOPENSKIH RAKIH ENAKONOŽCIH *Porcellio scaber*

3.7.1 Nabiranje živali in priprava tal

Poskusne živali smo nabrali na vrtu ob hiši na Cesti Toneta Tomšiča 27 na Jesenicah. Prestavili smo jih v stekleni terarij, kjer smo jih gojili na temperaturi 22-23°C in visoki vlažnosti, ki smo jo vzdrževali s škropljenjem z destilirano vodo ter jih hranili z neonesnaženim suhim listjem. Vzorce tal smo posušili pri 40°C ter jih presejali čez 2 mm sito. Na začetku poskusa smo v enolitrske plastične posode dodali 300 mL posameznih vzorcev tal ter polovico teh tal navlažili z 25 mL destilirane vode ter z destilirano vodo napršili pokrov posode. Živali, s katerimi smo določevali naravno ozadje kovin v njih, smo nabrali na isti lokaciji 2 leti kasneje.

3.7.2 Gojenje živali na vzorcih tal

V vsako posodo smo dodali 10 odraslih osebkov s težo med 24 in 94 mg ter jih 14 dni pri sobni temperaturi gojili na vzorcih tal. Vsak drugi dan smo preverjali preživelost rakov ter po potrebi dodajali destilirano vodo ter tako vzdrževali ustrezno vlago.

Po koncu 14 dnevnega poskusa smo testne osebke za 24 ur prestavili v plastično petrijevko s suhim neonesnaženim listjem, da so iz črevesja izpraznili ostanke prsti. Osebke smo nato ločeno vsakega posebej prenesli v plastične epice ter jih prestavili za 4 h na 4°C, s čimer smo zagotovili anesteziji podoben učinek. Nato smo jih zmrznili pri -20°C ter liofilizirali.

3.7.3 Kislinski razklop živali

Tako pripravljene rake smo prenesli v kvarčne mikrovalovne inserte ter jih prelili s 500 µL 65 % HNO₃. Nato smo v mikrovalovnem sistemu izvedli razklop. Program je potekal tako, da je najprej vzorce s sobne temperature segrel na 180°C, nato je to temperaturo vzdrževal 10 minut, potem je sledilo 45-minutno hlajenje do 60°C. Po končnem razklopu smo raztopine prelili v 10 mL steklene epruvete in jih dopolnili z destilirano vodo do 3 mL. Vzorce smo nato analizirali s FAAS.

3.8 STATISTIČNE METODE

Za obdelavo podatkov smo uporabili program Microsoft Excel.

3.9 ANALITSKE METODE

3.9.1 Merjenje pH

Vrednost pH tal smo določali po metodi: SIST ISO 10390:1996. Gre za elektrometrično meritev aktivnosti H⁺-inov v suspenziji tal z raztopino 0,01 mol/L kalcijevega klorida v volumskem razmerju 1 : 5.

3.9.2 Določanje organske snovi in teksturnega razreda

Teksturni razred so določili na Centru za pedologijo in varstvo okolja s sedimentacijsko pipetno metodo (Fiedler in sod. 1964). Prav tako pa tudi delež organske snovi, ki so jo določili s titracijo po Walkley-Blacku (SIST ISO 14235, 1998).

3.9.3 Določanje karbonatov

Karbonate v tleh smo določili z volumetričnim postopkom po Schieblerju (SIST ISO 10963, 1995).

4 REZULTATI

4.1 PEDOLOŠKE LASTNOSTI TAL

V preglednicah 2 in 3 so predstavljene osnovne pedološke lastnosti originalnih in remediranih tal, kot so vrednot pH, delež organske snovi, delež karbonatov ter tekstura tal.

Preglednica 2: Pedološke lastnosti originalnih vzorcev tal

Oznaka vzorca tal*	Vrednost pH	Organska snov (%)	Karbonati (%)	Tekstura		
				Glina (%)	Melj (%)	Pesek (%)
1	6.79 ± 0.02	11,52	21	8	38	54
2	7.19 ± 0.02	17,68	38	7	38	55
3	7.24 ± 0.01	7,3	27	11	54	35
4	7.38 ± 0.02	6,03	27	19	45	36
5	7.54 ± 0.02	16,67	62	6	43	51
6	7.42 ± 0.02	5,09	5	15	57	28
7	7.07 ± 0.02	7,72	24	4	30	66
8	6.90 ± 0.02	13,3	41	8	42	50
9	7.08 ± 0.02	8,91	8	7	36	57
10	7.07 ± 0.01	10,78	21	9	35	56

*glej podpoglavje 3.1

Preglednica 3: Pedološke lastnosti remediranih vzorcev tal

Oznaka vzorca tal*	Vrednost pH	Organska snov (%)	Karbonati (%)	Tekstura		
				Glina (%)	Melj (%)	Pesek (%)
1	7.22 ± 0.02	8,17	21	6	40	54
2	7.27 ± 0.01	17,34	31	8	68	24
3	7.55 ± 0.01	7,23	27	11	62	27
4	7.23 ± 0.02	4,89	27	19	41	40
5	7.34 ± 0.01	11,25	46	5	50	45
6	7.47 ± 0.02	4,35	0	11	67	22
7	7.49 ± 0.02	7,1	24	10	25	65
8	7.27 ± 0.01	11,85	37	11	63	26
9	7.56 ± 0.02	8,71	8	8	50	42
10	7.12 ± 0.02	9,71	15	11	42	47

*glej podpoglavje 3.1

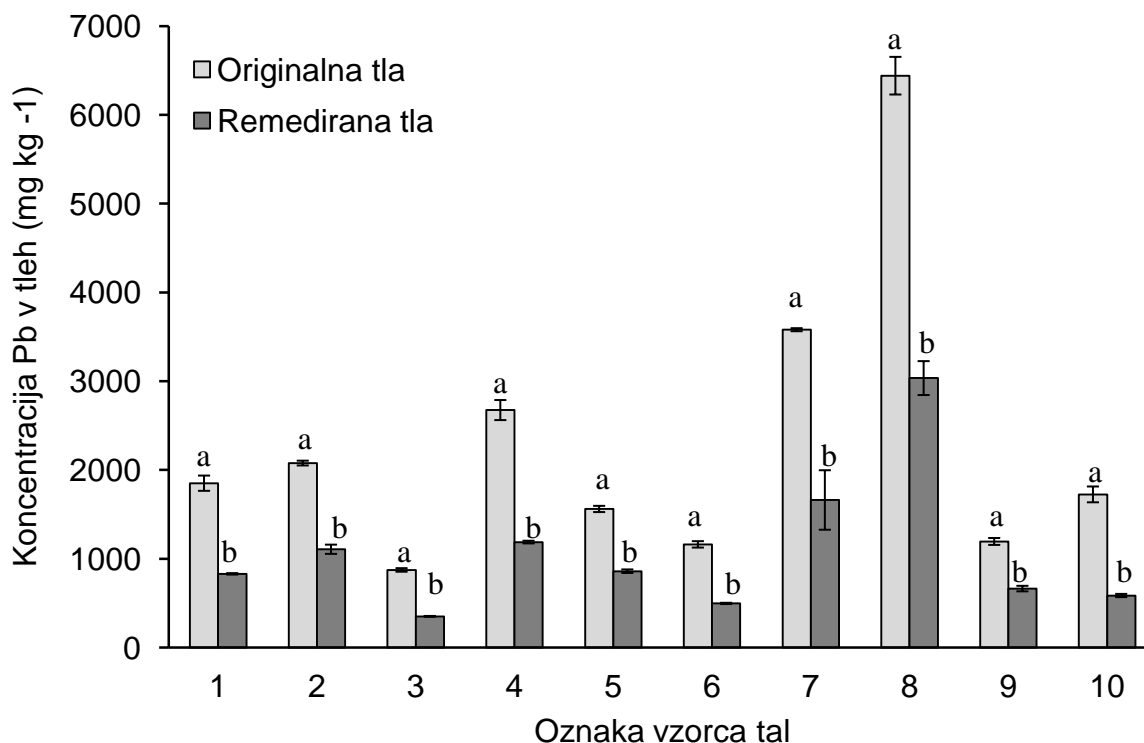
4.2 VSEBNOST KOVIN V TLEH PRED IN PO REMEDIACIJI

V preglednicah 4, 5 in 6 in slikah 7, 8, 9 so predstavljene koncentracije potencialno nevarnih kovin v mg kg^{-1} (Pb, Zn in Cd) v remediranih in originalnih tleh. Poleg koncentracije potencialno nevarnih kovin, je predstavljen odstotek odstranitve (%).

Preglednica 4: Koncentracija Pb (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Pb iz tal

Oznaka vzorca tal*	Koncentracija Pb v originalnih tleh (mg kg^{-1})	Koncentracija Pb v remediranih tleh (mg kg^{-1})	Odstranitev (%)
1	1851 ± 86	830 ± 8	55
2	2078 ± 27	1107 ± 52	47
3	874 ± 20	351 ± 5	60
4	2675 ± 113	1188 ± 15	56
5	1561 ± 35	860 ± 20	45
6	1162 ± 36	497 ± 7	57
7	3580 ± 17	1662 ± 335	54
8	6441 ± 212	3035 ± 191	53
9	1195 ± 39	664 ± 31	44
10	1725 ± 89	586 ± 18	66

