

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nina DERMAN

**KOMBINIRANA METODA INDUCIRANE  
FITOEKSTRAKCIJE IN PRANJA TAL ONESNAŽENIH S  
Pb IN Zn**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nina DERMAN

**KOMBINIRANA METODA INDUCIRANE FITOEKSTRAKCIJE IN  
PRANJA TAL ONESNAŽENIH S Pb IN Zn**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMBINED METHOD OF INDUCED PHYTOEXTRACTION AND  
SOIL WASHING OF Pb AND Zn CONTAMINATED SOIL**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Diplomska naloga je bila narejena na Katedri za pedologijo in varstvo okolja.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 22. 9. 2006 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Dominik VODNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina Derman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD Dn  
DK UDK 504.5:631.453:546.47:546.815:502.13(043.2)  
KG fitoekstrakcija/onesnaženost tal/svinec/cink/izpiranje/*Cannabis sativa*/[S,S] – EDDS  
KK AGRIS T01/P01  
AV DERMAN, Nina  
SA LEŠTAN, Domen (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2007  
IN KOMBINIRANA METODA INDUCIRANE FITOEKSTRAKCIJE IN PRANJA  
TAL ONESNAŽENIH S Pb IN Zn  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 43 str., 5 pregl., 11 sl., 43 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Težke kovine prispevajo velik delež pri onesnaževanju in degradaciji tal. Za tla onesnažena s težkimi kovinami še niso razvite dovolj učinkovite in ekonomične metode remediacije. V kolonskem poskusu smo izvedli novo tehniko remediacije s Pb ( $1750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in Zn ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) onesnaženih tal, ki vključuje inducirano fitoekstrakcijo ter hkratno *in situ* izpiranje Pb in Zn. Uporabili smo biorazgradljiv ligand [S,S] izomero dimetil disukcinata ([S,S] – EDDS) in konopljo (*Cannabis sativa*) kot fitoekstrakcijsko rastlino. Ob dodatku EDDS ( $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  suhih tal) so rastline v svojih nadzemnih delih akumulirale  $1026 \pm 442 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb in  $330 \pm 114,7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn, kar je bilo 1926-krat več Pb in 7,5-krat več Zn kot v kontrolnih rastlinah, pri katerih v tla ni bil dodan ligand. Ne glede na to pa rezultati kažejo, da fitoekstrakcijski potencial konoplje za Pb in Zn ni zadosten in fitoekstrakcija ni primerna metoda remediacije tal onesnaženih s Pb in Zn. Horizontalne prepustne reaktivne pregrade (HPRP), sestavljene iz 3 cm visoke plasti mešanice s hranili obogatenega žaganja, sojine moke in vermiculita ter 3 cm visokega sloja mešanice tal, vermiculita in apatita, smo namestili 20, 30 in 40 cm globoko pod onesnažena tla. V obravnavanjih z dodatkom liganda se je izpiranje iz kolon s HPRP nameščenimi 30 cm globoko zmanjšalo za 435-krat pri Pb in za 4-krat pri Zn, v primerjavi s kolonami brez nameščenih HPRP iz katerih se je po šestih tednih zalivanja izpralo 3,0 % Pb in 4,3 % Zn. HPRP so bile učinkovite pri preprečevanju izpiranja Pb iz talnih kolon z nameščenimi HPRP, niso pa učinkovito preprečile izpiranja Zn.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 504.5:631.453:546.47:546.815:502.13(043.2)  
CX Phytoextraction/contaminated soil/lead/zinc/soil washing/hemp/*Cannabis sativa*/[S,S] – EDDS  
CC AGRIS T01/P01  
AU DERMAN, Nina  
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2007  
TI COMBINED METHOD OF INDUCED PHYTOEXTRACTION AND SOIL WASHING OF Pb AND Zn CONTAMINATED SOIL  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO IX, 43 p., 5 tab., 11 fig., 43 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Heavy metals make a significant contribution to soil contamination and degradation. There are no reliable reports on enough effective and economical methods for remediation of heavy metals contaminated soil. In soil columns experiment, we examined a novel technique for remediation of Pb ( $1750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Zn ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) contaminated soil, based on combined chelator induced phytoextraction and *in situ* soil washing of Pb and Zn. We used a biodegradable [S,S] ethylenediamin disuccinate ([S,S] – EDDS) as a chelator and hemp (*Cannabis sativa*) as the phytoextracting plant. The addition of EDDS ( $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  dry soil) yielded concentrations of  $1026 \pm 442 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb and  $330 \pm 114.7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn in the dry above-ground plant biomass, which were 1926-times higher of Pb and 7.5-times higher of Zn, compared to treatments with no chelator addition. The results of our study indicate that the phytoextraction potential of *Cannabis sativa* for Pb and Zn is not sufficient and phytoextraction is therefore not a feasible remediation option. Horizontal permeable barriers, composed of a 3 cm high layer of nutrient enriched sawdust, soya meal and vermiculite mixture, and a 3 cm layer of soil, vermiculite and apatite mixture, were positioned 20, 30 and 40 cm deep in the contaminated soil. In chelator treatments, barriers placed 30 cm deep reduced leaching of Pb and Zn by 435- and 4- times, respectively, compared to columns with no barrier, where 3 % and 4.3 % of total initial Pb and Zn, respectively, was leached during 6-weeks water irrigation after chelator addition. Barriers were effective in preventing leaching of Pb but did not efficiently prevent leaching of Zn.

## KAZALO VSEBINE

Ključna informacijska informatika	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 POVOD IN NAMEN IZDELAVE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 TEORETSKE OSNOVE</b>	3
2.1 TLA	3
<b>2.1.1 Onesnaževanje tal</b>	3
2.2 TEŽKE KOVINE V TLEH	4
<b>2.2.1 Vpliv težkih kovin na okolje</b>	5
<b>2.2.2 Svinec in cink</b>	6
2.3 ČIŠČENJE ONESNAŽENIH TAL	9
<b>2.3.1 Fitoremediacija</b>	10
<b>2.3.2 Fitoekstrakcija težkih kovin</b>	11
<b>2.3.3 Pranje tal</b>	16
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	18
3.1 MATERIAL	18
<b>3.1.1 Tla</b>	18
<b>3.1.2 Testna fitoekstrakcijska rastlina</b>	19
<b>3.1.3 Ligand</b>	20
<b>3.1.4 Talne kolone</b>	20
<b>3.1.5 Horizontalna prepustna reaktivna pregrada</b>	21
3.2 METODE	21
<b>3.2.1 Eksperimentalni del</b>	21
3.2.1.1 Zasnova in postavitev poskusa	21
3.2.1.2 Setev testne rastline	23
3.2.1.3 Režim zalivanja	23
3.2.1.4 Odvzem vzorcev odcednih vod	24
3.2.1.5 Priprava vzorcev rastlinskih tkiv	24
3.2.1.6 Odvzem vzorcev tal	24
3.2.1.7 Mikrobnna aktivnost v HPRP	25

<b>3.2.2</b>	<b>Analitske metode</b>	25
3.2.2.1	Določanje vsebnosti Pb in Zn v tleh	25
3.2.2.2	Določanje vsebnosti Pb in Zn v odcednih vodah	25
3.2.2.3	Določanje vsebnosti Pb in Zn v nadzemnih delih rastline	25
3.2.2.4	Določanje fitoekstrakcijskega potenciala in biokoncentracijskega faktorja	26
<b>3.2.3</b>	<b>Statistična analiza</b>	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	27
4.1	VSEBNOST Pb IN Zn V KONOPLJI	27
4.2	DELOVANJE HPRP	28
<b>4.2.1</b>	<b>Mikrobnna aktivnost v HPRP</b>	28
<b>4.2.2</b>	<b>Dinamika izpiranja Pb in Zn v odcednih vodah</b>	30
4.3	VSEBNOST Pb IN Zn V TLEH	31
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	34
5.1	RAZPRAVA	34
<b>5.1.1</b>	<b>Učinkovitost [S,S] - EDDS za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn in vpliv na mobilnost</b>	34
<b>5.1.2</b>	<b>Učinkovitost konoplje kot fitoekstrakcijske rastline</b>	34
<b>5.1.3</b>	<b>Učinkovitost HPRP za preprečevanje izpiranja Pb in Zn</b>	35
5.2	SKLEP	36
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	37
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	
	<b>ZAHVALA</b>	39

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	EPA lestvica prvih 12 nevarnih snovi.	8
Preglednica 2:	Mejne, opozorilne in kritične imisijске vrednosti za nekatere težke kovine v tleh (Uredba...,1996).	9
Preglednica 3:	Osnovne pedološke lastnosti izbranih tal ter vsebnost težkih kovin.	18
Preglednica 4:	Količine dodane 30,6 % raztopine [S,S] – EDDS in vode glede na višino vrhnje plasti tal v kolonah.	20
Preglednica 5:	Koncentracija Pb in Zn po posameznih plasteh talne kolone s HPPR postavljeno 40 cm globoko po koncu 6 tedenskega izpiranja. Vrednosti so podane kot povprečna koncentracija $\pm$ s.d. Začetna koncentracija Pb je bila 1750 $\text{mg kg}^{-1}$ , Zn pa 1300 $\text{mg kg}^{-1}$ .	33

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz inducirane fitoekstrakcije in z njo povezani procesi (po Cunningham in sod., 1995).	12
Slika 2:	Strukturne formule različnih izomer EDDS (Jaworska in sod., 1999).	16
Slika 3:	Konoplja ( <i>Cannabis sativa</i> ); levo (Köhler..., 2007), desno (Čeh Brežnik, 2007).	19
Slika 4:	Eksperimentalna zasnova poskusa (HPRP 20 cm, 30 cm, 40 cm pod površino tal ter kontrola v 4 ponovitvah).	22
Slika 5:	Shematski prikaz sestave talne kolone (Leštan in sod., 2001).	23
Slika 6:	Vsebnost Pb in Zn v zelenih delih konoplje ( <i>Cannabis Sativa</i> ), ki so rasle v 20 cm, 30 cm in 40 cm kolonah po dodatku 10 mmol kg <sup>-1</sup> [S,S] – EDDS ter v kontrolnih kolonah brez dodatka liganda. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev ± standardna deviacija.	27
Slika 7:	Temperaturna razlika med substratno plastjo v koloni s HPRP na globini 30 cm ter tlemi v kontrolni koloni brez HPRP.	28
Slika 8:	PbS v talnih kolonah, v plasti tal tik nad HPRP. Fotografija je desetkrat povečana.	29
Slika 9, 10:	Koncentracije Pb in Zn v odcednih vodah iz kolon s HPRP 20, 30 in 40 cm globoko ter iz kontrolnih kolon brez HPRP po dodatku 10 mmol EDDS kg <sup>-1</sup> suhih tal. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev ± standardna deviacija.	30
Slika 11:	Dinamika izpiranja Pb in Zn skozi profil talnih kolon s HPRP postavljeno 40 cm globoko pred in po dodatku liganda. Vrednosti so podane kot povprečne koncentracije 4 ponovitev ± standardna deviacija po 42 dnevnem izpiranju.	32

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

[S,S]-EDDS	[S,S] izomera etilendiamindijantarne kisline
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
EPA	Environmental Protection Agency
Pb	svinec
Zn	cink
PbS	svinčev sulfid
Ni	nikelj
Cr	krom
Hg	živo srebro
Cd	kadmij
TK	težke kovine
HPRP	horizontalna prepustna reaktivna pregrada
PI	peščena ilovica
s.s.	suha snov
s.d.	standardna deviacija
T	temperatura
BCF	biokoncentracijski faktor
PP	fitoekstracijski potencial



Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Diplomska naloga je bila narejena na Katedri za pedologijo in varstvo okolja.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 22. 9. 2006 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Dominik VODNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina Derman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD Dn  
DK UDK 504.5:631.453:546.47:546.815:502.13(043.2)  
KG fitoekstrakcija/onesnaženost tal/svinec/cink/izpiranje/*Cannabis sativa*/[S,S] – EDDS  
KK AGRIS T01/P01  
AV DERMAN, Nina  
SA LEŠTAN, Domen (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2007  
IN KOMBINIRANA METODA INDUCIRANE FITOEKSTRAKCIJE IN PRANJA  
TAL ONESNAŽENIH S Pb IN Zn  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 43 str., 5 pregl., 11 sl., 43 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Težke kovine prispevajo velik delež pri onesnaževanju in degradaciji tal. Za tla onesnažena s težkimi kovinami še niso razvite dovolj učinkovite in ekonomične metode remediacije. V kolonskem poskusu smo izvedli novo tehniko remediacije s Pb ( $1750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) in Zn ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) onesnaženih tal, ki vključuje inducirano fitoekstrakcijo ter hkratno *in situ* izpiranje Pb in Zn. Uporabili smo biorazgradljiv ligand [S,S] izomero dimetil disukcinata ([S,S] – EDDS) in konopljo (*Cannabis sativa*) kot fitoekstrakcijsko rastlino. Ob dodatku EDDS ( $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  suhih tal) so rastline v svojih nadzemnih delih akumulirale  $1026 \pm 442 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb in  $330 \pm 114,7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn, kar je bilo 1926-krat več Pb in 7,5-krat več Zn kot v kontrolnih rastlinah, pri katerih v tla ni bil dodan ligand. Ne glede na to pa rezultati kažejo, da fitoekstrakcijski potencial konoplje za Pb in Zn ni zadosten in fitoekstrakcija ni primerna metoda remediacije tal onesnaženih s Pb in Zn. Horizontalne prepustne reaktivne pregrade (HPRP), sestavljene iz 3 cm visoke plasti mešanice s hranili obogatenega žaganja, sojine moke in vermiculita ter 3 cm visokega sloja mešanice tal, vermiculita in apatita, smo namestili 20, 30 in 40 cm globoko pod onesnažena tla. V obravnavanjih z dodatkom liganda se je izpiranje iz kolon s HPRP nameščenimi 30 cm globoko zmanjšalo za 435-krat pri Pb in za 4-krat pri Zn, v primerjavi s kolonami brez nameščenih HPRP iz katerih se je po šestih tednih zalivanja izpralo 3,0 % Pb in 4,3 % Zn. HPRP so bile učinkovite pri preprečevanju izpiranja Pb iz talnih kolon z nameščenimi HPRP, niso pa učinkovito preprečile izpiranja Zn.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 504.5:631.453:546.47:546.815:502.13(043.2)  
CX Phytoextraction/contaminated soil/lead/zinc/soil washing/hemp/*Cannabis sativa*/[S,S] – EDDS  
CC AGRIS T01/P01  
AU DERMAN, Nina  
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2007  
TI COMBINED METHOD OF INDUCED PHYTOEXTRACTION AND SOIL WASHING OF Pb AND Zn CONTAMINATED SOIL  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO IX, 43 p., 5 tab., 11 fig., 43 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Heavy metals make a significant contribution to soil contamination and degradation. There are no reliable reports on enough effective and economical methods for remediation of heavy metals contaminated soil. In soil columns experiment, we examined a novel technique for remediation of Pb ( $1750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Zn ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) contaminated soil, based on combined chelator induced phytoextraction and *in situ* soil washing of Pb and Zn. We used a biodegradable [S,S] ethylenediamin disuccinate ([S,S] – EDDS) as a chelator and hemp (*Cannabis sativa*) as the phytoextracting plant. The addition of EDDS ( $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  dry soil) yielded concentrations of  $1026 \pm 442 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb and  $330 \pm 114.7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn in the dry above-ground plant biomass, which were 1926-times higher of Pb and 7.5-times higher of Zn, compared to treatments with no chelator addition. The results of our study indicate that the phytoextraction potential of *Cannabis sativa* for Pb and Zn is not sufficient and phytoextraction is therefore not a feasible remediation option. Horizontal permeable barriers, composed of a 3 cm high layer of nutrient enriched sawdust, soya meal and vermiculite mixture, and a 3 cm layer of soil, vermiculite and apatite mixture, were positioned 20, 30 and 40 cm deep in the contaminated soil. In chelator treatments, barriers placed 30 cm deep reduced leaching of Pb and Zn by 435- and 4- times, respectively, compared to columns with no barrier, where 3 % and 4.3 % of total initial Pb and Zn, respectively, was leached during 6-weeks water irrigation after chelator addition. Barriers were effective in preventing leaching of Pb but did not efficiently prevent leaching of Zn.