*glej podpoglavje 3.1

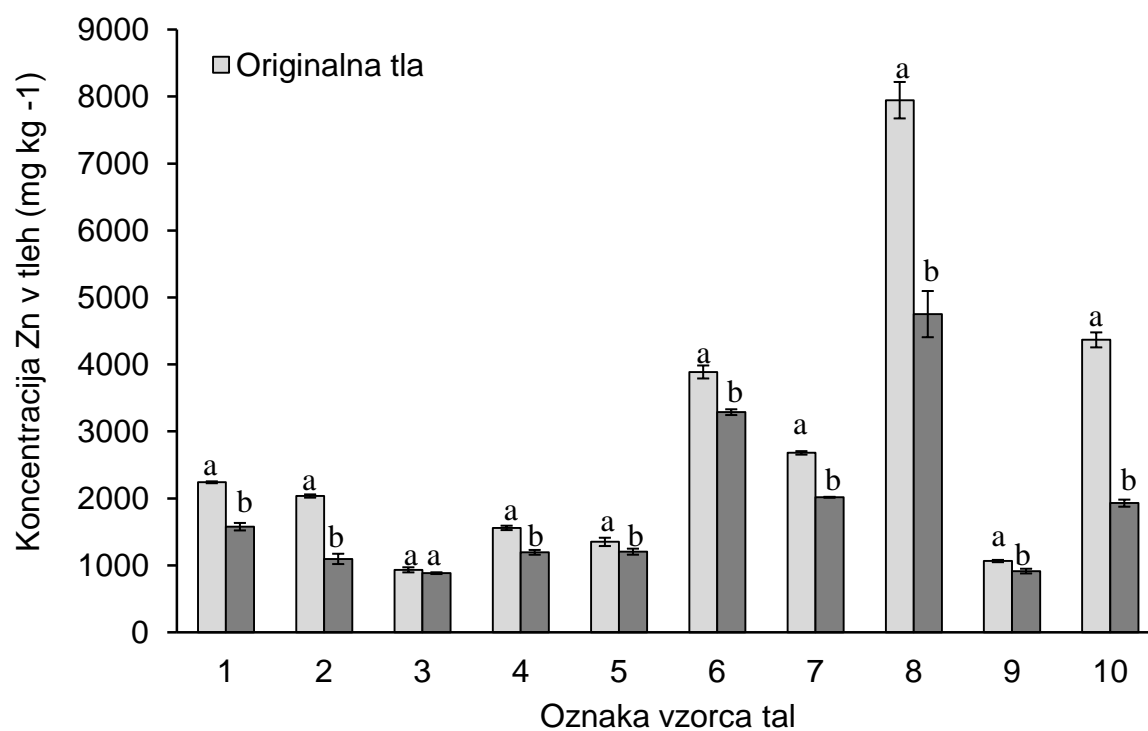


Slika 7: Koncentracija Pb v tleh pred in po remediaciji. Črki "a" in "b" označujeta statistično razliko med koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje ± standardna deviacija ($n=3$)

Preglednica 5: Koncentracija Zn (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Zn iz tal

Oznaka tal*	Koncentracija Zn v originalnih tleh (mg kg^{-1})	Koncentracija Zn v remediranih tleh (mg kg^{-1})	Odstranitev (%)
1	2241 ± 14	1578 ± 56	30
2	2036 ± 24	1097 ± 77	46
3	934 ± 38	884 ± 13	5
4	1560 ± 33	1195 ± 36	23
5	1351 ± 62	1205 ± 45	11
6	3888 ± 97	3288 ± 43	15
7	2680 ± 26	2017 ± 7	25
8	7946 ± 272	4752 ± 345	40
9	1065 ± 17	915 ± 35	14
10	4367 ± 112	1929 ± 53	56

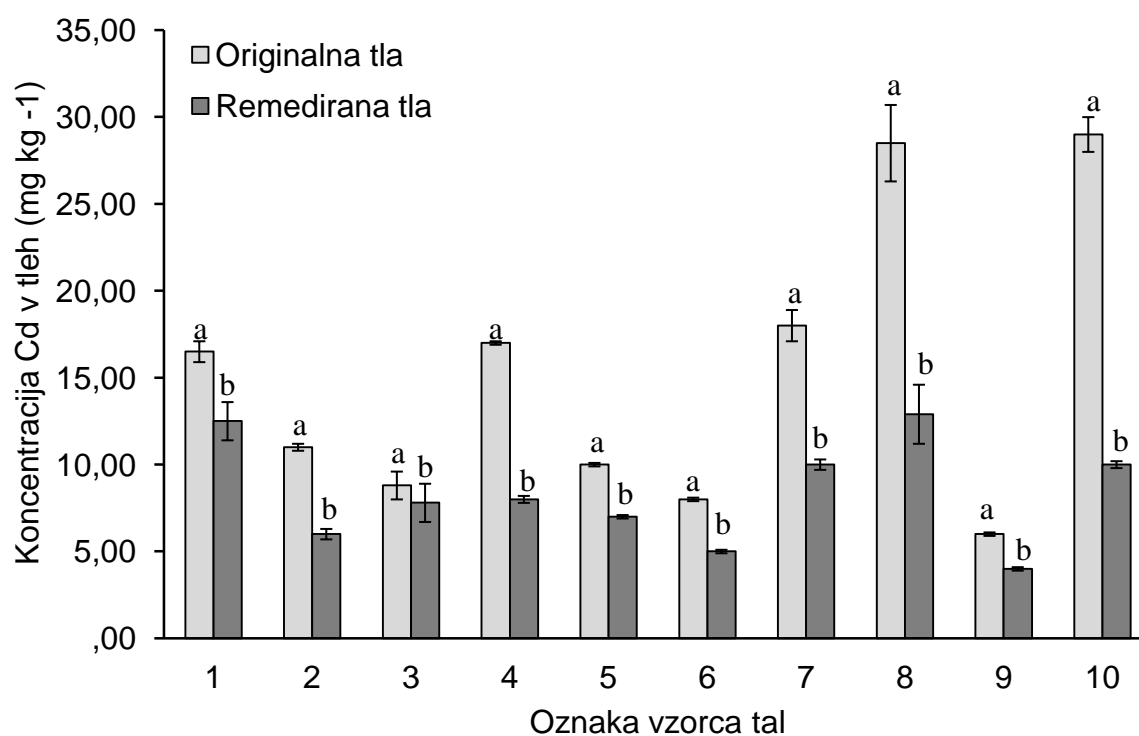
*glej podpoglavje 3.1

Slika 8: Koncentracija Zn v tleh pred in po remediaciji. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje ± standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podpoglavje 3.1).

Preglednica 6: Koncentracija Cd (mg kg^{-1}) v tleh pred in po remediaciji in odstotek odstranitve Cd iz tal

Oznaka tal*	Koncentracija Cd v originalnih tleh (mg kg^{-1})	Koncentracija Cd v remediranih tleh (mg kg^{-1})	Odstranitev (%)
1	16,5 ± 0,6	12,5 ± 1,1	24
2	11,0 ± 0,2	6,0 ± 0,3	45
3	8,8 ± 0,8	7,8 ± 1,1	11
4	17,0 ± 0,1	8,0 ± 0,2	53
5	10,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	30
6	8,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	38
7	18,0 ± 0,9	10,0 ± 0,3	44
8	28,5 ± 2,2	12,9 ± 1,7	55
9	6,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	33
10	29,0 ± 1,0	10,0 ± 0,2	66

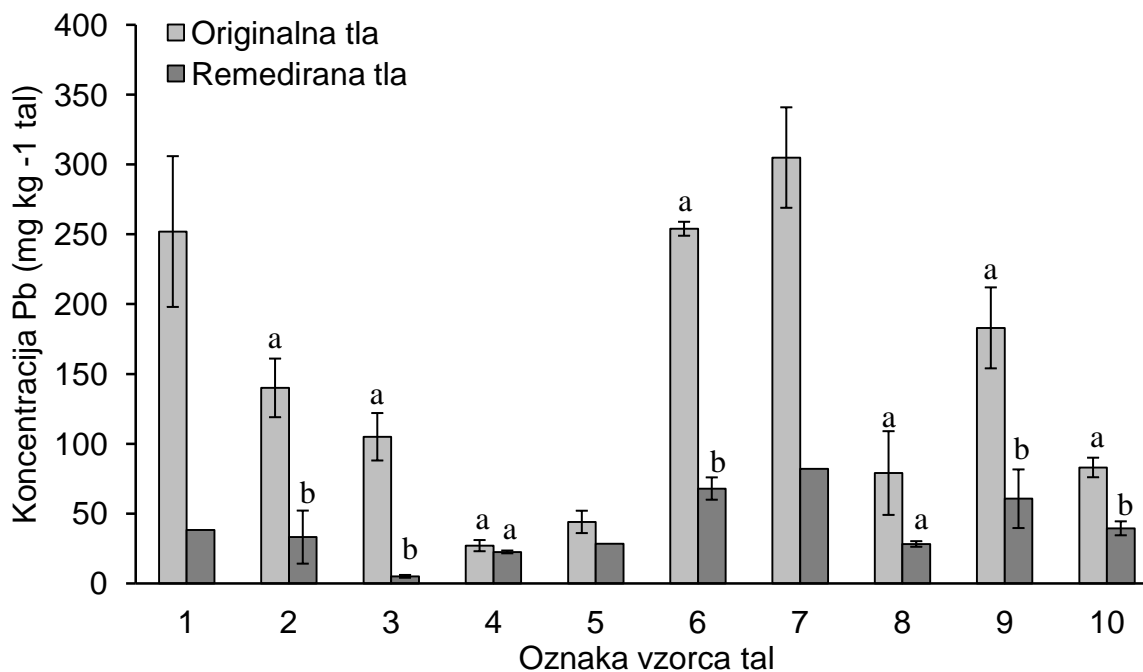
*glej podpoglavje 3.1

Slika 9: Koncentracija Cd v tleh pred in po remediaciji. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje ± standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podpoglavje 3.1).

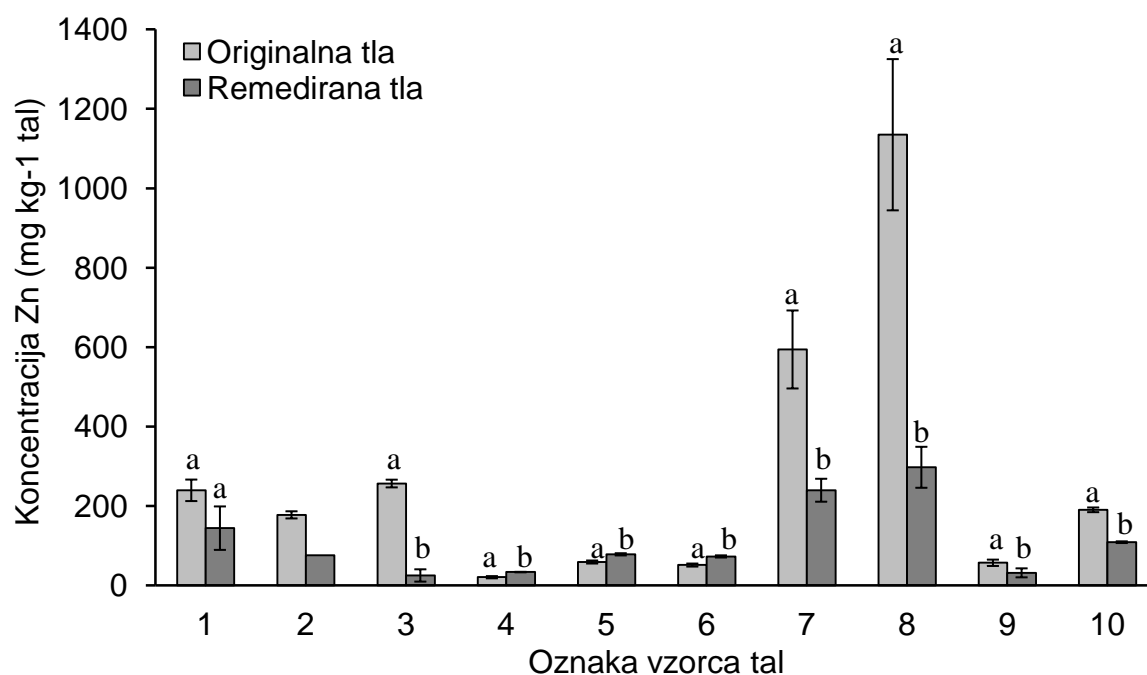
4.3 ORALNA BIODOSEGLJIVOST Pb, Zn IN Cd

4.3.1 Oralna biodosegljivost potencialno nevarnih kovin iz tal v črevesni fazi

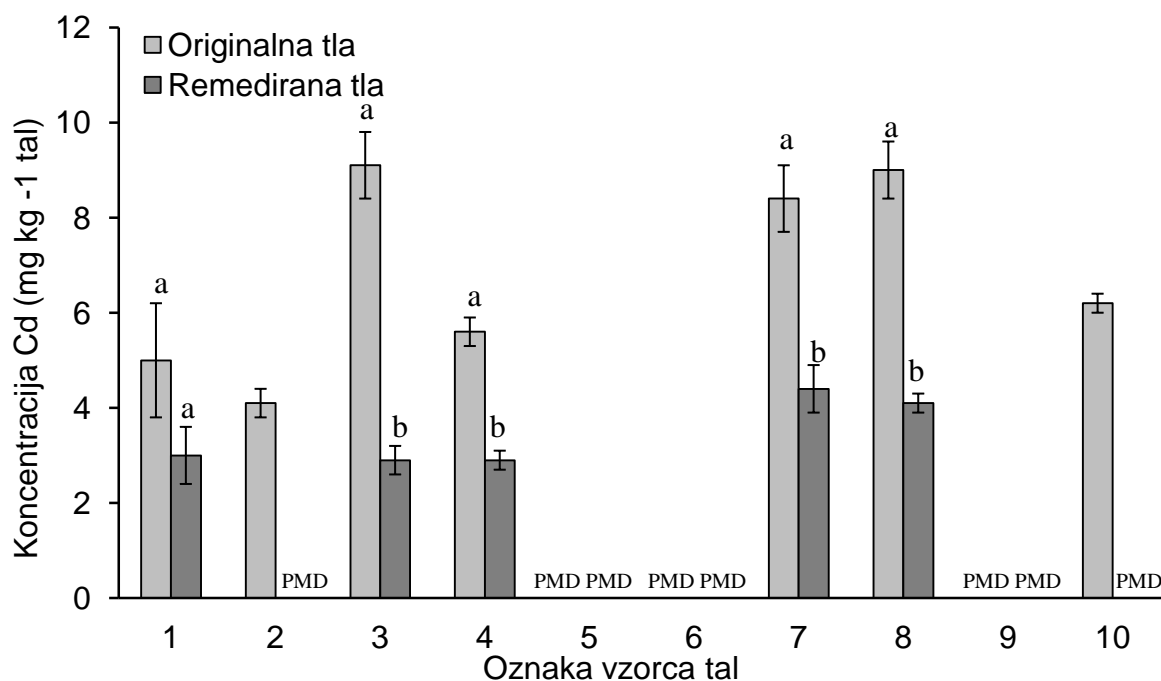
Rezultati pridobljeni z UBM testom so prikazani na slikah 10, 11, 12. Na slikah so predstavljene biodostopne koncentracije potencialno nevarnih kovin (Pb, Zn in Cd) v simulirani črevesni fazi v tleh pred in po remediaciji.



Slika 10: Biodostopna koncentracija Pb v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podpoglavje 3.1).



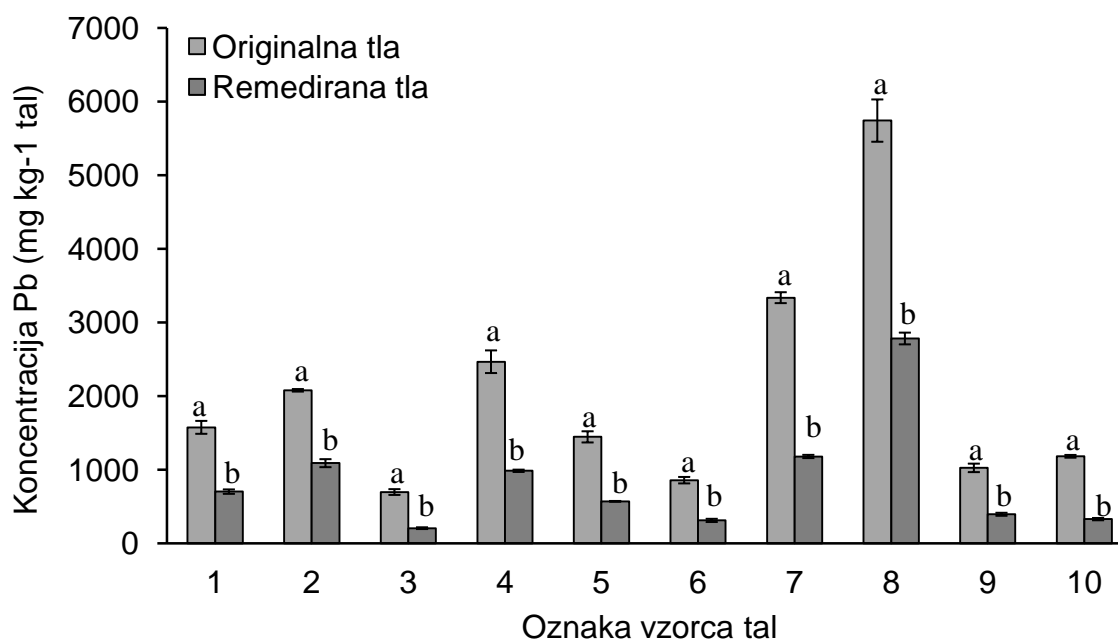
Slika 11: Biodostopna koncentracija Zn v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podglavje 3.1).



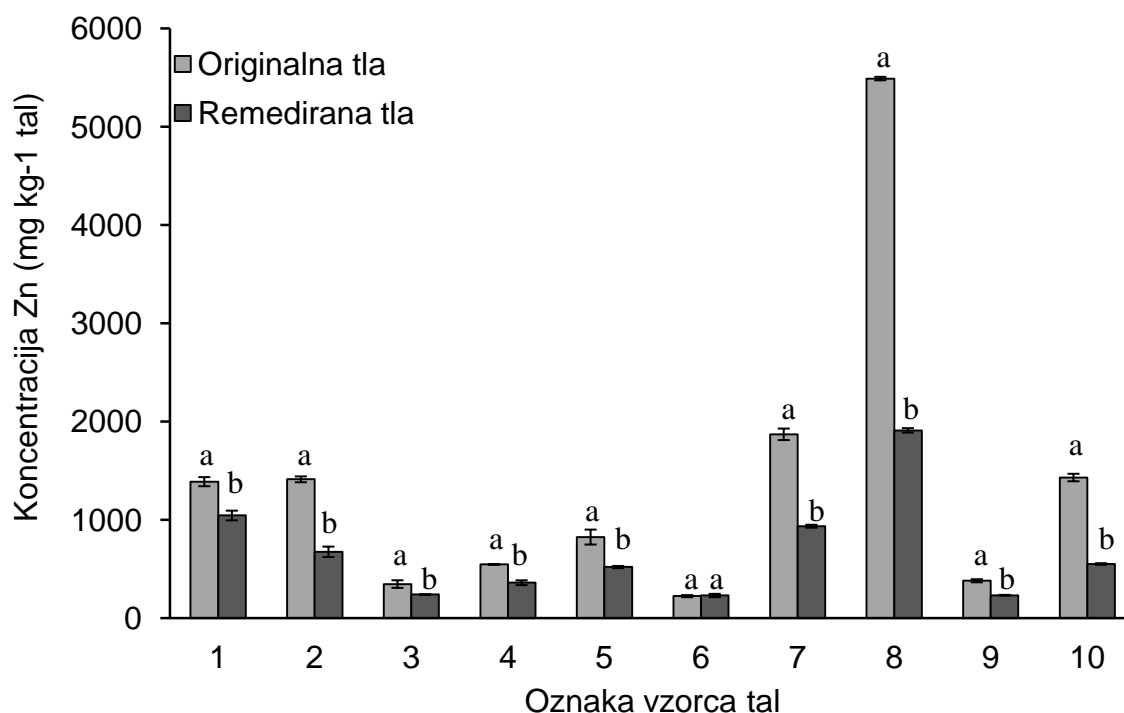
Slika 12: Biodostopna koncentracija Cd v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). PMD – pod mejo detekcije. (Za razlago oznake vzorca glej podglavje 3.1).

4.3.2 Oralna biodosegljivost potencialno nevarnih kovin v tleh v želodčni fazi

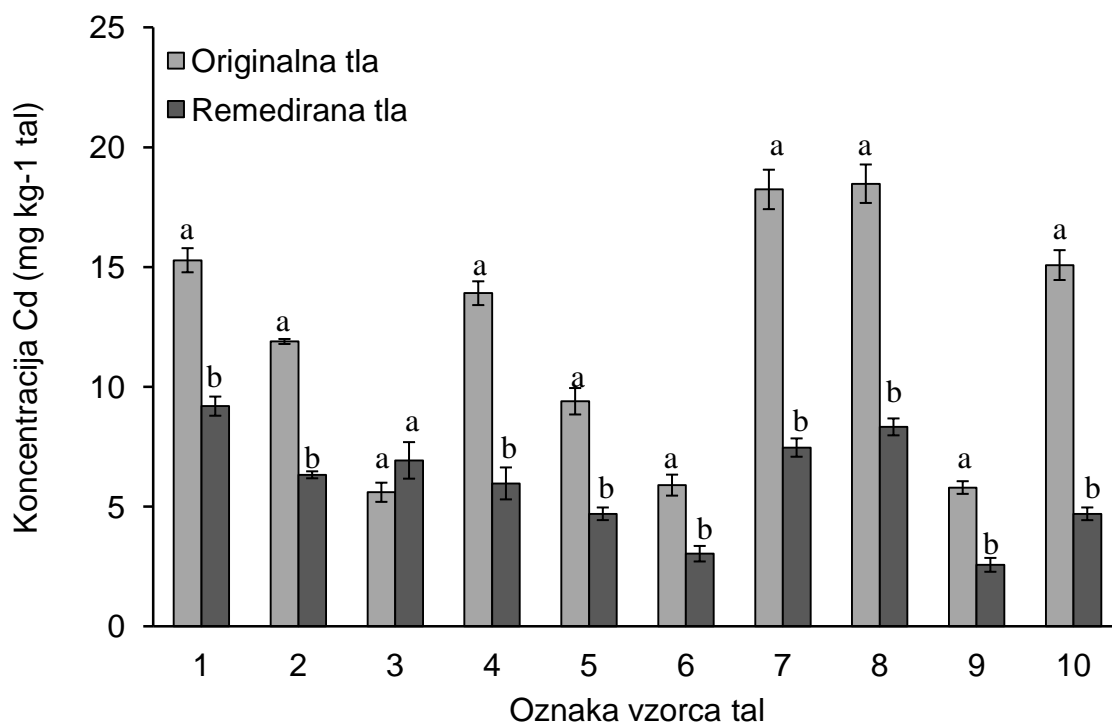
Na slikah 13, 14, 15 so predstavljene koncentracije potencialno nevarnih kovin (Pb, Zn in Cd), ki so bile dosegljive iz tal v simulirani želodčni fazi po SOP postopku za tla pred in po remediaciji. V preglednici 7, je podana verjetna vsebnost Pb v krvi 3 letnega otroka ($\mu\text{g dL}^{-1}$), če bi ta živel v okolju, kjer bi bila prisotna tla pred in po remediaciji. Vsebnost Pb v krvi je bila izračunana z IEUBK modelom.