## KAZALO VSEBINE

Ključna informacijska informatika	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 POVOD IN NAMEN IZDELAVE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 TEORETSKE OSNOVE</b>	3
2.1 TLA	3
<b>2.1.1 Onesnaževanje tal</b>	3
2.2 TEŽKE KOVINE V TLEH	4
<b>2.2.1 Vpliv težkih kovin na okolje</b>	5
<b>2.2.2 Svinec in cink</b>	6
2.3 ČIŠČENJE ONESNAŽENIH TAL	9
<b>2.3.1 Fitoremediacija</b>	10
<b>2.3.2 Fitoekstrakcija težkih kovin</b>	11
<b>2.3.3 Pranje tal</b>	16
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	18
3.1 MATERIAL	18
<b>3.1.1 Tla</b>	18
<b>3.1.2 Testna fitoekstrakcijska rastlina</b>	19
<b>3.1.3 Ligand</b>	20
<b>3.1.4 Talne kolone</b>	20
<b>3.1.5 Horizontalna prepustna reaktivna pregrada</b>	21
3.2 METODE	21
<b>3.2.1 Eksperimentalni del</b>	21
3.2.1.1 Zasnova in postavitev poskusa	21
3.2.1.2 Setev testne rastline	23
3.2.1.3 Režim zalivanja	23
3.2.1.4 Odvzem vzorcev odcednih vod	24
3.2.1.5 Priprava vzorcev rastlinskih tkiv	24
3.2.1.6 Odvzem vzorcev tal	24
3.2.1.7 Mikrobnna aktivnost v HPRP	25

<b>3.2.2</b>	<b>Analitske metode</b>	25
3.2.2.1	Določanje vsebnosti Pb in Zn v tleh	25
3.2.2.2	Določanje vsebnosti Pb in Zn v odcednih vodah	25
3.2.2.3	Določanje vsebnosti Pb in Zn v nadzemnih delih rastline	25
3.2.2.4	Določanje fitoekstrakcijskega potenciala in biokoncentracijskega faktorja	26
<b>3.2.3</b>	<b>Statistična analiza</b>	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	27
4.1	VSEBNOST Pb IN Zn V KONOPLJI	27
4.2	DELOVANJE HPRP	28
<b>4.2.1</b>	<b>Mikrobnna aktivnost v HPRP</b>	28
<b>4.2.2</b>	<b>Dinamika izpiranja Pb in Zn v odcednih vodah</b>	30
4.3	VSEBNOST Pb IN Zn V TLEH	31
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	34
5.1	RAZPRAVA	34
<b>5.1.1</b>	<b>Učinkovitost [S,S] - EDDS za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn in vpliv na mobilnost</b>	34
<b>5.1.2</b>	<b>Učinkovitost konoplje kot fitoekstrakcijske rastline</b>	34
<b>5.1.3</b>	<b>Učinkovitost HPRP za preprečevanje izpiranja Pb in Zn</b>	35
5.2	SKLEP	36
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	37
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	
	<b>ZAHVALA</b>	39

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	EPA lestvica prvih 12 nevarnih snovi.	8
Preglednica 2:	Mejne, opozorilne in kritične imisijске vrednosti za nekatere težke kovine v tleh (Uredba...,1996).	9
Preglednica 3:	Osnovne pedološke lastnosti izbranih tal ter vsebnost težkih kovin.	18
Preglednica 4:	Količine dodane 30,6 % raztopine [S,S] – EDDS in vode glede na višino vrhnje plasti tal v kolonah.	20
Preglednica 5:	Koncentracija Pb in Zn po posameznih plasteh talne kolone s HPPR postavljeno 40 cm globoko po koncu 6 tedenskega izpiranja. Vrednosti so podane kot povprečna koncentracija $\pm$ s.d. Začetna koncentracija Pb je bila 1750 $\text{mg kg}^{-1}$ , Zn pa 1300 $\text{mg kg}^{-1}$ .	33

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz inducirane fitoekstrakcije in z njo povezani procesi (po Cunningham in sod., 1995).	12
Slika 2:	Strukturne formule različnih izomer EDDS (Jaworska in sod., 1999).	16
Slika 3:	Konoplja ( <i>Cannabis sativa</i> ); levo (Köhler..., 2007), desno (Čeh Brežnik, 2007).	19
Slika 4:	Eksperimentalna zasnova poskusa (HPRP 20 cm, 30 cm, 40 cm pod površino tal ter kontrola v 4 ponovitvah).	22
Slika 5:	Shematski prikaz sestave talne kolone (Leštan in sod., 2001).	23
Slika 6:	Vsebnost Pb in Zn v zelenih delih konoplje ( <i>Cannabis Sativa</i> ), ki so rasle v 20 cm, 30 cm in 40 cm kolonah po dodatku 10 mmol kg <sup>-1</sup> [S,S] – EDDS ter v kontrolnih kolonah brez dodatka liganda. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev ± standardna deviacija.	27
Slika 7:	Temperaturna razlika med substratno plastjo v koloni s HPRP na globini 30 cm ter tlemi v kontrolni koloni brez HPRP.	28
Slika 8:	PbS v talnih kolonah, v plasti tal tik nad HPRP. Fotografija je desetkrat povečana.	29
Slika 9, 10:	Koncentracije Pb in Zn v odcednih vodah iz kolon s HPRP 20, 30 in 40 cm globoko ter iz kontrolnih kolon brez HPRP po dodatku 10 mmol EDDS kg <sup>-1</sup> suhih tal. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev ± standardna deviacija.	30
Slika 11:	Dinamika izpiranja Pb in Zn skozi profil talnih kolon s HPRP postavljeno 40 cm globoko pred in po dodatku liganda. Vrednosti so podane kot povprečne koncentracije 4 ponovitev ± standardna deviacija po 42 dnevnem izpiranju.	32

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

[S,S]-EDDS	[S,S] izomera etilendiamindijantarne kisline
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
EPA	Environmental Protection Agency
Pb	svinec
Zn	cink
PbS	svinčev sulfid
Ni	nikelj
Cr	krom
Hg	živo srebro
Cd	kadmij
TK	težke kovine
HPRP	horizontalna prepustna reaktivna pregrada
PI	peščena ilovica
s.s.	suha snov
s.d.	standardna deviacija
T	temperatura
BCF	biokoncentracijski faktor
PP	fitoekstracijski potencial

## 1 UVOD

Tla so pomemben del kopenskih ekosistemov, ki predstavljajo življenski prostor in vir hrane za rastline, živali in ljudi. Zaradi človeških dejavnosti v zadnjih desetletjih, kot so industrija, intenzivno kmetijstvo in promet, prihaja do vse večjega, velikokrat tudi nepovratnega onesnaženja tal z različnimi škodljivimi snovmi.

Predvsem onesnaženost tal s težkimi kovinami predstavlja velik problem, saj so fotokemično in biološko nerazgradljive, obstojnost pa povečuje še trdna vezava na talne delce v tleh. Njihova koncentracija se zato v tleh stalno povečuje, preko rastlin pa tudi vstopajo v prehranjevalno verigo. V človeško telo lahko vstopajo tudi z zaužitjem prsti, z vdihavanjem prašnih delcev ter skozi poškodovano kožo. Pri prevelikih koncentracijah so nevarne za zdravje ljudi in živali, toksičen učinek imajo na rastline in mikroorganizme, kar pa neposredno vpliva na zmanjšanje samoočiščevalne sposobnosti in kakovosti tal. Še posebej je nevarna dolgotrajna izpostavljenost manjšim koncentracijam težkih kovin, ki se tudi v telesu kopijo, kar privede do zastrupitve.

Onesnaženje s težkimi kovinami je v EU in svetu zelo razširjeno. Velika območja sicer rodovitnih tal, so zaradi prekomerne vsebnosti težkih kovin neuporabna za kmetijsko rabo. Tudi v Sloveniji imamo nekaj žarišč onesnaženja s težkimi kovinami predvsem zaradi izkoriščanja in taljenja rud. V Mežiški dolini so tla prekomerno onesnažena s svincem, cinkom in kadmijem, v Idriji z živim srebrom, okolica Jesenic pa s svincem, nikljem in kromom. Problematično stanje je tudi ob večjih prometnicah.

Geneza tal je dolgotrajen proces (tla so zelo počasi obnovljiv naravni vir), zato je pomembno in potrebno iskati učinkovite, okolju prijazne in cenovno dostopne metode remediacije tal. Za tla onesnažena s težkimi kovinami sicer še niso razvite metode remediacije, ki bi ustrezale navedenim kriterijem, poznanih pa je več metod kot so fitoremediacija, stabilizacija-solidifikacija, pranje tal itd. V zadnjem času se kot način remediacije tal onesnaženih s težkimi kovinami, vse bolj uveljavlja fitoekstrakcija, *in situ* metoda, pri kateri rastline bioakumulirajo težke kovine. Hiperakumulatorske rastline imajo same po sebi sposobnost sprejemati večje koločine težkih kovin v svoja nadzemna tkiva, pri inducirani fitoekstrakciji pa z dodajanjem ligandov povečamo mobilnost in dostopnost težkih kovin tudi za običajne kmetijske rastline z boljšimi agronomskimi lastnostmi. Da bi povečali učinkovitost remediacije onesnaženih tal, smo v diplomski nalogi metodo inducirane fitoekstrakcije uporabili v kombinaciji z metodo pranja tal. Za preprečitev izpiranja težkih kovin pri pranju tal, smo pod onesnažena tla namestili horizontalne prepustne reaktivne pregrade (HPRP).

## 1.1 POVOD IN NAMEN IZDELAVE NALOGE

Na Katedri za pedologijo in varstvo okolja, Biotehniške fakultete v Ljubljani, se že vrsto let ukvarjajo z iskanjem čim bolj učinkovite in ekonomične metode remediacije tal onesnaženih s težkimi kovinami. Del teh raziskav predstavlja tudi diplomska naloga, ki preizkuša izvedljivost kombinacije inducirane fitoekstrakcije z uporabo biorazgradljivega liganda in *in situ* izpiranja Pb in Zn v nameščeno HPPR.

Namen naloge je bil ovrednotiti učinkovitost biorazgradljivega in okolju prijaznejšega liganda [S,S] - izomere etilendiamin disukcinata ([S,S] - EDDS) za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn v konopljo (*Cannabis sativa*) ter preizkušati učinkovitost HPPR, nameščenimi v različnih globinah pod onesnaženimi tlemi, za preprečevanje izpiranja preostalega z ligandom sproščenega Pb in Zn.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakovali smo, da ima konoplja (*Cannabis sativa*), kot rastlina z veliko biomaso, velik fitoekstrakcijski potencial za Pb in Zn.
- Z uporabo [S,S] - EDDS smo pričakovali znatno povečanje vsebnosti težkih kovin v nadzemnih delih testne rastline.
- Z uporabo HPPR, smo pričakovali znatno zmanjšanje izpiranja Pb in Zn. Tako bi lahko preprečili kontaminacijo nižje ležečih plasti tal in podtalnice s težkimi kovinami.

## 2 TEORETSKE OSNOVE

### 2.1 TLA

» *V naravi ni ničesar pomembnejšega ali zaslubi več pozornosti kot tla. Tla so tista, ki omogočajo, da svet predstavlja prijetno okolje človeku. Tla so tista, ki hranijo in preskrbujejo celotno naravo; vse je odvisno od tal, ki predstavljajo prvobitni temelj našega bivanja.«*

*Friedrich Albert Fallou*

Tla so pomemben sestavni del kopenskih ekosistemov, ki se nahajajo v zgornji plasti zemeljske skorje, na stičišču litosfere, atmosfere in hidrosfere. So dinamična mešanica mineralnih delcev različnega izvora in velikosti, žive in nežive organske snovi ter vode in zraka, ki zapolnjujeta sistem mikro, makro in mezo por. So nehomogena snov, ki se pod vplivom edafskih organizmov (talnih živali, rastlin in mikroorganizmov) konstantno spreminja in obnavlja.

Tla nastajajo s fizikalnim in kemičnim preperevanjem matične kamenine in organske snovi, ob prisotnosti živilih organizmov (Vidic, 1995). Na nastanek tal vplivajo klima, topografija prostora, vegetacija, sestava matične podlage ter prisotnost talnih organizmov. Geneza tal je dolg proces. Nastajanje 30 cm tal traja od 1000 pa do 10000 let (Leštan, 2002a).

Tla so osnova za življenje v kopenskih ekosistemih, vplivajo na zalogo energije, kroženje vode, kroženje hranil in na produktivnost ekosistema v celoti. Ljudem zagotavljajo prostor za naseljevanje, za proizvodnjo hrane, krme ter tekstilnih vlaken, prostor za industrijske obrate, rekreacijske površine, prostor za odlaganje odpadkov, prostor za prometno infrastrukturo.

#### 2.1.1 Onesnaževanje tal

Tla odlikuje velika samoočiščevalna sposobnost, mnogo večja kot jo imata voda in zrak, kar ima iz vidika varstva okolja izreden pomen (Stritar, 1973). Zaradi velike puferske sposobnosti tal, opazimo škodo zaradi onesnaženja, ko je ta že nepopravljiva. V talnem profilu pa se akumulira tudi večina potencialno škodljivih snovi iz vode in zraka, ki

prehajajo v tla, zato tla ostanejo onesnažena še dolgo po tem, ko onesnaženje preneha, medtem, ko se koncentracija onesnažil v zraku in vodi zaradi mešanja in razredčevanja zmanjšuje. Tla imajo sicer veliko samoočiščevalno sposobnost, s katero se upirajo kemizaciji, vendar so samoočiščevalni procesi počasni.

Tla so onesnažena takrat, ko vsebujejo toliko onesnažil, da je njihova samoočiščevalna sposobnost zmanjšana (Alloway, 1990). Zaradi naraščanja prebivalstva in vse večje urbanizacije, razvoja industrije, kmetijske proizvodnje ter ekološke neozaveščenosti prihaja do vse večjega vnosa različnih onesnažil v tla. Po izvoru strupene snovi razdelimo na organske in anorganske.

Med organska onesnažila štejemo (Leštan, 2000):

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

Med anorganske onesnažila štejemo:

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

## 2.2 TEŽKE KOVINE V TLEH

Težke kovine so kovine s specifično gostoto večjo od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ . Predstavljajo manj kot 1% zemeljske skorje, zato jih pogosto imenujemo tudi elementi v sledovih (Leštan, 2002a). Primarni vir kovin v tleh je matična podlaga. V splošnem je njihova vsebnost večja v kamninah vulkanskega kot sedimentnega izvora. Veliko kovin v tleh pa je antropogenega izvora. Vsebnost težkih kovin v tleh se povečuje kot posledica različnih človeških aktivnosti (Ross, 1994):

### 1. Rudarjenje in taljenje rude:

- jalovina in žlindra (preperevanje in vetrna erozija),
- rečni sedimenti in poplave,

- izgube pri transportu rud in njenih separatov, taljenje rude (vetrno prenašanje prahu in aerosolov),
- železarne in jeklarne,
- brušenje kovin.

2. Industrija:

- plastike, tekstilna, mikroelektronika, zaščita lesa, rafinerije.

3. Atmosferski depozit:

- urbana in industrijska središča skupaj s sežigalnicami,
- metalurška industrija,
- avtomobilski izpusti,
- izgorevanje fosilnih goriv in termoelektrarne.

4. Kmetijstvo:

- mineralna in organska gnojila,
- apno,
- fitofarmacevtska sredstva,
- namakalne vode.

5. Odlaganje odpadkov:

- blata čistilnih naprav,
- vode, ki odtekajo iz deponij,
- odlagališča kovin,
- požari in pepel.

### 2.2.1 Vpliv težkih kovin na okolje

Elementi v sledovih so kot mikrohranila organizmom nujno potrebni (esencialni). Matična podlaga določa ali so v tleh prisotni esencialni elementi: Fe, Al, Mn, Ni, Zn, Cu, Co in Cr, skupaj z Mo, Sn, Se, I in F. Vsak od teh elementov ima specifično vlogo in ga v celoti ali delno drug element ne more nadomestiti. Vsi elementi pa so toksični, če je njihova koncentracija previsoka (Oliver, 1997).