Slika 13: Biodosegljiva koncentracija Pb v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podpoglavje 3.1).



Slika 14: Biodosegljiva koncentracija Zn v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podglavje 3.1).



Slika 15: Biodosegljiva koncentracija Cd v tleh. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$). (Za razlago oznake vzorca glej podglavje 3.1).

Preglednica 7: Verjetna koncentracija Pb v krvi otroka (IEUBK model)

Oznaka tal*	µg Pb dL ⁻¹ krvi otroka	
	Originalna tla	Remedirana tla
1	17,6	10
2	20,2	13,2
3	10,2	4,5
4	23,3	13,3
5	16,6	9,8
6	12,5	6,5
7	27,5	15,1
8	37,8	24,7
9	12,8	7
10	15,3	6,1

*glej podglavje 3.1

4.4 BIODOSEGLJIVOST Pb, Zn in Cd V TESTNI RASTLINI *Brassica rapa* var. *chinensis*

V preglednicah 8, 9 in 10 so predstavljene koncentracije potencialno nevarnih kovin Pb, Zn in Cd v nadzemnih delih testne rastline *B. rapa* gojene na remediranih ali originalnih tleh.

Preglednica 8: Koncentracija Pb v *B. rapa*

Oznaka tal°	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)	Remedirana tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)
1	2,0*	0,001	1,9*	0,002
2	3,0 ± 0,2	0,001	PMD	0,000
3	PMD	0,0000	PMD	0,000
4	2,9 ± 0,4	0,001	2,1*	0,002
5	1,8 ± 0,1	0,001	PMD	0,000
6	PMD	0,000	PMD	0,000
7	10,9 ± 2,1	0,003	2,0*	0,001
8	17,4 ± 3,2	0,003	2,1*	0,001
9	PMD	0,0000	PMD	0,000
10	1,9*	0,003	1,7*	0,001

*Meritev enega vzorca (druga dva sta pod mejo detekcije)

°glej podglavje 3.1

Preglednica 9: Koncentracija Zn v *B. rapa*. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$).

Oznaka tal ^o	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)	Remedirana tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)
1	^a 207,9 \pm 22,7	0,09	^b 140,0 \pm 14,6	0,09
2	^a 128,2 \pm 5,3	0,06	^b 84,3 \pm 6,5	0,08
3	^a 47,3 \pm 2,0	0,05	^a 49,0 \pm 3,1	0,06
4	^a 60,0 \pm 2,6	0,04	^b 92,2 \pm 8,5	0,08
5	^a 94,6 \pm 3,8	0,07	^a 92,2 \pm 5,1	0,08
6	^a 56,6 \pm 2,5	0,01	^a 68,1 \pm 6,1	0,02
7	^a 117,8 \pm 3,7	0,04	^a 113,5 \pm 2,0	0,06
8	^a 151,1 \pm 21,8	0,06	^b 137,0 \pm 19,6	0,03
9	^a 55,4 \pm 5,5	0,05	^a 48,5 \pm 4,7	0,05
10	^a 140,3 \pm 12,2	0,03	^a 139,2 \pm 9,2	0,07

^oglej podpoglavje 3.1

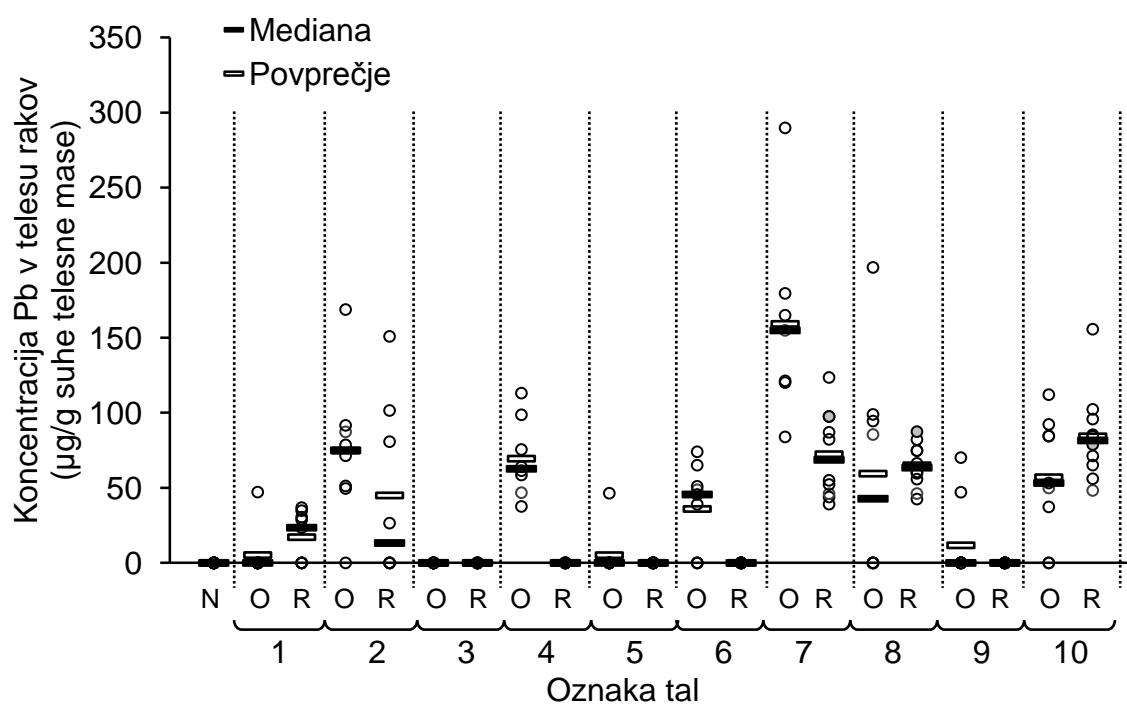
Preglednica 10: Koncentracija Cd v *B. rapa*. Črki "a" in "b" označujeta statistično značilno razliko med biodostopnimi koncentracijami kovine med originalnimi in remediranimi tlemi glede na Studentov t-test ($p < 0,05$), povprečje \pm standardna deviacija ($n=3$).

Oznaka tal ^o	Originalna tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)	Remedirana tla (mg kg ⁻¹ suhe teže)	TF (rastlina/tla)
1	^a 1,9 \pm 0,1	0,18	^a 1,6 \pm 0,2	0,12
2	^a 1,2 \pm 0,1	0,19	^b 0,8 \pm 0,1	0,17
3	^a 1,1 \pm 0,1	0,13	^b 0,7 \pm 0,1	0,10
4	^a 2,1 \pm 0,2	0,13	^b 1,6 \pm 0,1	0,18
5	^a 1,3 \pm 0,1	0,14	^b 0,9 \pm 0,0	0,14
6	^a 2,9 \pm 0,3	0,24	^b 1,5 \pm 0,1	0,33
7	^a 2,1 \pm 0,2	0,17	^b 1,0 \pm 0,0	0,14
8	^a 2,3 \pm 0,2	0,14	^b 1,5 \pm 0,2	0,06
9	^a 3,1 \pm 0,1	0,17	^b 1,4 \pm 0,1	0,18
10	^a 3,9 \pm 0,2	0,07	^b 0,8 \pm 0,0	0,16

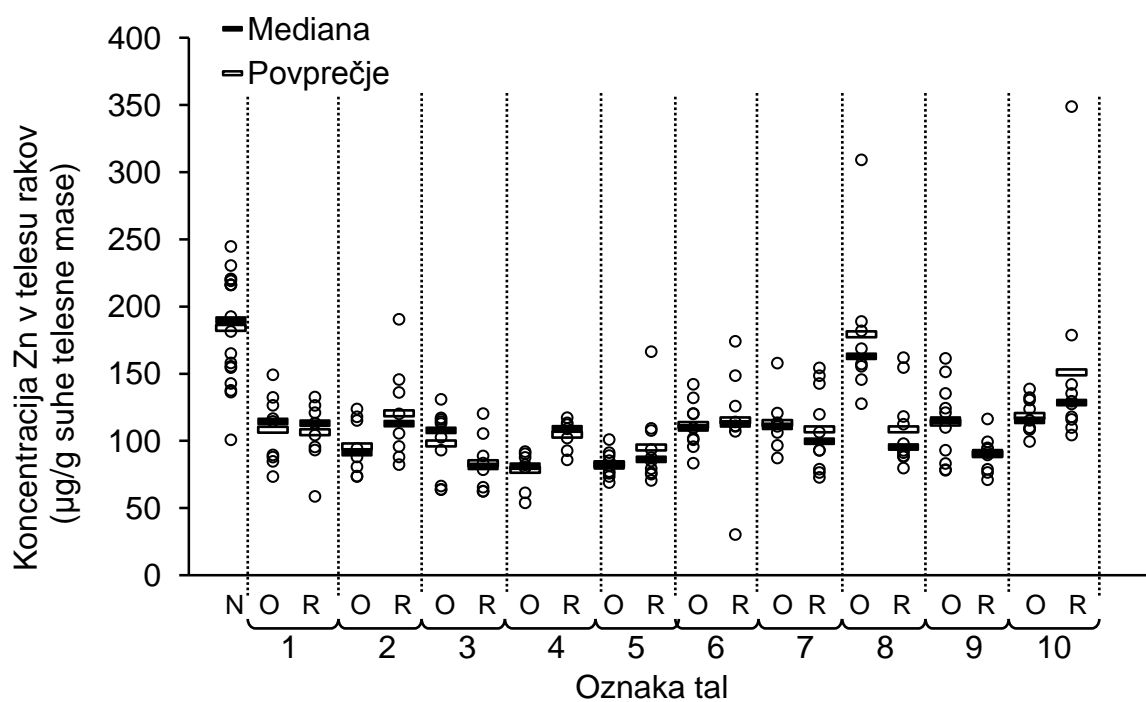
^oglej podpoglavje 3.1

4.5 BIDOSEGLJIVOST Pb, Zn IN Cd V TESTNIH TALNIH ŽIVALIH *Porcellio scaber*

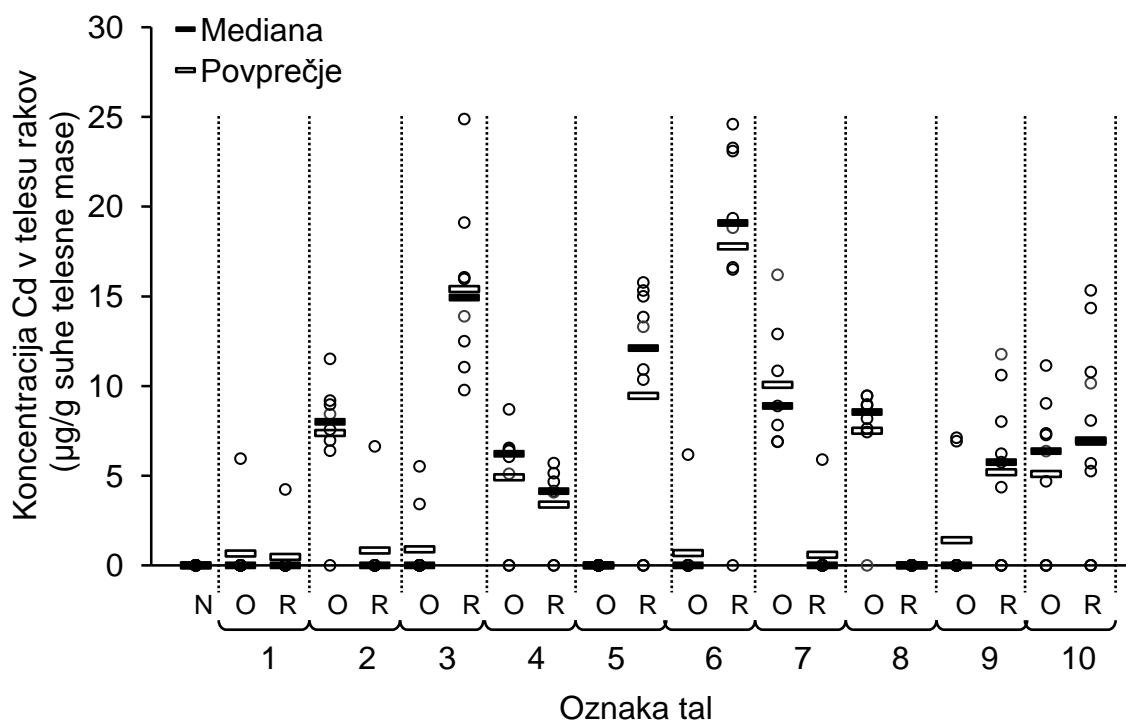
Na slikah od 16 do 18 so predstavljene koncentracije potencialno nevarnih kovin (Pb, Zn in Cd) v telesih kopenskih rakov *P. scaber*, ki smo jih za 14 dni izpostavili remediranim in originalnim tloom. Na slikah sta označena mediana in povprečje koncentracij v rakih za posamezna tla. V preglednici 11 so predstavljeni rezultati statistične primerjave vsebnosti potencialno nevarnih kovin v telesu rakov (*P. scaber*) izpostavljenim tloom pred in po remediaciji, ki smo jih pridobili z Studentovim t-testom.



Slika 16: Koncentracija Pb v telesu rakov *P. scaber* po gojenju na vzorcih tal (oznaka N pomeni koncentracija Pb v kontroli, oznaka O pomeni originalna tla ter oznaka R remedirana tla. Za razlago oznake tal glej podglavje 3.1.)



Slika 17: Koncentracija Zn v telesu rakov *P. scaber* po gojenju na vzorcih tal (oznaka N pomeni koncentracija Zn v kontroli, oznaka O pomeni originalna tla ter oznaka R remedirana tla. Za razlago oznake tal glej podglavje 3.1.)



Slika 18: Koncentracija Cd v telesu rakov *P. scaber* po gojenju na vzorcih tal (oznaka N pomeni koncentracija Cd v kontroli, oznaka O pomeni originalna tla ter oznaka R remedirana tla. Za razlago oznake tal glej pod poglavje 3.1.)

Preglednica 11: Rezultati statistične primerjave vsebnosti Cd, Pb in Zn v telesu rakov *P. scaber*, izpostavljenih remediranim in originalnim tlam, z Studentovim t-testom.

Primerjava koncentracij kovin v telesu rakov <i>P. scaber</i> , izpostavljenih remediranim in originalnim tlam	<i>p</i> -vrednosti za posamezno kovino (Studentov t-test)		
	Pb	Zn	Cd
O1 ↔ R1	N/A	0,871	N/A
O2 ↔ R2	N/A	0,121	N/A
O3 ↔ R3	N/A	0,194	N/A
O4 ↔ R4	N/A	0,002	0,0126
O5 ↔ R5	N/A	0,217	N/A
O6 ↔ R6	N/A	0,833	N/A
O7 ↔ R7	0,0339	0,723	N/A
O8 ↔ R8	N/A	0,009	N/A
O9 ↔ R9	N/A	0,045	N/A
O10 ↔ R10	0,4476	0,196	0,2158

Opomba: Črka O označuje originalna tla, črka R pa ista tla po remediaciji.
 NA – premalo rezultatov nad mejo detekcije in/ali kvantifikacije za statistično analizo.

5 RAZPRAVA

5.1 SPLOŠNE LASTNOSTI VZORCEV TAL

Koncentracija potencialno nevarnih kovin v vzorcih tal

Koncentracije potencialno nevarnih kovin v naših originalnih vzorcih tal so močno presežene, saj večina vzorcev pri vseh treh potencialno nevarnih kovinah, ki smo jih analizirali, presega kritično vrednost snovi v tleh, ki je določena z Uredbo o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Edino tla z oznako 3,6 in 9 pri koncentraciji Cd ne presegajo kritične vrednosti, ampak zgolj opozorilno. Najbolj onesnažen vzorec tal z oznako 8 kritične emisijske vrednosti, določene z uredbo, za Pb, Zn in Cd presega za kar 12-krat, 11-krat in 2,4-krat. Najnižja izmerjena koncentracija Pb v naših vzorcih je 874, Zn 934 ter Cd 6,0 mg kg⁻¹ suhih tal. Kritična mejna emisijska vrednost v tleh za Pb, Zn in Cd pa je 530, 720 in 12 mg kg⁻¹ suhih tal (Uredba o mejnih ...). Če pogledamo razlago kritične emisijske vrednosti v uredbi, se ta glasi: »Kritična vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, pri kateri zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na človeka in okolje onesnažena tla niso primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode.« Torej večina naših vzorcev tal glede na uredbo ni primerna za nadaljnjo uporabo. S postopkom remediacije smo uspeli iz tal odstraniti 44–66 % celokupnega Pb, 5–56 % celokupnega Zn in 11–66 % celokupnega Cd. Vzrok nižjega procenta odstranitve Zn lahko pripišemo temu, da so kovine v tleh različno vezane na talne komplekse in očitno je Zn pri določenih tleh vezan na težje dostopne frakcije v tleh (Udovič in Leštan, 2009).

Tako smo pri dveh vzorcih tal (3 in 6) dosegli znižanje koncentracij Pb pod kritično mejo, koncentracija Zn je pri vseh vzorcih ostala nad kritično mejo, koncentracija Cd pa je nad kritično ostala zgolj pri vzorcih 8 in 1. Remediacija je torej zmanjšala celokupne koncentracije potencialno nevarnih kovin v tleh, vendar glede na slovensko zakonodajo te še vedno presegajo kritične vrednosti le-te. Tla po slovenski zakonodaji zato še vedno niso primerna za uporabo, kajti slovenska zakonodaja upošteva zgolj celokupne koncentracije potencialno nevarnih kovin v tleh in ne biodosegljive koncentracije potencialno nevarnih kovin v tleh. Biodostopen del celokupne koncentracije potencialno nevarne kovine v tleh je namreč tisti, ki nam pove, koliko potencialno nevarne kovine lahko organizem prevzame in nam bolj natančno oriše nevarnost pri uporabi teh tal (Finžgar in Leštan, 2008).

Delež organske snovi in karbonatov ter pH tal

V procesu remediacije EDTA vpliva tudi na strukturo tal in posledično tudi na raztapljanje organske snovi in karbonatov (Jelušič in Leštan, 2013). Zato imamo pri določenih vzorcih tal 2, 5, 6, 8 in 10 nižji procent karbonatov v remediranih tleh kot pri originalnih, pri ostalih vzorcih je procent ostal enak. Pri procentu organske snovi se nam je v večini tal znižal, vendar pri nekaterih vzorcih je ta razlika zelo minimalna, par procentov. Tako lahko zaključimo, da remediacija ni imela večjega vpliva na procent organske snovi in karbonatov v tleh. pH tal se je pri večini rahlo povečal, kar bi lahko pripisali izpiranju huminskih in fulvo kislin. Fulvo kisline oziroma depolimerizacija njihovih agregatov pa bi lahko bila tudi posledica znižanja pH pri vzorcih tal 4 in 5. Organske komponente med sabo vežejo kovinski ioni, najpogostejši je Fe³⁺. Pri remediaciji uporabljamo natrijev

EDTA, Fe^{3+} se veže na EDTA in zamenja Na^+ , ki kot monovalenti kation nima enako velike ionske jakosti, da bi še naprej združeval organske komponente, zato agregati depolimerizirajo, organska snov pa se lahko izpira. Pri tleh, kjer je količina organske snovi velika (tla 5), in je po navadi posledično tudi večja količina fulvo kislin, ki ob depolimerizaciji struktur oddajajo H^+ ione na EDTA, se zniža pH (Hao in sod., 2001 in Leštan, 2011).

5.2 BIODOSEGLJIVOST KOVIN ZA ČLOVEKA (*in vitro* metoda)

Za določanje biodosegljivosti kovin smo uporabili dve *in vitro* metodi. Prva UBM metoda uporablja ekstrakcijski medij, ki posnema kemijsko okolje v želodčno-črevesnem človeškem sistemu, medtem ko druga metoda SOP za *in vitro* določanje biodostopnosti svinca v tleh upošteva zgolj fiziološko relevanten pH v želodcu in uporablja glicinski pufer kot ekstrakcijski medij (Wragg in sod., 2011).