Toksičnost za rastline se na nivoju celice lahko odraža v (Ochiai, 1987, cit. po Ross, 1994):

- denaturaciji in inaktivaciji encimov,
- blokiraju funkcionalnih skupin biološko pomembnih molekul, kot so encimi, polinukleotidi,
- premeščanju in/ali nadomeščanju esencialnih kovinskih ionov v biomolekulah in funkcionalnih celičnih enotah,
- poškodbah biomembran,
- motnjah elektronskega transporta pri procesih dihanja in fotosinteze.

To vodi do zmanjšanega sprejema mineralnih hranil in zmanjšane rasti ter pogosto tudi do nespecifičnih znamenj, kot so razbarvanja (kloroze).

Težke kovine vstopajo preko rastlin v prehranjevalno verigo, kjer se njihova koncentracija povečuje in lahko postanejo nevarne za zdravje ljudi in živali. Posebno nevarnost predstavlja ponavljanje se vnos majhnih koncentracij, ki naj bi bile organizmu neškodljive. Težke kovine se namreč v telesih organizmov kopijo, zato lahko njihov kontinuiran vnos privede do zastrupitev. V telo vstopajo preko hrane (npr. preko rastlin gojenih na tleh onesnaženih s težkimi kovinami), z zaužitjem onesnažene prsti (geofagija), z vdihavanjem prašnih delcev iz onesnaženih tal ali preko kože (rane), s pitjem onesnažene vode. Skoraj neovirano prehajajo skozi placento.

Toksičnost težkih kovin se pri ljudeh kaže v (Oliver, 1997):

- akutni ali kronični zastrupitvi,
- mutacijah somatskih celic oz. kancerogenost,
- mutagenosti (mutacije) in teratogenosti ali poškodbah zarodka,
- metabolnih, krvnih in ledvičnih boleznih (anemija, hipertenzija).

Vpliv težkih kovin se kaže tudi pri številnih procesih v tleh (Leštan, 2002a):

- v zmanjšanju mikrobne biomase in sprememb strukture mikrobnih populacij (zmanjšana biodiverziteta),
- v upočasnjeni razgradnji organske snovi v tleh, predvsem težje razgradljivih komponent rastlinske biomase kot je lignin in drugih večjih molekul zaradi sprememb v mikrobnem metabolizmu ter zaradi tvorjenja težje razgradljivih kovinsko – organskih kompleksov.

Številne raziskave kažejo na to, da so talni organizmi, ki imajo vitalno vlogo pri ohranjanju rodovitnosti tal, občutljivi na stres, ki ga povzročajo visoke koncentracije težkih kovin v tleh (Dahlin in sod., 1997).

### 2.2.2 Svinec in cink

Pb in Zn sta težki kovini, ki sta v tleh naravno prisotni v manjših količinah, v življenju ljudi, živali in rastlin imata različni vlogi, obe pa imata v večjih koncentracijah toksičen učinek.

Tla v okolici topilnic in metalurške industrije so pogosto onesnažena z atmosferskimi depoziti Pb in Zn. Kmetijska zemljišča so onesnažena s Pb in Zn zaradi gnojenja tal s komposti in aktivnimi blati čistilnih naprav. Oba elementa sta prisotna tudi v nekaterih

fitofarmacevtskih sredstvih. Ob cestah so tla onesnažena s Pb, ki je bil včasih prisoten v bencinih. Pb je prisoten tudi v nekaterih barvah za barvanje lesenih fasad, zato je v ZDA in Kanadi poseben problem onesnaženja tal s Pb okoli stanovanjskih hiš.

Zn je za organizme esencialen element ter eden najpomembnejših elementov v sledovih. Vezan na številne encime sodeluje pri različnih metabolnih procesih (pri sintezi in razgradnji ogljikovih hidratov, lipidov, proteinov in nukleinskih kislin), pri ekspresiji genov. Poljščinam ga pogosto primanjkuje, saj mu dostopnost zmanjšujejo gline, organska snov in seskvioksiidi, ki Zn vežejo v trdno fazo tal, pa tudi njegovi antagonisti Ca, Fe, Cu in Ni. Dosegljivost Zn za rastline je večja v kislih tleh. V tleh se najpogosteje pojavlja v obliki  $Zn^{2+}$  ionov, ki je tudi rastlinam najbolj dostopna, v tleh pa je prisoten še v obliki drugih ionskih zvrsti:  $ZnCl^+$ ,  $ZnOH^+$ ,  $ZnHCO_3^+$ ,  $Zn(OH)_2$ ,  $ZnO$ ,  $ZnCO_3$ ,  $ZnO_2^{2-}$ .

Pri človeku lahko pomanjkanje Zn povzroči anemijo, zaustavitev rasti, neodpornost na infekcije, anoreksijo. Priporočena dnevna količina zaužitega Zn za odraslo osebo znaša 45 mg (Leštan, 2002a). Večje količine Zn, predvsem kot posledica geofagije ali vdihavanja delcev onesnaženih tal pa lahko povzročijo motnje v reprodukciji in počasnejši razvoj zarodka (Leštan, 2002a).

Pb, za razliko od Zn, ni esencialen element za žive organizme. Zastrupljane s Pb je eden glavnih zdravstvenih problemov v mnogih delih sveta, posebno nevarna pa je dolgotrajna izpostavljenost manjšim koncentracijam Pb, ki sicer ne veljajo za strupene. Pb je namreč eden izmed najbolj razširjenih in najpomembnejših kovinskih onesnaževalcev.

Zaradi pretežne vezave Pb na trdno fazo tal (organsko snov, okside in glinene delce ter karbonate), ostaja Pb imobiliziran v glavnem v vrhnjih slojih tal. Pb se lahko v tleh nahaja v čistih mineralnih oblikah, kot so svinčev sulfid ( $PbS$ ), svinčev sulfat ( $PbSO_4$ ) ali svinčev karbonat ( $PbCO_3$ ) (Mulligan in sod., 2001). V talni raztopini je slabo topen in zatorej rastlinam skoraj nedostopen (Ruby in sod., 1999). Lahko je v ionski obliki  $Pb^{2+}$ , pogosteje pa v obliki ionskih zvrsti:  $Pb(OH)^+$ ,  $PbCl^+$ ,  $PbHCO_3^+$  ali  $Pb(CO_3)$ . V kislih tleh je dosegljivost Pb za rastline nekoliko večja, vnos v rastline pa je olajšan tudi zaradi biološkega antagonizma, saj lahko v rastlinskih tkivih zamenja Ca in druge elemente. V telo tako prihaja predvsem z geofagijo (tla zanesemo v usta z umazanimi rokami, neprimerno oprano hrano...) in vdihavanjem onesnaženih talnih delcev, preko ran, nekaj pa tudi s hrano. Več kot je Pb v tleh, bolj je koncentriran v rastlinah in posledično ga je več v hrani (Oliver, 1997).

Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (WHO) je nevarno, če vnesemo v telo več kot 500  $\mu\text{g}/\text{dan}$  Pb. Pri otrocih pomeni zastrupitev že koncentracija 250 - 550  $\mu\text{g}$  Pb na liter krvi. Otroci so posebej ogrožena skupina, saj so onesnaženju bolj izpostavljeni, njihovo

telo pa zadrži kar 40 - 50 % sprejetega Pb, medtem ko pri odraslih ljudeh telo zadrži 10 – 50 % zaužitega Pb. V listi nevarnih snovi, ki jo objavlja EPA (Environmental Protection Agency, ZDA), je svinec na prvem mestu (preglednica 1) (Leštan, 2002a). Lista vključuje 275 snovi, ki se nahajajo v okolju in so po oceni tveganja razvrščene glede na potencialno nevarnost za človeka.

Preglednica 1: EPA lestvica prvih 12 nevarnih snovi.

1. svinec	5. benzen	9. kloroform
2. arzen	6. poliklorirani bifenili	10. benzo (b) fluoranten
3. živo srebro	7. kadmij	11. DDT
4. vinil-klorid	8. benzo (a) piren	12. araklor 1260

Toksičnost Pb se kaže v metabolnih, krvnih in ledvičnih boleznih, ovira vezavo Fe na protoporfirin, povzroča anemijo, pri odraslih tudi hipertenzijo. Povezan je z motnjami pri reprodukciji, skoraj neovirano prehaja skozi placento. Pri otrocih prehaja tudi v možgane, zaradi nepopolnoma razvite bariere med krvjo in možgani ter povzroča hiperaktivnost, izpad motoričnih funkcij in zaostalost.

Številne države so zaradi toksičnosti težkih kovin omejile oz. prepovedale pridelavo hrane na zemljiščih onesnaženimi z visokimi koncentracijami težkih kovin, določile pa so tudi meje dovoljenega letnega vnosa težkih kovin s komposti in blati čistilnih naprav. Vrednosti za posamezna onesnažila v tleh, zraku in vodah, ki predstavljajo nevarnost za okolje in zdravje človeka in dovoljene meje, določa Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih vrednostih in velja tudi za celotno območje Republike Slovenije (Uredba..., 1996). Vrednosti za težke kovine so navedene v preglednici 2.

Onesnaženje kmetijskih zemljišč je v EU in ostalih evropskih državah zelo razširjeno, kar je velik problem. Onesnažene površine ocenjujejo na nekaj miljonov hektarjev (Flathman in Lanza, 1998). V Sloveniji so tla razmeroma neonesnažena, imamo pa nekaj žarišč s težkimi kovinami onesnaženih tal (Leštan, 2002a):

- s Cd in Zn onesnaženo območje Celja,
- s Pb, Ni in Cr onesnaženo območje Jesenic,
- s Pb, Zn in Cd obremenjena Mežiška dolina,
- z Hg onesnažena Idrija,
- s Pb onesnažena območja ob prometnicah.

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

	Mejna vrednost (mg kg <sup>-1</sup> )	Opozorilna vrednost (mg kg <sup>-1</sup> )	Kritična vrednost (mg kg <sup>-1</sup> )
Cd	1	2	12
Cu	60	100	300
Ni	50	70	210
Pb	85	100	530
Zn	200	300	720
Cr	100	150	380
Cr <sup>6+</sup>			25
Hg	0,8	2	10
Co	20	50	240
Mo	10	40	200
As	20	30	55

## 2.3 ČIŠČENJE ONESNAŽENIH TAL

Onesnaževanje tal je eden najbolj zapletenih in težko rešljivih okoljskih problemov. Težke kovine, poleg obstojnih organskih onesnažil, predstavljajo največjo nevarnost, saj so v okolju in tleh odporne na fotolitsko, biološko in kemijsko ragradnjo. V tleh se postopoma nalagajo ter poslabšajo kemijske in biotske lastnosti tal. Močno onesnažena tla so mrtva, izgubijo samoočiščevalno sposobnost in postanejo nevarna za okolje, zato jih je potrebno očistiti.

S čiščenjem oz. remediacijo tal (angleško: *remedy* – zdravilo) se izboljša kakovost tal, omogočena pa je tudi varnejša raba onesnaženih tal. Zaradi nerazgradljivosti težkih kovin, metode remediacije temeljijo predvsem na spreminjanju njihove mobilnosti in transporta v tleh.

Najpreprostejša načina remediacije sta nadzorovanje in preprečevanje onesnaženja ter izkop in odvoz onesnaženih tal. Slednje je primerno za manje površine z močno onesnaženimi tlemi in površine, kjer onesnažila v tleh predstavljajo veliko tveganje (npr.: okolica vrtcev in šol). Onesnažena tla so posebni odpadek, zato jih je potrebno deponirati na posebej urejenih odlagališčih (Grčman in sod., 2001).

Pri remediaciji onesnaženih tal uporabljam fizikalno – kemijske in biološke metode (Leštan, 2002a):

- Fizikalno - kemijske metode: ekstrakcija hlapov onesnažil, izpiranje tal, solidifikacija in stabilizacija onesnažil, redukcija in oksidacija onesnažil.
- Fizikalno - kemijske metode, ki temeljijo na topotni obdelavi onesnažil: termično pospešena ekstrakcija, vitrifikacija, termična desorpcija, sežig in piroliza.
- Biološke metode (bioremediacija): fitoremediacija, biostimulacija, bioaugmentacija, obdelovanje tal in nadzorovana bioremediacija, bioremediacija s kompostiranjem.

Pri fizikalno – kemijskih metodah s topotno obdelavo, spremembami tlaka in dodatki različnih kemijskih snovi, pri bioloških metodah pa z uporabo rastlin, mikroorganizmov in encimov, povzročamo kemijske transformacije onesnažil, spreminjam njihovo topnost in mobilnost v tleh in s tem vplivamo na njihovo dosegljivost za žive organizme.

Metode remediacije lahko potekajo *ex situ* (potreben predhoden izkop tal) ali *in situ* (na mestu onesnaženja). Izbira najprimernejše metode remediacije je odvisna od lastnosti tal (pH, tekstura, poroznost, vsebnost organske snovi...), vrste onesnažila, njegove koncentracije in razširjenosti ter zahtevane stopnje čistosti glede na vrsto rabe tal. Zahtevana stopnja remediacije tal je navadno predpisana z zakonodajo in se razlikuje glede na rabo tal (Leštan, 2002b). Za kmetijska zemljišča so merila strožja kot za tla v industrijskih območjih.

### 2.3.1 Fitoremediacija

Fitoremediacija je definirana kot uporaba zelenih rastlin za odstranjevanje onesnažil iz okolja (Cunningham in sod., 1995). Na podlagi znanstvenih odkritij in interdisciplinarnih raziskav se je razvila v obetajočo, ekonomsko sprejemljivo in okolju prijazno tehnologijo. Fitoremediacija se lahko uporablja za *in situ* odstranjevanje organskih in anorganskih onesnažil iz trdih in tekočih substratov.

Trenutno obstaja več različnih tehnologij fitoremediacije, ki so razdeljene na sledeča področja (Salt in sod., 1998):

- Fitoekstrakcija: uporaba rastlin, ki akumulirajo težke kovine iz onesnaženih tal v rastlinski biomasi (nadzemne dele rastlin, gomolje...).
- Fitodegradacija: uporaba rastlin in z njimi povezanih talnih mikroorganizmov za pospešeno razgrajevanje organskih onesnažil v rizosferi.

- **Rizofiltracija:** uporaba rastlin za akumulacijo onesnažil, predvsem težkih kovin, za čiščenje voda in odplak.
- **Fitostabilizacija:** uporaba na onesnažila odpornih rastlin za mehansko stabilizacijo onesnaženih tal proti eroziji (Leštan, 2002a).
- **Fitovolatilizacija:** uporaba rastlin za biološko transformacijo (metilacija, etilacija) onesnažil v hlapne snovi, v metabolizmu rastline (v procesu sodelujejo visoko specializirani encimi).