S tema metodama določimo oralno biodostopnost potencialno nevarnih kovin v želodčni in črevesni fazi. Pomembnejša je oralna biodostopnost v črevesni fazi, ki se nanaša na maksimalno količino potencialno nevarnih kovin, ki se lahko sprosti iz tal v prebavne sokove in je na razpolago za absorpcijo skozi črevesni epitel. To določamo z UBM testom, ki nam določi koncentracijo v črevesni fazi. Pomembnejša od biodostopnostne je biorazpoložljiva frakcija potencialno nevarnih kovin, ta namreč doseže sistemski krvni obtok in je dejanska koncentracija potencialno nevarnih kovin, ki lahko vpliva na človeka. Ampak, ker vemo, da je biodosegljivost eden glavnih limitirajočih faktorjev za biorazpoložljivost, ga uporabljamo kot enega glavnih parametrov pri določanju nevarnosti vnosa potencialno nevarnih kovin v človeka (Wragg in sod., 2011).

Naši rezultati za UBM metodo kažejo, da se je biodosegljivost potencialno nevarnih kovin v naših vzorcih pri večini zmanjšala, razen za biodostopnost Zn pri vzorcih z oznako 4,5 in 6, kjer se je rahlo povečala. Pri sami UBM metodi je zelo pomembno uravnavanje vrednosti pH v želodčni fazi, saj ta močno vpliva na končno biodosegljivost potencialno nevarnih kovin (Wragg in sod., 2011). Mežiška tla, ki smo jih uporabljali pri analizi, vsebujejo veliko karbonatov, ki vplivajo na vrednost pH. Ta tla so zato zelo problematična za analizo, saj je uravnavanje pH pri UBM metodi težko, kajti meje odstopanja končne pH vrednosti v modelu so nizke, sam postopek kisanja pa je zelo subjektiven in težko ponovljiv. Vseeno rezultati na slikah 10, 11 in 12 kažejo na zmanjšanje biodosegljivosti Pb od 17 do 95 %, Zn od 40 do 90 % in Cd od 40 do 99 %. Tudi pri drugi metodi SOP smo izmerili znižanje biološko dostopne koncentracije potencialno nevarnih kovin. Rezultati na slikah 13, 14 in 15 kažejo na zmanjšanje biološko dosegljive koncentracije Pb od 48 do 72 %, Zn od 25 do 65 % in Cd od 40 do 69 %. Merjenje in določanje biodostopnosti potencialno nevarnih kovin za človeka je pomembnejše od merjenja celokupnih koncentracij potencialno nevarnih kovin v tleh. Kajti šele rezultati modelov za določanje biodostopnosti kovin v črevesni fazi nam pokažejo, kakšna je resnična nevarnost za populacijo, saj le biodostopen del potencialno nevarnih kovin iz tal lahko vstopa v stik z organizmom in mu škoduje (Zia in sod., 2011).

Poleg obeh metod za določanje biodostopnosti potencialno nevarnih kovin smo podatke iz drugega testa SOP prenesli v model IEUBK. Model IEUBK je eden najbolj izpopolnjenih modelov, ki se uporabljajo. Model na podlagi vnesenih podatkov o izpostavljenosti svincu iz različnih virov izračuna najverjetnejšo vsebnost svınca v krvi otrok (Ivartnik in Eržen, 2009). Naši rezultati kažejo, da imajo otroci, ki živijo v okolju, kjer smo vzeli vzorce tal, veliko verjetnost presežene koncentracije svınca v krvi, kajti niti pri enih originalnih tleh najverjetnejša koncentracija svınca v krvi otroka, ki bi živel na področju s temi tlemi, ni pod določeno zakonsko mejo $10 \mu\text{g dL}^{-1}$, kaj šele pod priporočeno mejo $5 \mu\text{g dL}^{-1}$. Pri remediranih vzorcih tal se je najverjetnejša koncentracija Pb v krvi otroka zmanjšala 35–60 % in pri 6 vzorcih padla pod mejo $10 \mu\text{g dL}^{-1}$.

5.3 BIDOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN ZA RASTLINE (poskus z *Brassica rapa var chinensis*)

Prehranjevanje ljudi z rastlinami, ki so gojene na onesnaženih tleh, je ena najpomembnejših poti vnosa potencialno nevarnih kovin v prehranjevalno verigo. Za nekatere posameznike je namreč vrtnarjenje ena od možnosti, da si sami pridelajo svežo zelenjavo in tako zmanjšajo tudi stroške, ki jih namenjajo za nakup hrane (Sipter in sod., 2008). Z remediacijo lahko uspešno zmanjšamo vnos potencialno nevarnih kovin v rastline (Jelusic in sod., 2014). Naši rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih objavili Jelusic in sod. (2014). Koncentracije Pb v nadzemnih delih kitajskega zelja, gojenega na originalnih tleh so med $0\text{--}17 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase, Zn med $47,3\text{--}515,1 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase in Cd $1,1\text{--}3,9 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase. Koncentracije v nadzemnih delih kitajskega zelja, gojenega na remediranih tleh, pa za Pb med $0\text{--}2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase, Zn med $48,5\text{--}139,2 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase in Cd med $0,7\text{--}1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ suhe mase. Pri gojenju rastlin na remediranih tleh nismo dobili statistično značilnih rezultatov koncentracije Pb v rastlinah. Pri večini rastlin je koncentracija Pb pod mejo detekcije. Zanimivo je, da pri 3 vzorcih z najnižjo koncentracijo Pb v tleh niti pri gojenju v originalnih tleh v zelju nismo zaznali merljivih koncentracij Pb. Naši rezultati kažejo na to, da sta v tleh Cd in Zn bolj mobilna od Pb, podobno so ugotovili tudi že Ullrich in sod. (1999) ter Sipter in sod. (2008). Ullrich in sod. (1999) so odkrili tudi dejstvo, da se fitodostopnost Pb, Zn in Cd v zgornjih delih tal spH vrednostjo med 5 in 7 razporedijo po zaporedju Cd, Zn in Pb. To kažejo tudi rezultati $TF_{\text{rastlina}/\text{tla}}$ v preglednicah 8, 9 in 10, kjer je lepo vidno, da je $TF_{\text{rastlina}/\text{tla}}$ pri Pb najnižji, Zn malo višji in pri Cd najvišji. Koncentracija Pb v rastlinah je pri večini vzorcev tal nizka tudi pri originalnih tleh, kar lahko kaže na to, da so rastline slabo sprejemale kovine v nadzemne dele, za podzemne dele namreč nimamo podatkov. Rastline namreč večino potencialno nevarnih kovin zadržijo v koreninah (Manara, 2012). Mogoče smo posadili tak kultivar, ki vsrkava zelo malo svınca v nadzemne dele (Liu in sod., 2010) ali pa je Pb v tleh vezan na talne frakcije, ki so rastlinam manj dostopne (Sharma in Dubey, 2005) in je zato vnos kovin v rastline nižji.

Večino kitajskega zelja, ki smo ga pridelali, je po zakonodaji (Uredba 1881/2006) primeren za uživanje, kajti koncentracije Pb so nižje od $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ mokre teže, razen pri gojenju rastlin na vzorcih 7 in 8, kjer so koncentracije 3-krat presežene. Prav tako je tudi pri Cd večino vzorcev pod zakonsko določeno mejo $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ mokre teže, razen vzorcev 7 in 8, kjer je koncentracija 1-krat presežena. Naši rezultati kažejo na to, da fitodosegljivost za naše testne rastline v naših originalnih vzorcih tal, razen pri dveh

najbolj onesnaženih vzorcih (7 in 8), ni problematična. Smo pa z remediacijo uspeli zmanjšati tudi fitodosegljivost pri vzorcih 7 in 8. Je pa zanimivo, da je faktor transporta med rastlino in tlemi za vse tri kovine ostal približno enak, kar kaže na to, da v tleh ostaja neko konstantno razmerje med biološko nedostopnimi in biološko dostopnimi koncentracijami Pb, Zn in Cd v originalnih in remediranih tleh (Udovič in sod., 2009).

5.4 BIDOSEGLJIVOST POTENCIALNO NEVARNIH KOVIN ZA TALNE ŽIVALI (poskus s *Porcellio scaber*)

Talni organizmi *Porcellio scaber* jedo ostanke rastlin, ki so navadno pomešani s tlemi. V našem poskusu smo jih gojili zgolj na tleh brez dodatkov rastlinskega materiala, vendar so bila to večinoma vrtna tla in zato bogata z organsko snovjo. Zaradi nizkih mej kvantifikacije in detekcije pri plamenskem atomskem spektrofotometru nismo dobili veliko podatkov o koncentraciji kovin v rakah. Iz rezultatov na slikah 16, 17 in 18 lahko vidimo, da so koncentracije kovin v rakah, ki so bili izpostavljeni določenim originalnim tloom pod mejama detekcije in/ali kvantifikacije. Pri Pb so to tla z oznako 1, 3 in 5, pri Cd 1, 3, 5, 6 in 9. Iz tega lahko sklepamo, da je velika večina kovine v tleh vezana na težje dostopne frakcije tal in zato biološko nedosegljiva za talne živali v našem poskusu.

Iz rezultatov na sliki 16 lahko vidimo, da sta za statistično analizo koncentracije Pb v rakah primerna zgolj dva vzorca tal in sicer 7 in 10, pri ostalih vzorcih nimamo zadostnega števila rezultatov, ki bi bili nad mejo detekcije in/ali kvantifikacije. Pri vzorcu 10 primerjava med raki, izpostavljenim originalnim ali remediranim tloom, ni pokazala statistično značilnih razlik med vsebnostmi Pb v izpostavljenih živalih, medtem ko smo pri vzorcu 7 dobili statistično značilno zmanjšanje koncentracije Pb v rakah, ki so bili izpostavljeni remediranim tloom glede na koncentracijo Pb v rakah, ki so bili izpostavljeni originalnim tloom. Za ostale vzorce 1, 3, 4, 5, 6, 8 in 9 ne moremo podati nobenih zaključkov.