### 2.3.2 Fitoekstrakcija težkih kovin

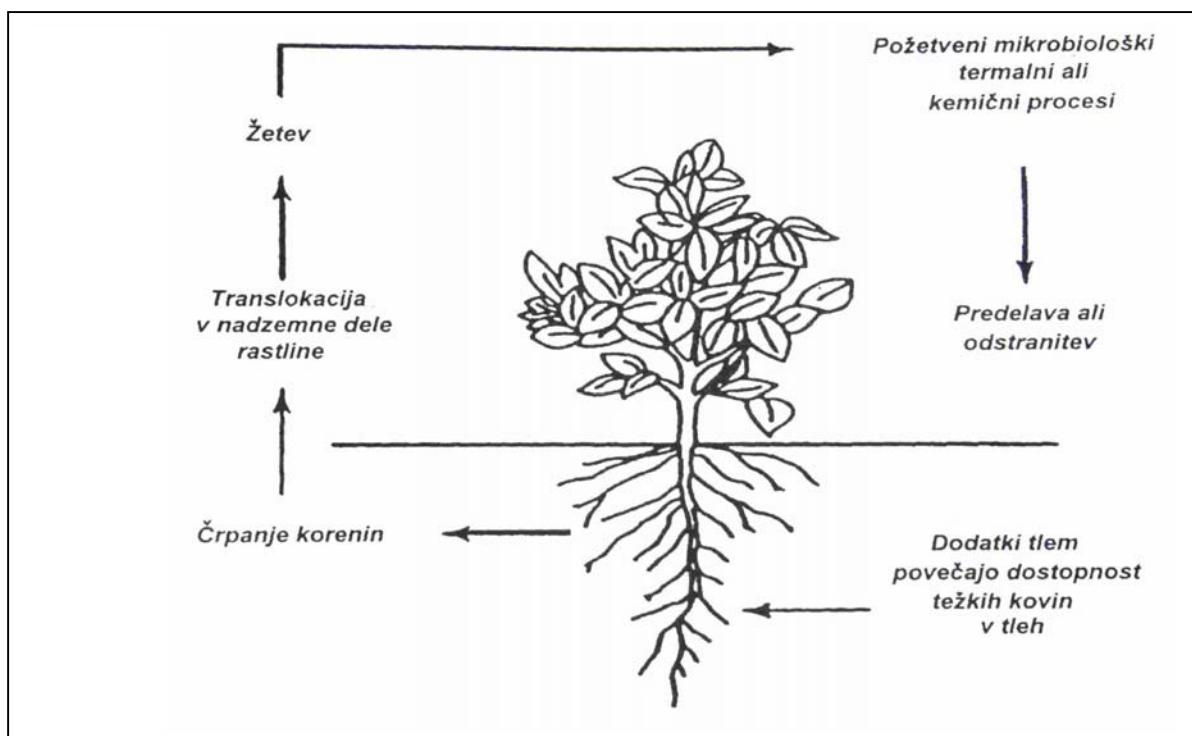
Fitoekstrakcija je postopek čiščenja tal, ki izkorišča akumulativne lastnosti rastlin, da iz tal sprejmejo in v svojo nadzemno biomaso vgradijo določene količine škodljivih snovi, največkrat težkih kovin. Metoda je učinkovita za *in situ* čiščenje večjih površin nizko do srednje onesnaženih tal, pri čemer se kakovost in rodovitnost tal ne poslabša, kot se pri večini fizikalno – kemičkih metod. Zaradi tehnološke nezahtevnosti postopka pri fitoekstrakciji ne nastajajo visoki stroški (Salt in sod., 1995).

Rastline preko koreninskega sistema črpajo kovinske ione iz talne raztopine. Mehanizmi akumulacije obsegajo ekstracelularno in intracelularno vezavo kovin na naravne ligande, translokacijo kovinsko-ligandnih kompleksov preko vaskularnega sistema in kopiranje kovin v različnih delih rastline (Raskin in sod., 1994). Po zaključenem življenskem ciklu rastlin, lahko pobrane dele rastlin, v katerih so nakopičene težke kovine, kot kontaminiran material prepeljemo na deponije ali pa jih sežgemo in dobimo t.i. biorudo. Tako se da nekatere kovine,, npr. Ni, Ti in Co s postopkom fitoekstrakcije iz tal tudi pridobivati (Anderson in sod., 1999; Brooks in sod., 1998).

Koncentracija kovinskih ionov, ki jih bo rastlina sprejela iz tal in akumulirala v svojih tkivih, je odvisna od:

- vrste rastline in njene genetske predispozicije za fitoekstrakcijo,
- dostopnosti kovin v tleh, kovine se morajo nahajati v rizosferi,
- ostalih talnih in klimatskih dejavnikov.

Željene lastnosti fitoekstrakcijskih rastlin so hitra rast, velika nadzemna rastlinska biomasa, sposobnost akumulacije velikih količin težkih kovin v nadzemnih delih, toleranca na težke kovine (Salt in sod., 1998) in globok koreninski sistem (Leštan in sod., 2001). Rastline naj bi imele poznane agronomiske lastnosti in uporabne dele biomase ali plodove, ki bi po končani fitoekstrakciji pokrili del nastalih stroškov.



Slika 1: Shematski prikaz inducirane fitoekstrakcije in z njo povezani procesi (po Cunningham in sod., 1995)

Glede na sprejem in premeščanje težkih kovin po rastlini, lahko rastline razdelimo na več skupin (Ross, 1994):

1. na težke kovine odporne rastline z omejenim sprejemom težkih kovin v korenine in omejenim prenosom iz korenin v nadzemne dele,
2. indikatorske rastline, pri katerih koncentracija težkih kovin v rastlinskem tkivu odraža koncentracijo težkih kovin v tleh,
3. akumulatorske rastline, ki akumulirajo težke kovine v svojih tkivih.

Metode fitoekstrakcije so se začele razvijati vzporedno z odkrivanjem hiperakumulatorskih rastlin (Leštan in sod., 2001). Hiperakumulatorske rastline so pionirske rastline, ki rastejo na onesnaženih tleh s težkimi kovinami v okolini metalurške industrije. Odlikujejo jih posebne genetske in fiziološke zmogljivosti, saj so sposobne sprejemati, translocirati in kopiti v svoji biomasi velike količine kovin. Hiperakumulacija je pomembna ekofiziološka adaptacija na stres zaradi težkih kovin ter ena od oblik odpornosti na težke kovine (Leštan, 2002b). Hiperakumulatorske rastline lahko vsebujejo več kot 0,1% (1000 mg kg<sup>-1</sup>) Ni, Cu, Co in Cr oz. več kot 1% (10000 mg kg<sup>-1</sup>) Zn (Raskin in sod., 1994, cit. po Grčman, 2001), ne glede na koncentracijo kovine v tleh. V naravi pa do sedaj še niso odkrili hiperakumulatorske rastline z visokim fitoekstraktionskim potencialom za Pb. Možna razloga je, da je Pb zaradi pretežne vezave na trdno fazo tal, organsko snov, okside in

glinene delce, ter karbonate, v talni raztopini slabo topen in zatorej rastlinam skoraj nedostopen (Ruby in sod., 1999).

Slaba lastnost velike večine hiperakumulatorskih rastlin pa je majhna biomasa in počasna rast (Cunningham in sod., 1995) in s tem slabša učinkovitost fitoekstrakcije zaradi manjše količine ekstrahiranih težkih kovin. Hiperakumulatorske rastline navadno tudi akumulirajo le specifične kovine; kovine ki jih navadno akumulirajo; kot so Ni, Zn in Cu pa ne spadajo med najpomembnejše onesnaževalce okolja (Leštan, 2006). Zato se v zadnjem času išče nove, tudi gensko spremenjene vrste rastlin z želenimi lastnostmi za hiperakumulacijo.

Poznamo dve osnovni strategiji fitoekstrakcije (Salt in sod., 1998):

- kontinuirana fitoekstrakcija s hiperakumulatorskimi rastlinami,
- inducirana fitoekstrakcija s pomočjo kelatnih ligandov.

Fitoekstrakcijo s hiperakumulatorskimi rastlinami imenujemo tudi kontinuirana fitoekstrakcija (Leštan, 2002a). Kontinuirana fitoekstrakcija izrablja tiste specializirane fiziološke procese, ki dopuščajo rastlinam akumulacijo kovin preko celega rastnega cikla in ki so značilni za rastlinske hiperakumulatorje (Baker in Brooks, 1989). Dobre strani tega postopka so nizka cena, enostavnost postopka in majhno ekološko tveganje, slabe pa predvsem dolgotrajnost postopkov in slabša učinkovitost (Huang in sod., 1997).

Na splošno je v tleh le majhen del kovin v sledovih v rastlinam dostopni oblici (Kabala in Singh, 2001). Nekatere kovine, ki so že same po sebi biodostopne za rastline so Cd, Ni, Zn, As, Se, Cu, slabo dostopne pa so Pb, Cr, U, Hg. (Alkorta in sod., 2004). Težke kovine so v tleh vezane na različne komponente, na različne načine in od teh značilosti je odvisna njihova mobilnost in biološka dostopnost (Kabala in Singh, 2001). Talne frakcije v katerih se pojavljajo kovine v tleh so (Salt in sod., 1998):

- 1) prosti kovinski ioni in topni kovinski kompleksi v talni raztopini,
- 2) kovinski ioni, ki zavzemajo zamenljiva mesta drugih ionov na talnih koloidih,
- 3) kovine, vezane na organsko snov tal,
- 4) netopne soli in druge spojine, zlasti oksidi, karbonati in hidroksidi,
- 5) kovine izomorfično vezane v strukturi silikatnih mineralov.

Rezultat antropogenega onesnaževanja tal so kovine v talnih frakcijah od (1) do (5). Biodostopne so samo kovine v frakciji (1) in deloma kovine v frakciji (2).

Frakcionacija težkih kovin v biodostopno in biološko nedostopno frakcijo poteka pod vplivom kationske izmenjave, procesov adsorpcije in desorpcije na organsko – mineralne koloide, preperevanja mineralov, izpiranja, tvorjenja kompleksov, biološke mobilizacije in imobilizacije (Rieuwerts in sod., 1998). Potek reakcij določajo in omejujejo lastnosti tal

kot so tekstura tal, vsebnost organske snovi, vsebnost in tip glinenih mineralov, vsebnost Fe, Al ter Mn oksidov in prevladujoče fizikalno-kemijske razmere v tleh (pH, zasičenost z vodo, prezračenost, redoks potencial). Janssen in sod, 1997 poročajo, da je pH najpomembnejši parameter tal pomemben za izmenjevanje Pb, Zn in ostalih kovin med talno raztopino in trdno fazo tal. Vzrok za povezavo med adsorcijo težkih kovin na izmenljivih mestih talnih koloidov ter pH tal, je v tekmovanju za adsorpcijska mesta na talnih koloidih s  $H^+$  ioni v kislih tleh (Rieuwerts in sod., 1998). Z naraščajočo pH vrednostjo talne raztopine pada prisotnost težkih kovin v talni raztopini (Ross, 1994). S spremenjanjem pH tal, dodajanjem organske snovi ter drugih snovi kot so ligandi in organske kisline (ocetna, citronska in jabolčna kislina) lahko sprememimo delež biodostopnih težkih kovin.

Rastline tudi same izločajo skozi svoje korenine ligande, različne encime ter organske kisline kot so citronska, jabolčna in ocetna kislina, s katerimi povečujejo dostopnost mikrohranil in s tem tudi težkih kovin. Mobilnost kovin povečujejo tudi z izločanjem protonov, kar povečuje kislost rizosfere.

Inducirana fitoekstrakcija temelji na spoznanju, da lahko težke kovine v tleh mobiliziramo z dodajanjem nekaterih ligandov, kar povečuje dosegljivost tudi težje dostopnih težkih kovin za rastline in translokacijo kovinskih kelatov iz korenin v nadzemne dele rastlin. Uporaba ligandov tako omogoča izrabo ne-hiperakumulacijskih kmetijskih rastlin z dobrimi agronomskimi lastnostmi kot so hitra rast in velika biomasa.

Metoda je v nasprotju s kontinuirano fitoekstrakcijo hitra in učinkovita, ima pa tudi pomembno slabost. Mobilizacija težkih kovin z ligandi namreč povzroča izpiranje kovinskih kelatov v podtalnico in prehod v prehranjevalno verigo. Sporne so tudi nekatere vrste ligandov, npr.: etilendiamin tetraacetat (EDTA), katerih kovinski kelati so mikrobiološko zelo stabilni in se v naravi počasi razgrajujejo.

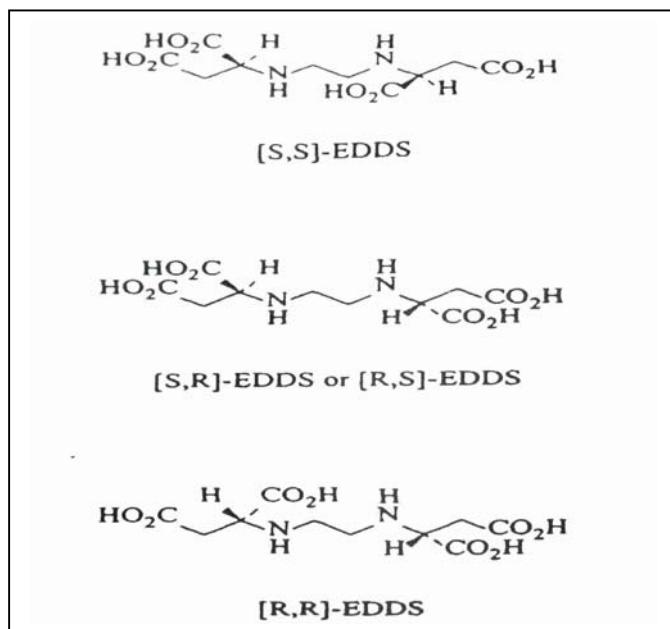
Ligandi so kemijske spojine, katerih molekule lahko tvorijo koordinativne kemijske vezi s posameznimi kovinskimi ioni, kar privede do nastanka koordinacijskih spojin (kompleksov ali kelatov). Koordinacijske spojine lahko definiramo kot spojine, pri katerih se na centralni kovinski ion vežejo predvsem negativno nabiti ioni, ki nastopajo kot ligandi. Kompleks je lahko elektro pozitiven, nevtralen ali negativen (Lazarini in Brenčič, 1989). Donor ali ligand mora imeti vsaj en par prostih elektronov, ki so na voljo za tvorbo kompleksne spojine (Skroog in sod., 1988). Tak ligand imenujemo enovezni ligand ali unidentat. Ligandom, ki prispevajo hkrati dva ali več elektronskih parov pravimo kelatni ligandi (Leštan, 2002a) ali multidentati. Število kovalentnih vezi, ki se tvorijo med centralnim ionom in ligandom, imenujemo koordinacijsko število. Ponavadi je to število 2, 4 ali 6, posebno pa so stabilni kelati s koordinacijskimi števili 4, 6 ali 8.

Število ligandov je veliko, prav tako so raznovrstni njihovi kelati s težkimi kovinami. Pomembna skupina ligandov so aminopolikarboksilne kisline, ki se široko uporablajo v mnogih industrijskih panogah (papirna, kovinska, tekstilna, usnjarska...) (Schowanek in sod., 1997, cit. po Grčman, 2001) ter kmetijstvu, kot dodatki mineralnim gnojilom za povečanje dostopnosti mikrohranil iz tal (Mengel in Kirkby, 1987) in vzdrževanje topnosti mikrohranil v hidroponskih raztopinah. Ločimo naravne in sintetične ligande.

EDTA je med aminopolikarboksilnimi kislinami najpogosteje uporabljen sintetični ligand. Uporablja se ga kot titrant v analitski kemiji, v veliki količini pa tudi v kozmetiki, pralnih praških in drugih detergentih. Ima strukturo heksadentatnega liganda, kar mu omogoča izjemno stabilnost, s tem pa tudi veliko odpornost na fotokemično in mikrobično razgradnjo. V tleh tvori vodotopne kovinske kelate zato se uporablja tudi v postopkih fitoekstrakcije za mobilizacijo in povečanje biološke dostopnosti težje dostopnih težkih kovin v tleh, kot je Pb.

Zaradi velike vodotopnosti kovinskih kelatov ter zaradi omejene sposobnosti sprejema v rastline, gre višek navadno skozi talni profil, kjer lahko obstojnejši kelati ogrozijo druge naravne vire, npr. podtalnico (Jaworska in sod., 1999). EDTA je fitotoksičen in toksičen za večino mikroorganizmov v tleh, ki predstavljajo temelje prehranjevalne verige in igrajo pomembno vlogo pri talnih procesih. Posledica široke uporabe in počasne razgradnje je porast koncentracije EDTA v nekaterih evropskih rekah do 100 µg/L, kar že predstavlja tveganje za okolje in zdravje ljudi.

Aminopolikarboksilne kisline so nedavno odkrili tudi v naravi. Prva takšna snov je bila etilendiamin dijantarjeva kislina (EDDS), ki so jo leta 1984 izolirali iz aktinomicete *Amycolatopsis orientalis* (Nushikiori in sod., 1984). EDDS ima dva kiralna C atoma, kar ji omogoča tvorbo različnih prostorskih izomer [S,S]-, [R,S]- in [R,R]- (slika 2). *Amycolatopsis orientalis* proizvaja samo [S,S]- izomero (Jaworska in sod., 1999), katera je tudi mikrobiološko razgradljiva snov, medtem ko sta ostali izomeri EDDS slabše razgradljivi ([R,S]-) oz. nerazgradljivi ([R,R]-). V diplomskem poskusu smo uporabili [S,S] - EDDS, saj so pretekli poskusi že pokazali, da je kot ligand podobno učinkovit za fitoekstrakcijo kot že ekološko sporen EDTA, pa tudi izpiranje ligandnega kompleksa s Pb, Zn in Cd ter toksičnost za mikroorganizme se je močno zmanjšalo (Leštan in sod., 2001). Polovica [S,S] - EDDS – a se v tleh razgradi v dveh dneh in pol, v celoti pa se mineralizira v 28 dneh. EDDS je nehlapna, v vodi dobro topna (>1000 g/l) spojina, ki ni lipofilna (Jaworska in sod., 1999). EDDS se danes podobno kot EDTA kot sestavina detergentov uporablja v precejšnjih količinah. Cena EDDS pa je še vedno veliko višja kot cena EDTA (5000 EUR/tono) (Leštan, 2002a).



Slika 2: Strukturne formule različnih izomerov EDDS (Jaworska in sod., 1999).

Željene lastnosti idealnega liganda za inducirano fitoekstrakcijo so (Leštan, 2006):

- specifičnost za določeno vrsto kovine,
- vodotopnost v svoji izvirni obliki za lažje tretiranje tal,
- lipofilnost kovinskih kelatov za lažjo absobcijo v rastline in preprečitev izpiranja v podtalnico,
- netoksičnost za talne organizme in rastline,
- nizka cena.

### 2.3.3 Pranje tal

V diplomski nalogi smo metodo inducirane fitoekstrakcije z uporabo liganda [S,S] - EDDS izvedli v kombinaciji z metodo pranja tal. To je fizikalno – kemijska metoda pri kateri tla izpiramo z vodo z dodanimi ligandi (npr. EDTA, EDDS), ki povečajo topnost in mobilnost težkih kovin. Metoda lahko poteka *in situ* ali *ex situ*. Pri *in situ* metodi je pomembno, da se območje onesnaženja nahaja nad nepropustnimi plastmi, da se prepreči odtekanje raztopljenih onesnažil v podtalnico.

V naši raziskavi smo skušali preprečiti izpiranje in migracijo mobiliziranih težkih kovin v nižje sloje z namestitvijo HPRP pod plastjo onesnaženih tal. HPRP so sestavljene iz substratov, ki omogočajo visoko mikrobeno aktivnost ter iz sorptivnih materialov, ki vežejo

in imobilizirajo težke kovine. V talni raztopini raztopljeni kovinski kelati namreč pronicajo skozi talni profil v HPPR, kjer se pod vplivom mikroorganizmov razgradijo, sproščeni kovinski ioni pa se nato vežejo v sorptivni plasti HPPR. Skozi HPPR tako priteče raztopina, ki skoraj ne vsebuje več težkih kovin. Za učinkovito delovanje HPPR pri remediaciji tal je torej nujna biološka razgradljivost kelata težke kovine in liganda ter imobilizacija sproščenih težkih kovin v pregradi (Kos, 2004).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Tla

V poskusu smo uporabili vrtna tla onesnažena s Pb in Zn iz Mežiške doline (Žerjav). Talne vzorce smo zbrali iz površinskega sloja tal, do globine 30 cm. Onesnaženje tal v Mežiški dolini je posledica atmosferskih emisij zaradi več stoletij delovanja rudnika in topilnic Pb in Zn.

Rezultati standardne pedološke analize so pokazali visoko vsebnost Pb in Zn v izbranih tleh. Koncentracija Pb je bila več kot trikrat večja ( $1750 \text{ mg kg}^{-1}$ ) od kritične vrednosti ( $530 \text{ mg kg}^{-1}$ ) za Pb v tleh, (Uredba..., 1996), koncentracija Zn pa skoraj dvakrat večja ( $1300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) od kritične vrednosti ( $720 \text{ mg kg}^{-1}$ ) za Zn v tleh, (Uredba..., 1996). Pomembnejše pedološke lastnosti tal in vsebnosti težkih kovin so podane v preglednici 3 (pedološke analize tal so bile narejene na Katedri za pedologijo in varstvo okolja).

Preglednica 3: Osnovne pedološke lastnosti izbranih tal ter vsebnost težkih kovin.

Lastnosti vrtnih tal iz Mežiške doline (0 – 30 cm)	
teksturni razred	PI
pesek (%)	56.3
melj (%)	32.6
glina (%)	11.1
pH ( $\text{CaCl}_2$ )	7.1
organska snov (%)	9.3
skupni dušik (%)	0.27
P ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	310.3
K ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	50.6
$\text{CO}_3^{2-}$ ( $\text{g kg}^{-1}$ )	153.6
CEC ( $\text{mmol C}^+ 100 \text{ g}^{-1}$ )	23.3
Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	1750
Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	1300

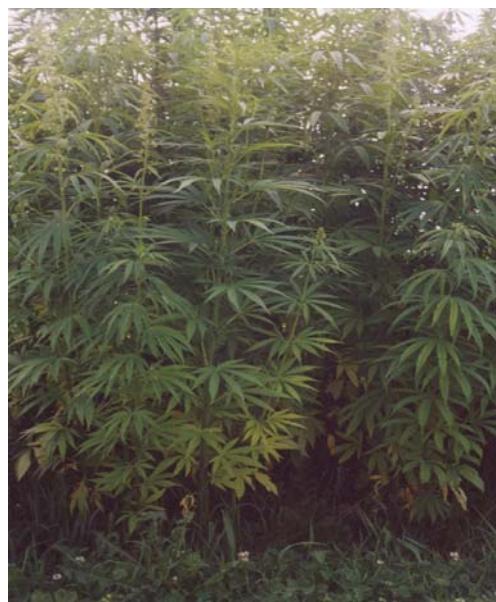
### 3.1.2 Testna fitoekstrakcijska rastlina

V poskusu smo uporabili kultivar industrijske konoplje (*Cannabis sativa*) kot fitoekstrakcijsko rastlino. Kot rastlina z veliko biomaso in hitro rastjo obeta visok fitoekstrakcijski potencial za Pb in Zn.

Botanična klasifikacija industrijske konoplje:

Kraljestvo:	<i>Plantae</i>
Deblo:	<i>Magnoliophyta</i> (kritosemenke)
Razred:	<i>Magnoliopsida</i> (dvokaličnice)
Red:	<i>Urticales</i>
Družina:	<i>Cannabaceae</i>
Rod:	<i>Cannabis</i>
Vrsta:	<i>Cannabis sativa</i>
Podvrsta:	<i>Cannabis sativa</i> L. subsp. <i>sativa</i>

Sadike smo vzgojili iz semen na setvenih ploščah.



Slika 3: Konoplja (*Cannabis sativa*); levo (Köhler..., 2007), desno (Čeh Brežnik, 2007).

### 3.1.3 Ligand

Pb in Zn v tleh smo mobilizirali z dodatkom biorazgradljivega liganda [S,S] – EDDS, dar proizvajalca Octel (Cheshire, UK). Ligand z molsko maso  $292 \text{ g mol}^{-1}$  je bil uskladiščen v obliki 30,6 % založne vodne raztopine EDDS. Pri dodatku 10 mmol [S,S] – EDDS  $\text{kg}^{-1}$  suhih tal, smo uporabili 9,54 g 30,6 % raztopine [S,S] – EDDS. Kolonam smo [S,S] – EDDS dodali v enkratnem odmerku, raztopljeni v 50 ml deionizirane vode  $\text{kg}^{-1}$  suhih tal.

Pri izračunu količine dodanega liganda ter deionizirane vode smo morali upoštevati različne višine zgornjih plasti tal v kolonah (20 cm, 30 cm ter 40 cm). V preglednici 4 so podane količine dodanega liganda [S,S] – EDDS glede na višino vrhnje plasti tal v kolonah.

Preglednica 4: Količine dodane 30,6 % raztopine [S,S] – EDDS in vode glede na višino vrhnje plasti tal v kolonah.

Višina zgornje plasti tal	[S,S] – EDDS (g)	Deionizirana voda (ml)
20 cm	90,79	476
30 cm	136,19	713
40 cm	182,55	957
Kontrola (30 cm)	136,19	713

### 3.1.4 Talne kolone

Talne kolone je sestavljalo podnožje in dva PVC obroča različnih višin (20 cm, 30 cm in 40 cm) s premerom 25 cm. Med posamezne obroče smo vstavili dva usmerjevalna obroča za usmerjanje vode proti sredini kolone, da smo preprečili odtekanje vode ob robovih kolone. Obroče smo medseboj spojili s silikonskim kitom, stabilnost kolon pa smo povečali še s tesnili iz gume pri vsakem spoju. Podnožje je bilo sestavljeno iz spodnjega obroča, ki je bil s silikonskim kitom pritrjen na podstavek s petimi odprtinami, v katere smo vstavili PVC cevke. Odcedna voda iz kolon se je skozi cevke zbirala v 1,5 l plastenkah. Za preprečitev izpiranja talnih delcev v plastenke, smo na dno vsake kolone vstavili tanko plastično mrežico s premerom odprtin 0,2 mm.

### 3.1.5 Horizontalna prepustna reaktivna pregrada

Za preprečevanje izpiranja mobiliziranega Pb in Zn smo v kolone vključili HPRP, ki smo jih namestili v različne globine tal (20 cm, 30 cm in 40 cm pod površino tal). Kontrolne kolone niso vsebovale HPRP.

HPRP je bila sestavljena iz treh plasti:

- Substratna plast, ki omogoča in vzdržuje visoko mikrobnou aktivnost (3 cm višine): žaganje (181,17 g), sojina moka (181,17g) in vermiculit (40,26 g).
- Plast tal (2 cm višine).
- Apatitna plast (3 cm višine) kot sorptivna plast, ki omogoča vezavo in s tem imobilizacijo težkih kovin: apatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , Riedel – de Haen, Seelze) (35,4 g), vermiculit (113,5 g) ter suha tla (659 g).

Da bi ločili in preprečili mešanje posameznih plasti med seboj, smo mednje vstavili plastične mrežice ( $D = 4 \text{ mm}$ ).

## 3.2 METODE

Kolonski poskus je potekal v rastlinjaku Katedre za pedologijo in varstvo okolja, laboratorijske analize pa so bile izvedene v laboratorijih Centra za pedologijo in varstvo okolja.

### 3.2.1 Eksperimentalni del

#### 3.2.1.1 Zasnova in postavitev poskusa

V poskusu smo želeli preveriti:

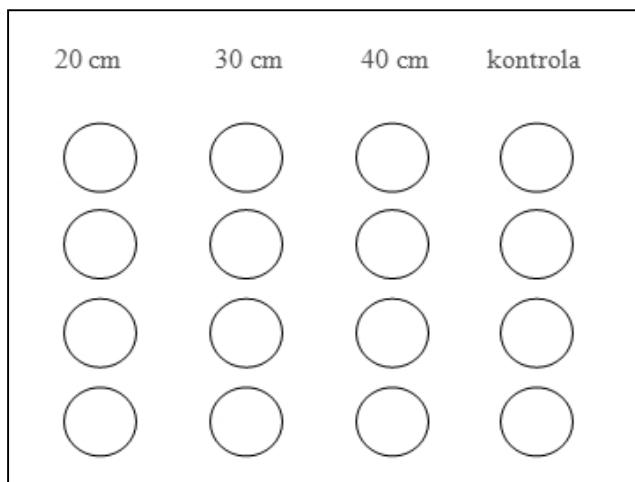
- Učinkovitost [S,S] – EDDS za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn v konopljo (*Cannabis sativa*).
- Učinkovitost HPRP, nameščenih v različnih globinah tal, za preprečevanje izpiranja Pb in Zn.
- Učinkovitost konoplje (*Cannabis sativa*) kot fitoekstrakcijske rastline.

Izvedli smo kolonski poskus s porušenim talnim profilom in HPRP, nameščeno v različnih globinah tal. Poskus s štirimi poskusnimi obravnavanji, smo izvedli v štirih ponovitvah

(skupaj 16 kolon). Razlike med posameznimi obravnavanji so bile predvsem v globini namestitve HPPR v kolonah. Zaradi hkratnega izvajanja kombinacije dveh metod, smo morali pri metodi inducirane fitoekstrakcije postaviti dodatne 4 kontrolne kolone brez dodanega liganda za ovrednotenje in primerjavo rezultatov vsebnosti Pb in Zn v rastlinah.

Razlike med posameznimi poskusnimi obravnavanji so bile:

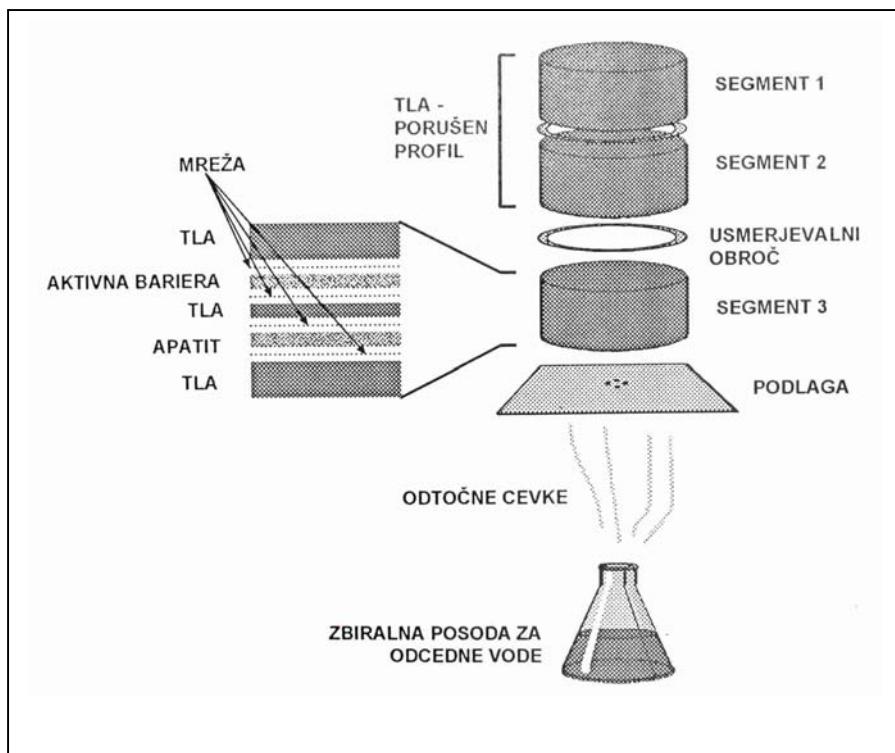
- HPPR nameščena 20 cm pod površino tal,
- HPPR nameščena 30 cm pod površino tal,
- HPPR nameščena 40 cm pod površino tal,
- kontrola – brez HPPR, samo 30 onesnaženih tal.



Slika 4: Eksperimentalna zasnova poskusa (HPPR 20 cm, 30 cm, 40 cm pod površino tal ter kontrola v 4 ponovitvah).

Na dno vsake talne kolone s HPPR smo najprej vstavili tanko plastično mrežico s premerom odprtin 0,2 mm. Nanjo smo nasuli 2 cm plasti tal (952 g). Sledila je dvoplastna HPPR, ločena z 2 cm plastjo suhih tal (sestava HPPR je opisana v 3.1.5). HPPR smo od plasti tal ločili s plastičnimi mrežicami ( $D = 4$  mm), da bi preprečili mešanje.

Nad pregrado smo glede na obravnavanje nasuli različno visoko plast onesnaženih zračno suhih tal (20 cm, 30 cm ter 40 cm) z 9,5 kg, 14,2 kg in 19,1 kg suhih tal. Zračno suha tla smo predhodno presejali skozi sito z luknjicami širine 5 mm. V kontrolne talne kolone brez HPPR smo nasuli samo 30 cm onesnaženih zračno suhih tal (14,2 kg). Posamezne plasti smo predhodno temeljito premešali.



Slika 5: Shematski prikaz sestave talne kolone (Leštan in sod., 2001)

V vseh kolonah smo nato tla pognojili s  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  N v obliki  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ter s  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  K v obliki  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

### 3.2.1.2 Setev testne rastline

V plastične lončke premera 12 cm, napolnjene s substratom za vzgojo sadik, smo posejali 100 semen konoplje. Dva tedna stare sadike konoplje (*Cannabis sativa*) smo presadili v sestavljene kolone z onesnaženimi tlemi. Odbrali smo 16 najkakovostnejših in po rasti izenačenih rastlinic.