Iz slike 18 ter preglednice 11 lahko podobno opazimo tudi za koncentracijo Cd. Statistično lahko analiziramo namreč zgolj dva vzorca tal, in sicer 4 in 10, kjer pa pri nobenem od njiju ne dobimo statistično značilnih razlik med vsebnostjo Cd v rakah, izpostavljenih remediranim ali originalnim tloom. Pri rezultatih na sliki 18 lahko opazimo, da so bile koncentracije v živalih, izpostavljenih remediranim tloom št. 3, 5, 6 in 9, katerih telesna koncentracija Cd je bila nad mejo detekcije in/ali kvantifikacije FAAS, višje od tistih pri živalih, izpostavljenih ustrežajočim originalnim tloom. Na žalost nam število preostalih podatkov ne dopušča statistične analize. Iz podatkov na sliki 18 lahko predpostavimo, da je proces remediacije biodosegljivost Cd v tleh št. 3, 5, 6 in 9 pravzaprav povečal, vendar tega statistično ne moremo potrditi. Razlago mogočega povečanja biodostopnosti Cd lahko najdemo v tem, da je bil v originalnih tleh Cd morda vezan na organske ostanke in smo z remediacijo povzročili, da se je ta odcepil in so nastali Cd^{2+} . Ti kationi so mogoče vezani tudi na EDTA, ki je lahko ostal v tleh zaradi slabega izpiranja tal v postopku remediacije. Kationska oblika Cd pa je za rake veliko bolj biološko dostopna kot Cd, vezan na neko organsko komponento (Calhoa in sod., 2011). Pri vzorcih 1, 2, 7 in 8 pa lahko predpostavimo, da se je biodosegljivost Cd po remediaciji znižala, saj je večina živali, izpostavljenih remediranim tloom, vsebovala koncentracijo Cd pod mejama detekcije in/ali kvantifikacije FAAS, medtem ko je bilo med živalmi, izpostavljenimi ustrežajočim

originalnim tlom, veliko več takih, katerih telesna koncentracija Cd je presegla mejo kvantifikacije FAAS.

Pri Zn so vsi podatki nad mejama detekcije in/ali kvantifikacije, kajti Zn je esencialni element za kopenske rake (Hopkin, 1986), zato obstaja določena meja Zn, ki je stalno prisotna v živalih. Večina koncentracij Zn v telesih izpostavljenih živali tako ne kaže statistično značilnih razlik med remediranimi in originalnimi vzorci. Izjema je le vzorec 4, kjer se je koncentracija Zn statistično zvišala v rakah, ki so bili izpostavljeni remediranim tlom glede na skupino, ki je bila izpostavljena originalnim in pa vzorca 8 in 9, kjer se je ta statistično znižala. Pri kontrolnih meritvah Zn v telesih rakov smo pri kontrolni skupini izmerili višjo koncentracijo kot pri tisti, ki smo jo uporabljali za poskuse. Očitno je bilo v vzorcu živali, ki smo jih nabrali dve leti kasneje na istem kraju, nivo prisotnega Zn večji kot v tistih, ki smo jih nabrali pred 2 letoma. Glede na rezultate, ki smo jih lahko statistično obdelali, in ostala sklepanja lahko ugotovimo, da remediacija včasih poveča, včasih pa zmanjša biodostopnost določene kovine za kopenske rake. Ker nimamo dovolj podatkov o lastnostih tal oziroma ne vemo, v kakšni obliki so potencialno nevarne kovine prisotne v tleh, ne moremo sklepati, zakaj pride do tega pojava.

6 SKLEPI

1. Z remediacijo smo zmanjšali koncentracijo kovin v tleh, vendar je koncentracije Pb in Zn v večini vzorcev nad zakonsko določeno mejo, razen pri vzorcih 3 in 6, kjer je koncentracija Pb pod kritično mejo. Koncentracije kadmija v remediranih tleh so pod zakonsko določeno kritično mejo, razen pri vzorcih 1 in 8, kjer je koncentracija še vedno nad kritično mejo.

2. Z remediacijo smo pri vseh vzorcih tal zmanjšali biodostopnostno koncentracijo Cd za teste rastline *Brassica rapa var. chinensis*. Pri Zn smo pri tleh z oznako 1, 2, 7 in 8 zmanjšali koncentracijo biodostopnostnega Zn, pri vzorcih tal 3, 9 in 10 ni bilo razlik, pri vzorcih 4, 5 in 6 pa se je biodostopnostna frakcija Zn povečala. Pri Pb zaradi statistično neznačilnih rezultatov in slabega sprejema Pb v nadzemne dele rastline ne moremo sklepati ali je po remediaciji prišlo do znižanja ali zvišanja biodostopnostne frakcije Pb za testne rastline. Verjetno bi bilo potrebno podaljšati čas izpostavitve.

3. Z remediacijo smo zmanjšali biodostopnost Pb in Cd za človeka v vseh vzorcih. Pri biodostopnostni frakciji Zn pa smo pri vzorcih 1, 2, 3, 7, 8 in 9 prav tako dosegli znižanje biodostopnega Zn, pri tleh z oznako 4, 5 in 6 pa je prišlo do zvišanja biodostopnega Zn za človeka. Prav tako smo z IEUBK modelom dokazali, da bi se po remediaciji pri 6 vzorcih tal koncentracija Pb v krvi otrok lahko znižala pod $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4. Pri biodostopnosti kovin za rake enakonožce nimamo dovolj statistično značilnih razlik med vsebnostmi Pb, Zn in Cd v rakih, izpostavljenih originalnim ter remediiranim tlom, da bi lahko trdili, ali se je koncentracija biodostopnostne frakcije kovin po remediaciji zmanjšala ali povečala. Za detekcijo koncentracije kovin smo namreč uporabili metodo, ki ima prenizki meji detekcije ali kvantifikacije za naše vzorce. Ali pa je bil čas izpostavitve prekratek.

7 POVZETEK

Iz Mežiške doline smo remedirali 10 vzorcev tal. Vzorci so imeli razmeroma visoke koncentracije kovin, ki so se gibale 874–6441 mg kg⁻¹ Pb, 934–7946 mg kg⁻¹ Zn in 6–29 mg kg⁻¹ Cd. Koncentracije so po večini za nekajkrat presegale zakonsko določene kritične meje za posamezno kovino. S postopkom remediacije smo uspeli iz tal odstraniti 44–66 % celokupnega Pb, 5–56 % celokupnega Zn in 11–66 % celokupnega Cd. Vendar nam zaradi začetnih visokih koncentracij Pb in Zn ni uspelo celokupne koncentracije kovin znižati pod zakonsko določeno kritično mejo, razen pri vzorcih 3 in 6, kjer smo uspeli pri Pb priti pod kritično mejo. Celokupno koncentracijo Cd smo uspeli znižati pod kritično mejo pri osmih vzorcih, dva vzorca (1 in 8) pa sta ostala nad kritično mejo. Nas pa je bolj kot celokupna koncentracija zanimalo zmanjšanje biodostopnostne koncentracije potencialno nevarnih kovin za posamezne organizme.

Pri testnih rastlinah smo ugotovili, da se je biodostopna frakcija Cd za rastline v vzorcih zmanjšala, pri Zn se ni spremenila oziroma se je celo malo povečala pri določenih vzorcih. Pri Pb pa nismo dobili statistično značilnih rezultatov, kar kaže na to, da Pb že v originalnih tleh ni prisoten v biološko dostopnih frakcijah, saj so koncentracije v nadzemnih delih rastline nizke ali pa je bil čas izpostavitve prekratek.

Pri testnih živalih smo imeli težavo z nizko mejo detekcije in kvantifikacije, ki jo omogoča FAAS, kajti naše koncentracije pri Pb in Cd so bile nizke, zato nismo imeli dovolj podatkov za statistične analize, razen pri vzorcih 7 in 10. Kjer se je pri vzorcu 7 koncentracija biodostopnega Pb statistično zmanjšala, pri vzorcu 10 te statistične razlike nismo zaznali. Podobno je pri Cd, kjer imamo tudi zgolj dva vzorca (4 in 10), ki imata dovolj podatkov, vendar ni statistično značilnih razlik med raki enakonožci, izpostavljenimi remediranim ali originalnim tlom. Koncentracija Zn je bila med vzorci tal, kot med primerjavo rakov enakonožcev, izpostavljenim remediranim in originalnim vzorcem, enaka, kar lahko pripišemo nekemu naravnemu ozadju Zn oziroma koncentraciji, ki je prisotna v rakah enakonožcih, za katere je Zn esencialni element. Z remediacijo smo zmanjšali biodostopnost Pb, Zn in Cd za rake. Vendar je to znižanje pri dveh vzorcih tal 4, 5 pri Pb, zelo majhno in lahko rečemo, da je biodostopnost pri teh dveh vzorcih ostala na enaki ravni. Prav tako je bila koncentracija biodostopnega Cd v tleh z oznako 5, 6 in 9 že v originalnih tleh pod mejo detekcije naše metode s FAAS, tako da ne moremo narediti nobenih zaključkov.

Našo hipotezo: »Z remediacijo odstranimo topne in šibko vezane kovine iz tal, v tleh preostale kovine pa so predvidoma za testne organizme biološke nedostopne, ker so netopne in močno vezane v tleh«, težko ovržemo ali potrdimo, saj so rezultati naših testov zelo različni. Pri določenih vzorcih tal smo uspeli z zmanjšanjem biodostopnostne frakcije za posamezno kovino, spet pri drugih ne. Zanimivo je tudi, da naši rezultati nakazujejo, da določena frakcija, ki je dostopna rastlinam ali talnim organizmom, ni nujno dostopna človeku in obratno. Za podrobnejšo analizo bi potrebovali več statistično značilnih rezultatov oziroma bi morali uporabiti metodo z nižjo mejo detekcije in kvantifikacije kovin oziroma bolj občutljivo metodo. Mogoče bi bilo za boljše rezultate bolje vzeti manj tal z različnimi lastnostmi in na njih opraviti več ponovitev in tako pridobiti več podatkov, ki bi omogočali boljše statistično analizo. Z našimi rezultati pa hipoteze ne moremo ne ovreči ne potrditi.