### 3.2.1.3 Režim zalivanja

Po posaditvi rastlin v kolone smo obilno zalili, dokler voda ni pritekla skozi kolono, da smo aktivirali HPPR. Zalivali smo dvakrat tedensko. Prvič smo zalili s 500 ml vode kolone z 20 cm tal nad HPPR, kolone z višino 30 cm ter kontrolne kolone smo zalili s 750 ml vode, kolone visoke 40 cm pa s 1000 ml vode. Ker smo ugotovili, da je vode preveč, smo količino vode zmanjšali za polovico. Do dodatka liganda [S,S] – EDDS smo zalili še

dvakrat in sicer kolone visoke 20 cm z 250 ml vode, 30 cm kolone in kontrolne kolone z 375 ml, 40 cm kolone pa s 500 ml vode.

Po 21 dneh smo kolone zalili z raztopino liganda [S,S] – EDDS, 10 mmol kg<sup>-1</sup> suhih tal razredčeno s 50 ml deionizirane vode kg<sup>-1</sup> suhih tal. Potreben je bil ustrezен preračun glede na različne količine tal v kolonah (priprava liganda je opisana v 3.1.3.). Po dodatku liganda smo zalivali dvakrat tedensko še šest tednov s količino vode, ki smo jo dodali ligandu (50 ml kg<sup>-1</sup> tal).

#### 3.2.1.4 Odvzem vzorcev odcednih vod

Z zalivanjem smo začeli pet dni po dodatku liganda in tako začeli z izpiranjem Pb in Zn iz tal. Izprano vodo iz kolon smo zbirali v 1,5 l plasenke nameščene pod talnimi kolonami. Odcednim vodam smo šest tednov enkrat tedensko izmerili volumen, odvzete manjše vzorce smo s pomočjo vakumske črpalke prefiltrirali skozi filter paper (Nr.595), ter jih shranili v hladilniku (5 °C) za nadaljnje analize.

#### 3.2.1.5 Priprava vzorcev rastlinskih tkiv

Nadzemne dele rastline smo peti dan po dodatku liganda poželi. Istočasno smo poželi tudi rastline v kontrolnih kolonah, kjer ni bil dodan ligand. Stebla smo odrezali 1 cm nad površino tal. Rastlinske dele smo temeljito sprali z deionizirano vodo ter jih ločeno shranili v papirnate vreče. Vzorce rastlinskih tkiv smo nato sušili v sušilniku pri T 60°C do dosežene konstantne mase. Suhe vzorce smo zmleli v laboratorijskem titanovem centrifugalnem mlinu. Vzorce smo tako pripravili za nadaljnje analize.

#### 3.2.1.6 Odvzem vzorcev tal

Po končanem poskusu smo iz kolon odvzeli vzorce tal in kolone razdrli. Kolone z 20 cm in 30 cm plastjo tal nad HPRP smo spraznili do HPRP, zemljo temeljito premešali ter iz vsake kolone vzeli reprezentativni vzorec. Pri kolonah s 40 cm plastjo tal nad HPRP, smo vzorce jemali po plasteh na 10 cm. Vsako plast posebej smo pred vzorčenjem premešali. Vzeli smo tudi reprezentativni skupni vzorec iz celotne 40 cm plasti. Kontrolne kolone brez HPRP smo popolnoma izpraznili, tla premešali ter odvzeli vzorec. Vse vzorce tal smo shranili v papirnate vrečke ter jih en teden sušili v sušilniku. Suhe vzorce tal smo zmleli v ahatnem mlinu ter jih nato presejali skozi 150 µm sito. Vzorce smo tako pripravili za nadaljnje analize s postopkom razklopa z zlatotopko.

### 3.2.1.7 Mikrobna aktivnost v HPRP

Aktivnost mikroorganizmov v HPRP smo določili z merjenjem proizvedene metabolne toplotne. Temperaturne sonde, dolge 10 cm, smo vodoravno namestili v substratno plast (sojina moka obogatena z žaganjem in vermikulitom) HPRP in sicer v kolone s HPRP 30 cm pod površino tal ter v kontrolne kolone brez HPRP. Merilni aparat, povezan s temperaturnimi sondami, je beležil razlike v temperaturah v HPRP in v tleh v kontrolnih kolonah.

## 3.2.2 Analitske metode

### 3.2.2.1 Določanje vsebnosti Pb in Zn v tleh

Vsebnost Pb in Zn v talnih vzorcih smo določili po razklopu z zlatotopko (ISO 11466, 1995; ISO/DIS 11047, 1995). V reakcijsko posodo smo zatehtali približno 3 g zmletega vzorca tal, ga navlažili z 1 ml vode ter mu med mešanjem dodali 21 ml solne kisline (HCl) in po kapljicah 7 ml dušikove kisline ( $\text{HNO}_3$ ). Reakcijske mešanice vzorcev tal smo pustili stati 16 ur pri sobni temperaturi. Nato smo jih postopoma 2 uri segrevali priklopljene na povratne hladilnike, skozi katere je krožila voda, da bi preprečili izgube v obliki hlapov. Vsebino posod smo ohladili, prefiltrirali v 100 ml bučke ter dopolnili do označbe z deionizirano vodo. Pb in Zn smo izmerili z metodo atomske absorpcijske spektrofotometrije (AAS, Parkin Elmer 1100). Meritve z AAS so opravili sodelavci Katedre za pedologijo in varstvo okolja.

### 3.2.2.2 Določanje vsebnosti Pb in Zn v odcednih vodah

Pb in Zn smo v prefiltiranih odcednih vodah določali z metodo plamenske atomske absorpcijske spektrofotometrije (Flame - AAS, Parkin Elmer 1100). Meritve z AAS so opravili sodelavci Katedre za pedologijo in varstvo okolja.

### 3.2.2.3 Določanje vsebnosti Pb in Zn v nadzemnih delih rastline

Koncentracijo Pb in Zn v rastlinskem tkivu, smo določili po mikrovalovnem razkroju s koncentrirano (70%) dušikovo kislino ( $\text{HNO}_3$ ). V reakcijske posodice smo zatehtali približno 0,3 g suhega in zmletega rastlinskega tkiva ter ga prelili z 2 ml (70%)  $\text{HNO}_3$  in 2 ml deionizirane vode. Posode smo zaprli in vzorce razkrojili v mikrovalovni peči (MDS – 2000, CEM). Po končanem razkroju smo vzorce ohladili do sobne temperature ter jih razredčili do 25 ml z deionizirano vodo. Z nadaljnji analizami s plamensko atomsko

absorpcijsko spektrofotometrijo (Flame – AAS, Parkin Elmer 1100) smo določili vsebnost Pb in Zn v razklopu. AAS meritve so opravili sodelavci Katedre za pedologijo in varstvo okolja.

### 3.2.2.4 Določanje fitoekstrakcijskega potenciala in biokoncentracijskega faktorja

Učinkovitost fitoekstrakcije Pb in Zn s konopljo smo določili z izračunom biokoncentracijskega faktorja (BCF) ter fitoekstrakcijskega potenciala (PP). Z BCF lahko določimo indeks, ki nam pove kakšna je sposobnost rastline za akumulacijo določene težke kovine glede na njeno vsebnost v tleh (Zayed in sod., 1998). BCF smo izračunali kot razmerje med koncentracijami Pb in Zn v nadzemnih tkivih konoplje in v tleh. Za učinkovito fitoekstrakcijo, mora biti BCF večji od 1, glede na doseženo biomaso rastline.

PP, izražen v  $\text{kg ha}^{-1}$ , predstavlja celotno količino težkih kovin, ki se v enem ciklu fitoekstrakcije ekstrahirajo iz tal na površini 1 ha (Leštan, 2006). PP za konopljo smo izračunali iz koncentracij Pb in Zn v rastlinskem tkivu po enkratnem dodatku liganda [S,S] - EDDS in pridelka suhe biomase konopje  $\text{ha}^{-1}$ . V izračunu je bil uporabljen podatek o pridelku biomase konoplje (*Cannabis sativa*), ki znaša 25000 ton suhe biomase  $\text{ha}^{-1}$  (Jevtić, 1986).

### 3.2.3 Statistična analiza

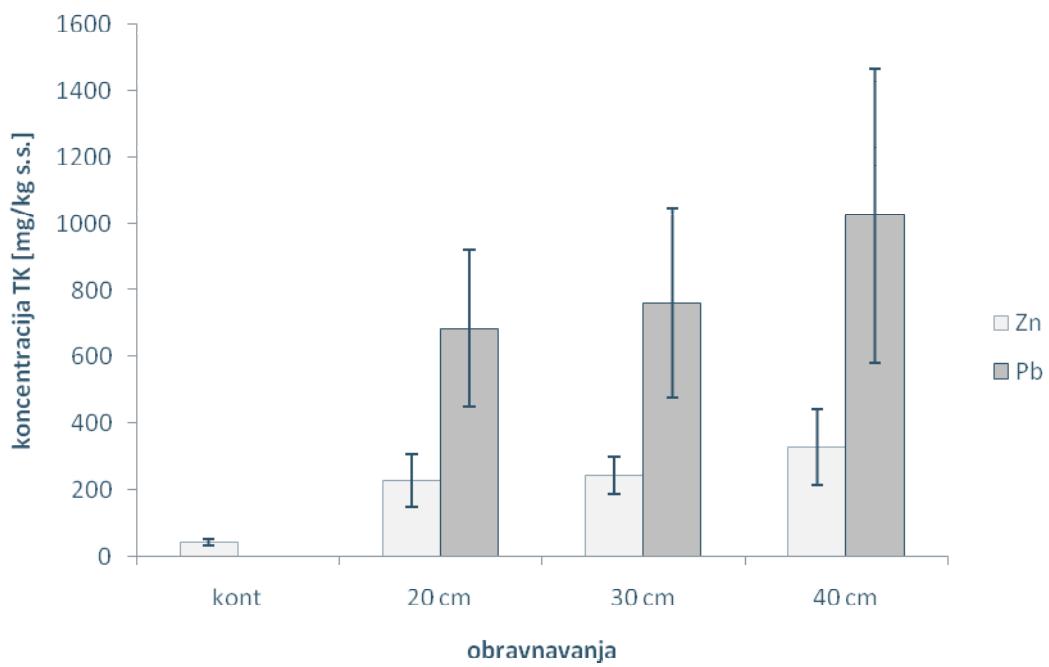
Rezultate kemijskih analiz smo statistično obdelali. Statistično značilne razlike med obravnavanji smo ugotavljali po metodi analize variance – ANOVA in Tukey-evega (HSD) testa mnogoterih primerjav. Pri izračunih smo upoštevali 5 % tveganje.

## 4 REZULTATI

### 4.1 VSEBNOST Pb IN Zn V KONOPLJI

Rastline so tri tedne po presaditvi v kolone normalno rastle in hitro povečevale svojo biomaso. Po dodatku biorazgradljivega liganda [S,S] – EDDS, so se v petih dneh na rastlinah začeli pojavljati vidni simptomi toksičnosti. Na listih smo opazili nekrotične lise, rastline so se začele starati in sušiti.

Analiza suhega rastlinskega tkiva je pokazala, da enkratni dodatek  $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  [S,S] – EDDS poveča vsebnost Pb in Zn v testni rastlini (*Cannabis sativa*). Rastline so v svojih nadzemnih tkivih akumulirale  $1026 \pm 442 \text{ mg kg}^{-1}$  Pb in  $330,3 \pm 114,7 \text{ mg kg}^{-1}$  Zn, kar je 1926-krat več Pb in 7,5-krat več Zn kot v kontrolnih rastlinah, pri katerih v tla ni bil dodan ligand. Razlike med obravnavanjem z dodanim ligandom in kontrolnim obravnavanjem so statistično značilne. Med posameznimi obravnavanjem z dodanim ligandom (20 cm, 30 cm in 40 cm HPPR kolone) ni statistično značilnih razlik.



Slika 6: Vsebnost Pb in Zn v zelenih delih konoplje (*Cannabis sativa*), ki so rasle v 20 cm, 30 cm in 40 cm HPPR kolonah po dodatku  $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  [S,S] – EDDS ter v kontrolnih kolonah brez dodatka liganda. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev  $\pm$  standardna deviacija.

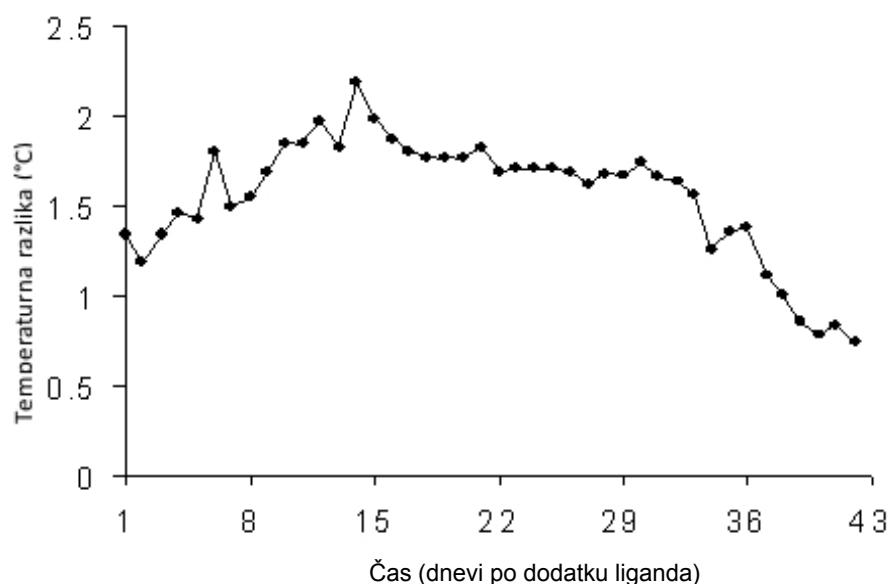
Zanimivo je, da so rastline ob dodatku liganda v svojih nadzemnih delih akumulirale trikrat več Pb kot Zn, medtem, ko je bilo pri kontrolnih rastlinah brez dodanega liganda ravno obratno. Povprečna koncentracija Zn v kontrolnih rastlinah je bila  $44,29 \text{ mg kg}^{-1}$ , koncentracija Pb pa le  $0,53 \text{ mg kg}^{-1}$ . Povprečne vrednosti koncentracij Pb in Zn po posameznih obravnavanjih so prikazane na sliki 6.

## 4.2 DELOVANJE HPPR

V kolonskem poskusu smo želeli preveriti učinkovitost HPPR za preprečitev izpiranja Pb in Zn iz kolon. HPPR je bila sestavljena iz substratne plasti (z žagovino obogatena sojina moka premešana z vermiculitom) za vzdrževanje mikrobnene aktivnosti ter iz plasti z mešanico apatita, tal in vermiculita za imobilizacijo težkih kovin. Kelati [S,S] – EDDS s Pb in Zn, ki so nastali po dodatku liganda v onesnaženih tleh, so se izpirali skozi talni profil v pregrado, kjer so jih mikroorganizmi razgradili, prosti kovinski ioni pa naj bi se adsorbirali v apatitni plasti.

### 4.2.1 Mikrobnna aktivnost v HPPR

Mikrobnna aktivnost v HPPR smo spremljali z merjenjem proizvedene metabolne toplote v substratni plasti in v tleh kontrolne kolone. Temperaturne razlike med kolono s HPPR postavljeno 30 cm globoko in kontrolno kolono s 30 cm višino tal so prikazane na sliki 7.



Slika 7: Temperaturna razlika med substratno plastjo v koloni s HPPR na globini 30 cm ter tlemi v kontrolni koloni brez HPPR.

Iz slike 7 je razvidno, da je temperatura v substratni plasti HPRP med procesom remediacije ostala višja kot v kontrolnih kolonah brez HPRP. Temperatura v substratni plasti je po dodatku [S,S] – EDDS začela naraščati. Najvišjo temperaturno razliko smo zabeležili 14. dan, nakar je v povprečju dva tedna ostala konstantna z vrednostjo 1,7 ° C, po 29. tednu pa je začela upadati.