8 VIRI

- Ashraf M. A., Maah M. J., Yusoff I. 2014. Soil contamination, risk assessment and remediation. V: Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. Hernandez-Soriano M. C. (ur.). Rijeka, InTech: 3-56
<http://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/soil-contamination-risk-assessment-and-remediation> (11. 3. 2015)
- Benavides P. M., Gallego M. S., Tomaro L. M. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 1: 21-34
- Broadley M. R., White J. P., Hammond P. J., Zelko I., Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677-702
- Buekers J. Redeker S. E. in Smolders E. 2009. Lead toxicity to wildlife: Derivation of a critical blood concentration for wildlife monitoring based on literature data. *Science of the Total Environment*, 407: 3431-3438
- Bugguide. Identification, images, & information for insects, spiders & their kin. Canada. Iowa state university, Department of entomology. 2013-2015.
<http://bugguide.net/node/view/36480/bgpage> (12. 5 2015)
- Burger J. 2008. Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Science of the Total Environment*, 389: 37-45
- Calhoa C. F., Monteiro M. S. Soares A. M. V. M., Mann M. R. 2011. The influence of metal speciation on the bioavailability and sub-cellular distribution of cadmium to the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. *Chemosphere*, 83, 4: 531-537
- Case studies in environmental medicine (CSEM): Lead toxicity. 2010. Atlanta. Agency for toxic substances and disease registry: 71 str.
<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/lead/docs/lead.pdf> (11. 3. 2015)
- Chasapis C. T., Loutsidou A. C., Spiliopoulou C. A., Stefanidou M. E. 2011. Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*, 86, 4: 521-534
- Childhood lead poisoning. 2010. Geneva, WHO: 72 str.
<http://www.who.int/ceh/publications/leadguidance.pdf> (11. 3. 2015)
- Chinese cabbage, production guidelines. 2013. Pretoria. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries: 8 str.
<http://www.nda.agric.za/docs/Brochures/chinese.pdf> (28. 6. 2015)
- Duffus H. J. 2002. »Heavy metals« - a meaningless term?. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 5: 793-807

- Eisler R. 1993. Zinc hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Department of the interior: 126 str.
https://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_26_Zinc.pdf (28. 6 . 2015)
- Exposure to cadmium: a major public health concern. Preventing disease through healthy environments. 2010. WHO: 4 str.
<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf?ua=1> (11. 3. 2015)
- Fiedler H. J., Hoffmann F., Schmiedel H. 1964. Die Untersuchung der Boden. Band 1. 1st ed. Dresden und Leipzig, Theodor Steinkopff: 234 str.
- Finžgar N., Leštan D. 2007. Multi-step leaching of Pb and Zn contaminated soils with EDTA. *Chemosphere*, 66, 5: 824-832
- Finžgar N., Leštan D. 2008. Ocena dostopnosti težkih kovin iz onesnaženih tal Mežiške doline. *Acta agriculturae Slovenica*, 91,1: 157-166
- Finžgar N., Erika J., Voglar D., Leštan D. 2013. Spatial distribution of metal contamination before and after remediation in the Meza Valley, Slovenia. *Geoderma*, 217-218: 135-143
- Godt J., Scheidig F., Grosse-Siestrup C., Esche V., Brandenburg P., Reich A., Groneberg A. D. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1: 22
- Guidelines for interpretation of the biological effects of selected constituents in biota, water and sediment; Zinc. National irrigation water quality program. 1998. United state department of the interior: 198 str.
<http://www.usbr.gov/nwq/guidelines/pdf/Zinc.pdf> (28. 6. 2015)
- Hao Y., Moriya A., Maruyama T., Ohmukai Y., Matsuyama H. 2011. Effect of metal ions on humic acid fouling of hollow fiber ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*, 376: 247-253
- Hogervorst J., Plusquin M., Vangronsveld J., Nawrot t., Cuypers A., Van Hecke E., Roels A. H., Carleer R., Staessen A. J. 2006. House dust as possible route of environmental exposure to cadmium and lead in the adult general population. *Environmental Research*, 103: 30-37
- Hopkin S. P. 1986. The Woodlouse *Porcellio scaber* as a 'Biological Indicator' of Zinc, Cadmium, Lead and Copper Pollution. *Environmental Pollution (Series B)*, 11: 271-290
- International Cadmium Association (ICDA)
<http://www.cadmium.org/> (11. 3. 2015)

International zinc association (IZA)

<http://www.zinc.org/> (11. 3. 2015)

Ivartnik M., Eržen I. 2010. The IEUBK model for lead blood burden prediction in children used in the exploration and remediation of the Upper Meža valley environment. *Slovenian Journal of Public Health*, 49, 2:76-85

Järup L., Åkesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238: 201-208

Jelušič M., Leštan D. 2013. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part I: Toxicity hazards and impact on soil properties. *Science of The Total Environment*, 475: 132-141

Jelušič M., Vodnik D., Macek I., Leštan D. 2013. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part II: Can remediated soil be used as a plant substrate?. *Science of The Total Environment*, 475: 142-152

Juričič M., Čakš T., Zupan M., Kralj L., Gorenc S., Lajovic J., Erčulj V., Tič I. Izpostavljenost prebivalcev občine Zagorje ob Savi okoljskim onesnažilom - težkim kovinam v tleh in živilih rastlinskega izvora – Poročilo. Ljubljana, Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana, Enota Zasavje: 42 str.

Ke S., Cheng X., Li H., Jia W., Zhang J., Lua H., Wang Z., Chen Z. 2015 Body burden of cadmium and its related factors: A large-scale survey in China. *Science of The Total Environment*, 511: 649-654

Korff C. 2014. Case Study: Elemental Toxicity in Animals

http://chemwiki.ucdavis.edu/Inorganic_Chemistry/Case_Studies/Case_Study%3A_Elemental_Toxicity_in_Animals (28. 6. 2015)

Leštan D. 2015. Remediation of toxic metals contaminated soil using EDTA soil washing V: Heavy metal contamination of soils. Sherameti I., Varma A. (ur.). Springer International Publishing Switzerland: 395-429

Leštan D. 2001. Organska snov tal. Študijsko gradivo

<http://web.bf.uni-lj.si/cpvo/Novo/PDFs/OrganskaSnovTal.pdf> (22. 4. 2015)

Li M. S. 2006. Ecological restoration of mineland with particular reference to the metalliferous mine wasteland in China: A review of research and practice. *Science of The Total Environment*. 357,1-3: 38-53

Liu W., Zhou Q., Zhang Y., Wei S. 2010. Lead accumulation in different Chinese cabbage cultivars and screening for pollution-safe cultivars. *Journal of Environmental Management*, 91, 3: 781-788

- Manara A. 2012. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. Plants and heavy metals. Furini A.(ur.). Softcover: 27 - 53
- Mielke H. W., Gonzales R. C., Mielke P. W. 2011. The continuing impact of lead dust on children's blood lead: comparison of public and private properties in New Orleans. Environmental Research, 111, 8: 1164-1172
- Pourrut B., Shahid M., Douay F., Dumat C., Pinelli E. 2013. Molecular mechanisms involved in lead uptake, toxicity and detoxification in higher plants V: Heavy metal stress in plants. Gupta D. K. (ur.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 121 -147
- Public health statement for zinc. 2005. Atlanta. Agency for toxic substances and disease registry: 7 str.
<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp60-c1-b.pdf> (11. 3. 2015)
- Riggio C. 2013. Porcellio scaber. Animal Diversity Web
http://animaldiversity.org/accounts/Porcellio_scaber/ (12. 5. 2015)
- Rosin A. 2009. The long-term consequences of exposure to lead. Israel Medical Association Journal, 11: 689-694
- Sharma P. Dubey R. S. 2005. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17, 1: 35-52
- Sipter E., Rozsa E., Gruiz K., Tatrai E., Morvai V. 2008. Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. Chemosphere, 71 ,7: 1301-1307
- SIST ISO 10139. Kakovost tal – ugotavljanje pH. 1996: 5 str.
- SIST ISO 10693. Kakovost tal – ugotavljanje vsebnosti karbonatov – volumetrijska metoda. 1995: 7 str.
- Statement on tolerable weekly intake for cadmium. 2011. Parma. . EFSA. EFSA Journal, 9(2), 1975: 1-19
<http://www.europa.eu/en/journal/doc/1975.pdf> (11. 3. 2015)
- Stewart R. L., Farver R. J., Gorsevski V. P., Miner G. J. 2014. Spatial prediction of blood lead levels in children in Toledo, OH using fuzzy sets and the site-specific IEUBK model. Applied Geochemistry, 45: 120-129
- Sudmoon, R., Neeratanaphan, L., Thamsenanupap, P. in Tanee, T. 2015. Hyperaccumulation of cadmium and DNA changes in popular vegetable, *Brassica chinensis* L. International Journal of Environmental Research. 9, 2: 433-438
- UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices. 2012. The Bioaccessibility Research Group of Europe: 10 str.
https://www.bgs.ac.uk/barge/docs/BARGE_UBM_DEC_2010.pdf (11.3.2015)

- Udovič M. in Leštan D. 2009. Pb, Zn and Cd mobility, availability and fractionation in aged soil remediated by EDTA leaching. *Chemosphere*, 74, 10: 1367-1373
- Udovič M., Drobne D., Leštan D. 2009. Bioaccumulation in *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) as a measure of the EDTA remediation efficiency of metal polluted soil. *Environmental Pollution*, 157, 10: 2822-2829
- Ullrich M. S., Ramsey M. H., Helios-Rybicka E. 1999. Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in Upper Silesia, Poland. *Applied Geochemistry*, 14: 187-197
- Uredba komisije (ES) št. 1881/2006 z dne 19. decembra 2006 o določitvi mejnih vrednosti nekaterih onesnaževal v živilih. 2006. Uradni list, L 364: 5-23
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. l. RS št. 68: 5773/96
- Voglar D., Lestan D. 2013. Pilot-scale washing of Pb, Zn and Cd contaminated soil using EDTA and process water recycling. *Chemosphere*, 91: 76-82
- Wragg J. in Cave M. R. 2003., In-vitro Methods for the Measurement of the oral bioaccessibility of selected metals and metalloids in soils: A critical review. R&D Technical Report P5-062/TR/0.1. Bristol. Environment Agency: 28 str.
- Wragg J., Cave M., Basta N., Brandon E., Casteel S., Denys S., Gron C., Oomen A., Reimer K., Tack K., Van de Wiele T. 2011. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the Total Environment*, 409: 4016-4030
- Wuana R. A., Okieimen F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 402647: 20, doi:10.5402/2011/402647: 20 str.
- Yao Z., Li J., Xie H., Yu C. 2012 Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16: 722-729
- Yahua C., Xiangdong L., Zhenguang S. 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere*, 57: 187-196
- Zia H. M., Codling E. E., Scheckel G. K., Chaney L. R. 2011. *In vitro* and *in vivo* approaches for the measurement of oral bioavailability of lead (Pb) in contaminated soils: A review. *Environmental Pollution*, 159: 2320-2327
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 63 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju dr. prof. Domnu Leštanu za njegovo pripravljenost in pomoč ter strokovno podporo pri izdelavi te magistrske naloge. Prav tako bi se rad zahvalil vsem, ki so mi pomagali pri praktičnem delu in mi krajšali čas ob delu: sodelavkam in sodelavcem CPVO ter doktorantom prof. Domna Leštana: Neži, Davidu, Maši, Dragani ter Eriki. Rad bi se zahvalil tudi Teji Romih iz katedre za zoologijo za vso pomoč in njeno stalno pripravljenost pri izvedbi poskusa z raki in obdelavi rezultatov.

Hvala tudi moji družini, staršema ter bratu. Hvala, ker ste mi omogočili študij ter me pri njem podpirali in mi vedno pomagali.

Hvala tudi tebi Anja, ker si bila potrpežljiva z mano in si mi bila v veliko pomoč pri tem življenjskem projektu.