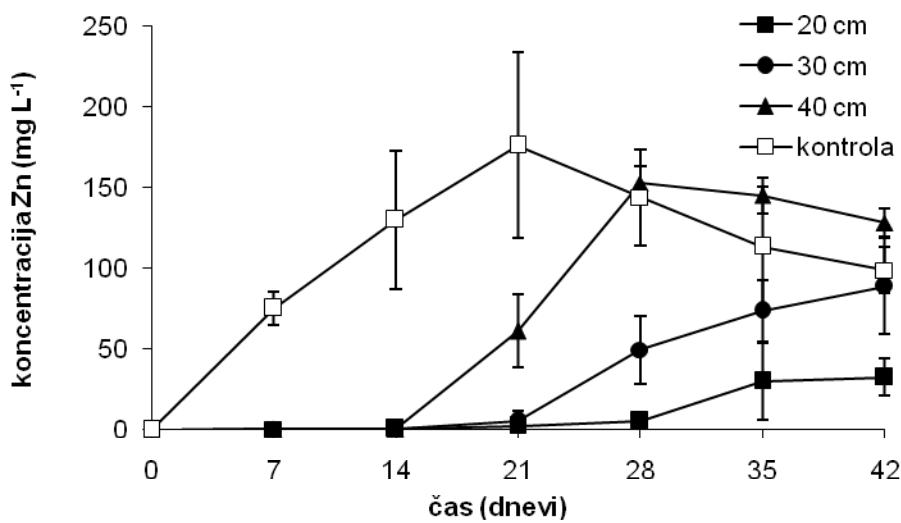
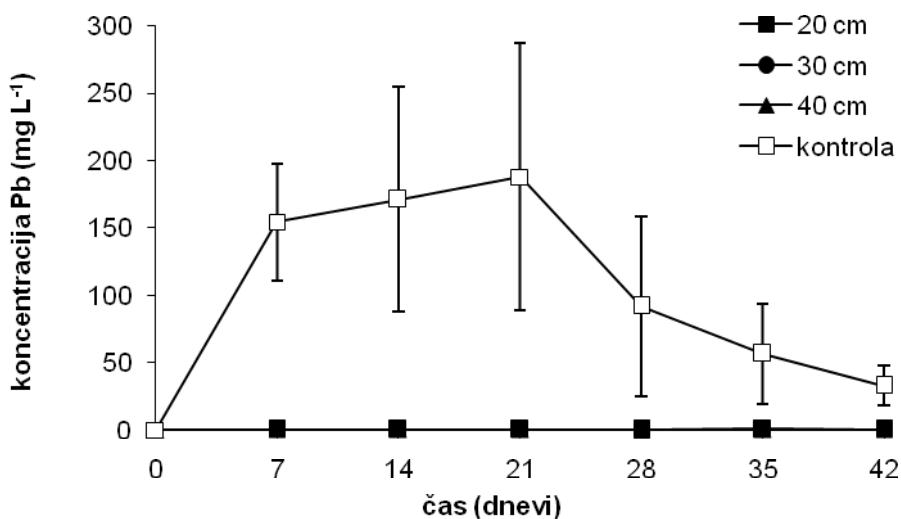
V plasti tal, tik nad HPRP, smo opazili nekaj mm velike delce kovinskega izgleda (slika 8), ki jih pred postopkom remediacije ni bilo. Kemijska analiza, ki so jo opravili sodelavci Katedre za pedologijo in varstvo okolja je kasneje pokazala, da gre za svinčev sulfid (PbS) oz. galenit.



Slika 8: PbS v talnih kolonah, v plasti tal tik nad HPRP. Fotografija je desetkrat povečana.

#### 4.2.2 Dinamika izpiranja Pb in Zn v odcednih vodah

Analize odcednih vod so pokazale, da so bile HPRP postavljene 20 cm pod površino tal učinkovite pri preprečevanju izpiranja Pb in Zn. Iz slike 9,10 je razvidno, da je bilo izpiranje Pb in Zn med 6 tedenskim pranjem tal z vodo po dodatku enkratnega odmerka 10 mmol kg<sup>-1</sup> [S,S] – EDDS zelo majhno. V povprečju se je po koncu pranja tal izpralo iz 20 cm talnih kolon 0,64 mg Pb in 32,95 mg Zn, kar je le 0,003 % Pb in 0,18 % Zn od prvotne vsebnosti teh dveh elementov v tleh.



Slika 9, 10: Koncentracije Pb in Zn v odcednih vodah iz kolon s HPRP 20, 30 in 40 cm globoko ter iz kontrolnih kolon brez HPRP po dodatku 10 mmol [S,S] – EDDS suhih tal. Rezultate podajamo kot povprečje 4 ponovitev ± standardna deviacija.

HPRP, postavljene 30 cm globoko, so bile tudi učinkovite pri zadrževanju obeh težkih kovin, saj se je v primerjavi s kontrolnimi kolonami brez HPRP in z enako višino onesnaženih tal, izpralo 435-krat manj Pb in 4-krat manj Zn. Iz teh kolon se je v povprečju izpralo 1,78 mg Pb ter 198,12 mg Zn, kar je le 0,007 % Pb in nekoliko več, 1,07 % Zn od prvotne vsebnosti Pb in Zn v tleh. Razlike v koncentracijah Pb in Zn v odcednih vodah med kontrolnimi kolonami brez HPRP in kolonami s HPRP postavljeno 30 cm pod površino tal so statistično značilne.

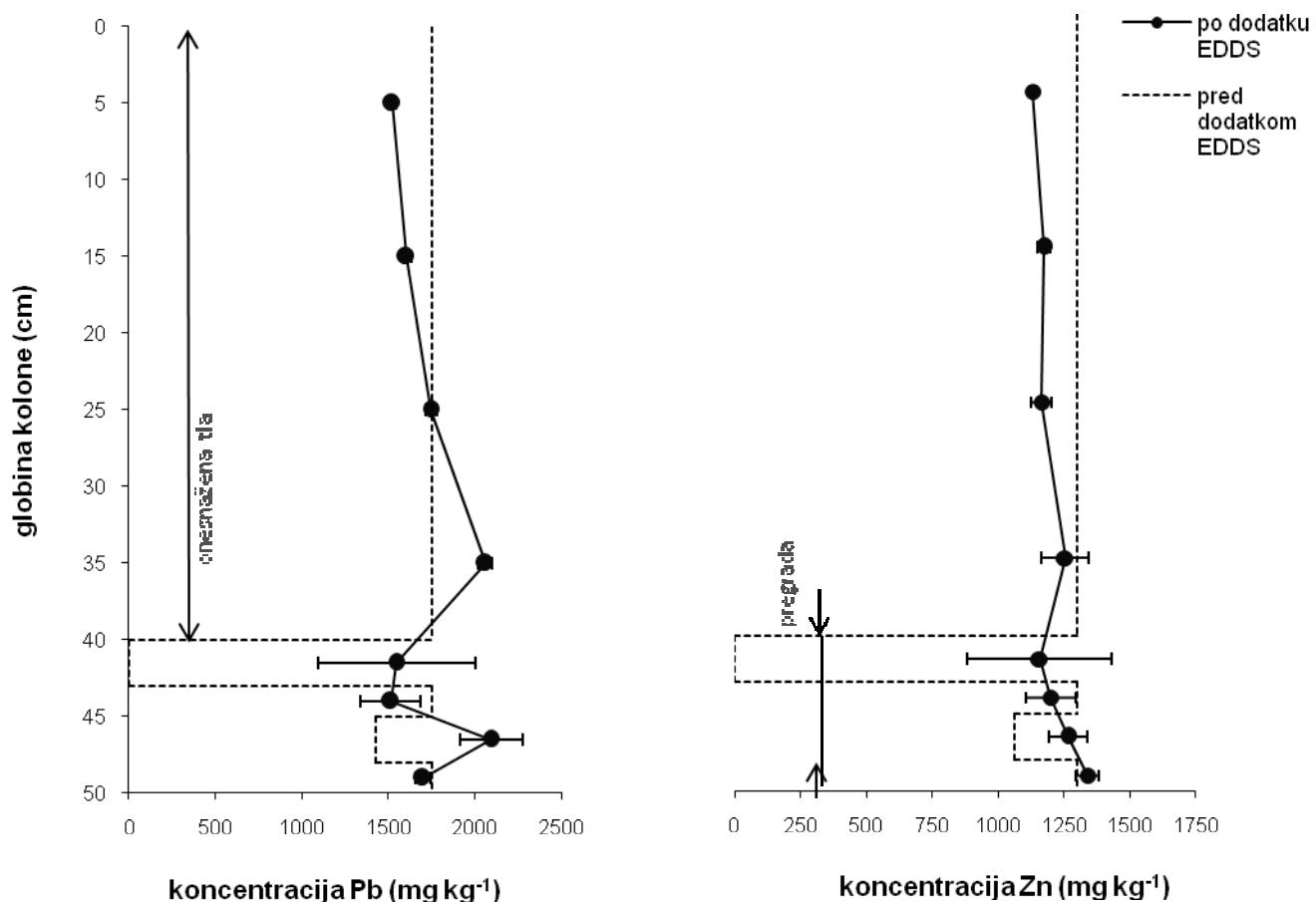
HPRP, postavljene 40 cm globoko v tleh, so učinkovito zmanjšale izpiranje Pb, saj se ga je iz kolon izpralo v povprečju 1,81 mg, kar je le 0,007 %. V nasprotju s Pb pa HPRP na tej globini niso preprečile izpiranje Zn, saj se je iz kolon po šestih tednih izpralo v povprečju kar 712,63 mg Zn, kar je 3,85 %. Iz kontrolnih kolon brez HPRP, se je po šestih tednih v povprečju izpralo 757,6 mg Pb in 797,9 mg Zn, kar je 3,04 % Pb in 4,31 % Zn.

Iz slike 9,10 je opazno tudi, da je bilo izpiranje Pb po dodatku liganda skoraj konstantno majhno in po šestih tednih tudi zaključeno pri vseh treh obravnavanjih, medtem, ko je bilo izpiranje Zn majhno in primerljivo s Pb le začetna 2 do 4 tedne. Največje izpiranje Zn je bilo opazno v 40 cm kolonah, ki je po dveh tednih začelo naglo naraščati do te mere, da v primerjavi s kontrolnimi kolonami brez HPRP ni bilo več statistično značilnih razlik. Izpiranje Zn iz 40 cm kolon je doseglo maksimum v 5. tednu, nakar je nekoliko upadlo vendar celo presegalo izpiranje v kontrolnih kolonah. HPRP, postavljene na 20 cm in 30 cm pod površino tal, so bile učinkovitejše pri preprečevanju izpiranja Zn, vendar je tudi pri teh kolonah po petem tednu izpiranje začelo naraščati in kaže, da v šestih tednih naših meritev ni doseglo maksimuma.

#### 4.3 VSEBNOST Pb IN Zn V TLEH

Po koncu šest tedenskega cikla pranja tal z vodo po dodatku [S,S] – EDDS, smo analizirali talne vzorce porušenih kolon. Vsebnost Pb in Zn smo določili iz povprečnih vzorcev celotnih tal v vseh kolonah, v kolonah s HPRP 40 cm globoko pa smo vsebnost Pb in Zn določili tudi po posameznih 10 cm globokih plasteh. Koncentracijo težkih kovin smo določili tudi v vseh treh plasteh HPRP ter v 2 cm plasti tal pod HPRP.

Dinamika premeščanja Pb in Zn skozi posamezne plasti v kolonah s HPRP postavljeno 40 cm globoko je prikazana na sliki 11. Po enkratnem dodatku [S,S] – EDDS in med izpiranjem kolon so se kovine prerazporedile po profilu v nižje plasti. Največ Pb se je izpralo iz zgornjih 20 cm plasti tal, medtem ko se je v zadnji 10 cm plasti tal nad HPRP koncentracija Pb povečala.



Slika 11: Dinamika izpiranja Pb in Zn skozi profil talnih kolon s HPRP postavljenim 40 cm globoko pred in po dodatku liganda. Vrednosti so podane kot povprečne koncentracije 4 ponovitev  $\pm$  standardna deviacija po 42 dnevni izpiranju.

Iz tal nad HPRP se je v povprečju odstranilo 3,33 % Pb, iz  $1750 \text{ mg kg}^{-1}$  na  $1692 \text{ mg kg}^{-1}$ , (vzorčeno iz celotne 40 cm plasti), ki se je nato pretežno akumuliral v HPRP, največ v apatitni plasti, kjer je koncentracija Pb narasla iz  $1425 \text{ mg kg}^{-1}$  na  $2094 \text{ mg kg}^{-1}$ . Dodatek liganda je dokaj enakomerno zmanjšal koncentracijo Zn po plasteh v tleh nad HPRP, iz  $1300 \text{ mg kg}^{-1}$  na  $1148 \text{ mg kg}^{-1}$  v povprečju. Od 11,69 % odstranjenega Zn, se ga je nekaj akumuliralo v substratni plasti HPRP, večinoma pa se je izpral skozi kolono.

Iz tal v kolonah s HPRP 30 cm globoko se je v povprečju odstranilo 2,53 % Pb, iz 1750 mg kg<sup>-1</sup> na 1706 mg kg<sup>-1</sup> ter 7,27 % Zn, iz 1300 mg kg<sup>-1</sup> na 1206 mg kg<sup>-1</sup>. Iz tal v kolonah s HPRP postavljeno 20 cm globoko pa se je z dodatkom [S,S] – EDDS odstranilo v povprečju 2,07 % Pb, iz 1750 mg kg<sup>-1</sup> na 1714 mg kg<sup>-1</sup> ter 4,15 % Zn, iz 1300 mg kg<sup>-1</sup> na 1246 mg kg<sup>-1</sup>. Koncentracije Pb in Zn po posameznih plasteh kolone so podane v preglednici 5.

Preglednica 5: Koncentracija Pb in Zn po posameznih plasteh talne kolone s HPRP postavljeno 40 cm globoko po koncu 6 tedenskega izpiranja. Vrednosti so podane kot povprečna koncentracija ± s.d. Začetna koncentracija Pb je bila 1750 mg kg<sup>-1</sup>, Zn pa 1300 mg kg<sup>-1</sup>.

Plast	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
0 – 10 cm	1519 ± 23	1131 ± 10
10 – 20 cm	1604 ± 28	1175 ± 24
20 – 30 cm	1747 ± 35	1164 ± 37
30 – 40 cm	2059 ± 39	1254 ± 89
HPRP 1	1546 ± 454	1156 ± 274
med HPRP	1513 ± 175	1198 ± 94
HPRP 2	2094 ± 179	1266 ± 73
pod HPRP	1700 ± 42	1338 ± 42

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Učinkovitost [S,S] - EDDS za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn in vpliv na mobilnost

Težke kovine v tleh so za rastline in talne organizme večinoma v nedostopni obliki, močno vezane na trdne delce v tleh. Z uporabo ligandov, lahko mobiliziramo težke kovine in jim povečamo dostopnost za rastline. Po podatkih analize opravljene v kemijskem laboratoriju na Katedri za pedologijo in varstvo okolja, je bilo v tleh uporabljenih v poskusu kar 75 % Pb vezanega na organsko snov, njegova vsebnost v talni raztopini pa je bila kljub močni onesnaženosti pod mejo detekcije. Zn je bil nekoliko dostopnejši, saj ga je bilo v talni raztopini 0,03 %, na organsko snov pa je bil vezan v manjši meri in sicer 18,36 %.

Z dodatkom enkratnega odmerka  $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  biorazgradljivega [S,S] - EDDS, smo pričakovali in dosegli povečano akumulacijo Pb in Zn v nadzemnih delih konoplje (*Cannabis sativa*). Opazili smo večjo učinkovitost [S,S] - EDDS za povečan vnos Pb v rastlino v primerjavi s Zn. Koncentracija Zn se je po dodatku liganda v nadzemnih delih rastlin sicer povečala, vendar v manjši meri kot pri Pb. Zn je esencialen element za rastline, koncentracijo katerih pa rastline notranje uravnavajo ne glede na visoko vsebnost elementa v zunanjem okolju. Zn je zato že sam po sebi dostopnejši za rastline kot Pb, kar je verjetno razlog za kar 83-krat večjo vsebnost Zn v kontrolnih kolonah brez dodanega liganda.

#### 5.1.2 Učinkovitost konoplje kot fitoekstrakcijske rastline

Konoplja je zaradi velike biomase, hitre rasti in svoje odpornosti alternativen vir visoko kakovostnih vlaken za papir in tekstilno industrijo ter potencialen energetski vir. Njena uporaba kot fitoekstrakcijska rastlina bi tako lahko nadomestila del nastalih stroškov pri remediaciji tal.

Predvidevali smo, da je konoplja (*Cannabis sativa*), kot rastlina z visoko proizvodnjo biomase ( $20 - 30 \text{ t ha}^{-1}$ ) za fitoekstrakcijo obetavna rastlina z visokim fitoekstrakcijskim potencialom za Zn in Pb. Učinkovitost fitoekstrakcije Pb in Zn s konopljo smo določili z izračunom BCF ter PP. Ugotovili smo, da je BCF prenizek za učinkovito remediacijo tal. Za učinkovito fitoekstrakcijo, mora biti BCF večji od 1, glede na doseženo biomaso rastline. V našem poskusu s konopljo pa je BCF za Pb znašal le 0,59, za Zn pa 0,25.

Na podlagi izračunanega PP za konopljo smo ugotovili, da se je s fitoekstrakcijo po enkratnem dodatu liganda [S,S] - EDDS iz tal odstranilo le 0,31 % Pb in 0,13 % Zn.

### 5.1.3 Učinkovitost HPRP za preprečevanje izpiranja Pb in Zn

Z uporabo HPRP, nameščenih pod onesnaženimi tlemi v različnih globinah tal, smo pričakovali znatno zmanjšanje izpiranja Pb in Zn. Tako bi lahko preprečili kontaminacijo nižje ležečih plasti tal in podtalnice s težkimi kovinami. Dodatek 10 mmol kg<sup>-1</sup> [S,S] - EDDS je povečal mobilnost Pb in Zn v tleh zato so se le te razporedile navzdol po talnem profilu. HPRP, še posebno HPRP postavljene na globini 20 in 30 cm, so učinkovito preprečile izpiranje Pb. To kaže, da bi bila uporaba biorazgradljivega [S,S] - EDDS v kombinaciji s HPRP potencialno bolj pomembna za okolju varno *in situ* izpiranje Pb in Zn kot za iducirano fitoekstrakcijo (Kos in Leštan, 2004). Mikroorganizmi so v substratni plasti HPRP uspeli razgraditi večino Pb - [S,S] - EDDS, namestitev dodatne plasti iz apatita pa je nato učinkovito zadržala sproščene Pb - ione. Velik del Pb - ionov se je zadržal tudi v zadnji plasti tal tik nad HPRP, kar je najverjetneje posledica hitre biorazgradljivosti kelata Pb - [S,S] - EDDS.

HPRP pa so bile relativno neučinkovite pri preprečitvi izpiranja Zn. Razlog za to je verjetno v večji obstojnosti in s tem slabši oz. počasnejši biorazgradljivosti Zn - [S,S] - EDDS kelata v nasprotju s kelatom Pb - [S,S] - EDDS. Kot je razvidno iz slike 9,10, je bilo izpiranje Zn le časovno zamaknjeno, ne pa tudi preprečeno. Kaže, da reaktivne snovi v HPRP, kot sta vermikulit in apatit, nimajo enakih sorptivnih sposobnosti za vse težke kovine.

Prisotnost PbS kaže na anaerobne razmere v tleh in HPRP. PbS se je verjetno tvoril s sproščenimi Pb<sup>2+</sup> ioni po razgradnji Pb - [S,S] - EDDS kelatov, H<sub>2</sub>S pa je nastal v mikrobnno aktivni substratni plasti v HPRP (Karnachuk in sod., 2002). PbS je v vodi netopen, zato ni nevarnosti za nadaljnje izpiranje Pb. Tudi njegova stabilnost je odvisna samo od anaerobnih razmer. Le nekaj minut po izpostavljenosti na zraku izgubi lastnost svetlega kovinskega leska, kar je najverjetneje posledica hitre oksidacije iz sulfida v sulfat (Bosecker, 1997).

## 5.2 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali učinkovitost biorazgradljivega liganda [S,S] - EDDS za inducirano fitoekstrakcijo Pb in Zn v konopljo (*Cannabis sativa*), njen potencial za fitoekstrakcijo ter učinkovitost HPPR, nameščenih v različnih globinah tal, za preprečevanje izpiranja Pb in Zn. Rezultate raziskave lahko povzamemo v naslednjih ugotovitvah:

- Dodatek enkratnega odmerka  $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  biorazgradljivega liganda [S,S] - EDDS je povečal dosegljivost Pb in Zn v tleh in njihov vnos v rastlino.
- Po dodatu [S,S] - EDDS so se na rastlinah kazali toksični učinki v obliki nekroz in hitrega staranja rastlin.
- Izračun fitoekstrakcijskega potenciala konoplje za Pb in Zn je pokazal, da so koncentracije Pb in Zn, ki jih konoplja akumulira, še vedno prenizke za učinkovito odstranjevanje Pb in Zn iz tal.
- Po dodatu  $10 \text{ mmol kg}^{-1}$  liganda [S,S] - EDDS, so HPPR učinkovito preprečile izpiranje in s tem potencialno onesnaženje podtalnice s Pb, niso pa preprečile izpiranje Zn. Vzrok je najverjetneje v hitri razgradnji Pb - [S,S] - EDDS kelata, medtem, ko je kelat Zn - [S,S] - EDDS stabilnejši in težje razgradljiv v danih razmerah.

## 6 POVZETEK

Razširjenost onesnaženja tal s težkimi kovinami je po svetu postal resen problem, saj predstavlja nevarnost za zdravje ljudi, rastlin in živali, pomemben vpliv pa ima tudi na kakovost tal. Pedogeneza je dolgotrajen proces, odvisen od številnih okoljskih dejavnikov, zato je razvoj različnih tehnologij remediacije tal zelo pomemben. Poznanih je več metod remediacije tal onesnaženih s težkimi kovinami kot so fitoremediacija, stabilizacija-solidifikacija, pranje tal...

V kolonskem poskusu smo preizkušali učinkovitost kombinirane metode inducirane fitoekstrakcije s konopljo (*Cannabis sativa*) z *in situ* pranjem tal onesnaženih s Pb in Zn. Uporabili smo tla iz Mežiške doline, ki je eno izmed žarišč onesnaženja s težkimi kovinami v Sloveniji. Ugotavliali smo učinkovitost dodanega biorazgradljivega liganda [S,S] - EDDS za mobilizacijo Pb in Zn v tleh, učinkovitost konoplje za akumulacijo sproščenega Pb in Zn iz talne raztopine v svojih nadzemnih tkivih ter učinkovitost HPRP, nameščenimi v različnih globinah pod onesnaženimi tlemi, za preprečevanje izpiranja preostalega sproščenega Pb in Zn. Kombinirana metoda inducirane fitoekstrakcije ter *in situ* pranja tal z uporabo biološko razgradljivih ligandov in HPRP predstavlja nov način remediacije tal onesnaženih s težkimi kovinami in je kot takšna tudi patentirana (Leštan in Kos, 2002).

Z dodatkom enkratnega odmerka 10 mmol kg<sup>-1</sup> biorazgradljivega liganda [S,S] - EDDS smo sicer povečali dosegljivost Pb in Zn v tleh in njihov vnos v rastlino. Izračun PP pa je pokazal, da so koncentracije Pb in Zn, ki jih konoplja akumulira, še vedno prenizke za učinkovito odstranjevanje Pb in Zn iz tal. Rezultati torej kažejo, da je pri danih pogojih PP konoplje za Pb in Zn omejen. Fitoekstrakcija zato ni primerna metoda remediacije tal onesnaženih s Pb in Zn.

HPRP, ki smo jih namestili pod plastjo onesnaženih tal, so bile sestavljene iz plasti substratov kot so žagovina in sojina moka, ki omogočajo visoko mikrobnou aktivnost ter iz plasti sorptivnih materialov kot je apatit, ki vežejo in s tem imobilizirajo težke kovine. Po dodatku 10 mmol kg<sup>-1</sup> liganda [S,S] - EDDS, so HPRP učinkovito preprečile izpiranje in s tem potencialno kontaminacijo podtalnice s Pb, niso pa preprečile izpiranje Zn. Vzrok je najverjetneje v hitri razgradnji Pb - [S,S] - EDDS kelata, medtem ko je kelat Zn - [S,S] - EDDS stabilnejši in težje razgradljiv v danih razmerah. Za učinkovito delovanje HPRP pri remediaciji tal je namreč nujna biološka razgradljivost kelata težke kovine in liganda ter imobilizacija sproščenih težkih kovin v HPRP (Kos, 2004).

Rezultati naše raziskave tako kažejo, da bi bila uporaba biorazgradljivega liganda [S,S] - EDDS v kombinaciji s HPPR potencialno bolj pomembna za okolju varno *in situ* izpiranje Pb kot za inducirano fitoekstrakcijo (Kos in Leštan, 2004). Cilj prihodnjih raziskav bi tako bil zmanjšanje biološke razgradnje TK - [S,S] - EDDS kelatov v onesnaženih tleh, hkrati pa povečanje biorazgradljivosti kovinskih kelatov v substratni plasti HPPR (Kos, 2004).

## 7 VIRI

- Alkorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J. M., Amezaga I., Albizu I., Onaindia M., Garbisu C. 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3: 55-70
- Alloway B. J. 1990. The origin of heavy metals in soils. V: Heavy metals in soils. Alloway B. J. (ed.) London, New York, Willey: 29-39
- Anderson C. W. N., Brooks R. R., Chiarucci A., LaCoste C. J., Leblanc M., Robinson B.H., Simcock R., Stewart R. B. 1999. Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration*, 67: 407-415
- Baker A. J. M., Brooks R. R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1: 81-126
- Bosecker K. 1997. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20: 591–604.
- Brooks R. R., Chambers M. F., Nicks L. J., Robinson B. H. 1998. Phytomining. *Trends in Plant Science*, 3, 9: 359-362
- Cunningham S. D., Berti W. R., Huang J. W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Tibtech*, 13: 393-397
- Čeh Brežnik B. 2007. Spoznavanje poljščin: opis poljščin, razvrstitev v botanične družine in agronomiske skupine, slovenska in latinska poimenovanja, fotografije, povezave na spletni strani, kjer najdemo fotografije in skice. Konoplja *Cannabis sativa L. var. sativa*. <http://www.bf.uni-lj.si/poljedelstvo/Vaje.html> (10. avg. 2007)
- Dahlin S., Witter E., Martensson A., Turner A., Baath E. 1997. Where's the limit? Changes In the microbiological properties of agricultural soils at low level of metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 1405-1415
- Flathman P. E., Lanza G. R. 1998. Phytoremediation: current views on a emerging green Technology. *Journal of Soil Contamination*, 7: 415-432

Grčman H. 2001. Fitoekstrakcija onesnaženih tal s kontrolirano mobilizacijo težkih kovin.  
Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 98 str.

Grčman H., Velikonja Bolta Š., Kos B., Leštan D. 2001. EDTA and EDDS enhanced heavy metal phytoextraction: plant uptake, leaching and toxicity. V: Phytoremediation: ISEB 2001 Meeting, Leipzig, 15. – 17. 05. 2001: 29-40

Huang J. W., Chen J. and Cunningham S. D. 1997. Phytoextraction of lead from contaminated soils. Environmental Remediation, 21: 283-298

ISO 11466. Soil quality-Extraction of trace elements soluble in aqua regia. 1995: 6 str.

ISO/DIS 11047. Soil quality-Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc-Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods. 1995: 18 str.

Janssen R. P. T., Peijnenburg W. J. G. M., Posthuma L., Van Den Hoop M. A. G. T. 1997. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. 1. Relationship between metal partitioning coefficient and soil characteristics. Environmental Toxicology Chemistry, 16: 2470-2478

Jaworska J. S., Schowanek D., Feijtel T. C. J. 1999. Environmental risk assessment for Trisodium [S,S] - ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent application. Chemosphere, 38: 3597-3625

Jevtić S. 1986. Posebno ratarstvo. Beograd, IRO Naučna knjiga: 415 str.

Kabala C., Singh B. R. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead and zinc in soil profiles in the vicinity of copper smelter. Journal of Environmental Quality, 30: 485-492

Karnachuk O. V., Kurochkina S. Y. and Tuovinen O. H. 2002. Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptors. Applied Microbiology and Biotechnology, 58: 482–486.

Köhlers Medizinal - Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen und kurz erläuterndem Texte.  
*Cannabis sativa (Cannabaceae)* Hanf. Gera, 1883-1914.  
[http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/6/6d/180px-Cannabis\\_sativa\\_Koehler\\_drawing.jpg](http://content.answers.com/main/content/wp/en/thumb/6/6d/180px-Cannabis_sativa_Koehler_drawing.jpg) (10. Avg. 2007)

Kos B. 2004. Inducirana fitoekstrakcija z *in situ* izpiranjem svinca iz onesnaženih tal. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 87 str.

Kos B., Leštan D. 2004. Soil washing Of Pb, Zn and Cd using biodegradable chelator and permeable barriers and induced phytoextraction by *Cannabis sativa*. Plant and Soil, 263: 43-51

Lazarini F., Brenčič J. 1989. Splošna in anorganska kemija, visokošolski učbenik. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 557 str.

Leštan D. 2000. Študijsko gradivo za dodiplomski študij ekopedologije. Leštan D. (ur). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za agronomijo (interni gradivo).

Leštan D. 2002a. Ekopedologija (ekologija in varstvo tal). Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 268 str.

Leštan D. 2002b. Vaje iz ekopedologije in project: Inducirana fitoekstrakcija / *in situ* izpiranje Pb in Zn iz onesnaženih tal. Delovno gradivo 2002/2003. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 55 str.

Leštan D. 2006. Enhanced heavy metal phytoextraction. V: Focus on biotechnology: Phytoremediation and rhizoremediation. Mackova M., Dowling D.L., Macek T. (ed.). Neatherland, Springer Dordrecht: 115-132

Leštan D., Kos B. 2002. Pranje s težkimi kovinami onesnaženih tal z uporabo biološko razgradljivih ligandov in horizontalnih prepustnih reaktivnih pregrad. Urad RS za intelektualno lastnino: patentna prijava št. 200200313

Leštan D., Grčman H., Kos B. 2001. Vaje iz ekopedologije: Inducirana fitoekstrakcija in nadzorovano izpiranje Pb iz onesnaženih tal. Delovno gradivo 2001/2002. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 12 str.

Mengel K., Kirkby E. A. 1987. Principles of plant nutrition. Worblaufen-Bern, International Potash Institute: 686 str.

Mulligan C. N., Young R. N., Gibbs B. F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated Soils and groundwater: an evaluation. Engeneering Geology, 60: 193-207

Nishikiori T., Okuyama A., Naganawa T., Takita T., Hamida M., Takeuchi T., Aoyagi T., Umezawa H. 1984. Production of actinomycetes of (S,S)-N,N'-ethylenediamine-dissuccinic acid, an inhibitor of phospholipase-C. *Journal of Antibiotics*, 37: 426-427

Oliver M. A. 1997. Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science*, 48: 573 – 592

Raskin I., Kumar P. B. A. N., Duschenkov S., Salt D.E. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 285-290

Rieuwerts J. S., Thornton I., Farago M. E., Ashmore M. R. 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10 (2): 61-75

Ross S. M. 1994. Toxic metals in soil plant system. New York, John Wiley and Sons: 469 str.

Ruby M. V., Schoof R., Brattin W., Goldade M., Post G., Harnois M., Mosby D. E., Casteel S. W., Berti W., Carpenter M., Edwards D., Cragin D., Chappell W. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*, 32: 3697-3705

Salt D. E., Blaylock M., Kumar P. B. A. N., Dushenkov V., Ensley B. D., Chet I., Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13: 468-474

Salt D. E., Smith R. D., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668

Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. V. 1988. *Analytical Chemistry*. New York, Chicago, San Francisco, Sunderes College Publishing: 894 str.

Stritar A. 1973. *Pedologija. Kompendij*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Agronomski oddelek: 115 str.

Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Ur. l. RS št. 68-3722/96

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

Zayed A., Gowthaman S. and Terry N. 1998 Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality.* 27, 715–721

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Domnu Leštanu za mentorstvo, vodenje in strokovno pomoč pri izvedbi diplomske naloge v celoti.

Dr. Boštjanu Kosu se zahvaljujem za vso pomoč tako pri praktični izvedbi poskusa kot pri izdelavi diplomskega dela. Za podporo in vse koristne nasvete se prav tako zahvaljujem Neži Finžgar in Darji Munda.

Še posebej se zahvaljujem staršem in Borutu za podporo, potrpežljivost in spodbudo v času študija.