

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina SAVŠEK

**BIOAKUMULACIJA Pb, Zn IN Cd V IZOPODNIH
RAKIH VRSTE *Porcellio scaber* KOT MERILO
USPEŠNOSTI REMEDIACIJE ONESNAŽENIH TAL S
STABILIZACIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina SAVŠEK

**BIOAKUMULACIJA Pb, Zn IN Cd V IZOPODNIH RAKIH VRSTE
Porcellio scaber KOT MERILO USPEŠNOSTI REMEDIACIJE
ONESNAŽENIH TAL S STABILIZACIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOACCUMULATION OF Pb, Zn AND Cd IN ISOPODS OF THE
SPECIES *Porcellio scaber* AS STANDARD OF SUCCESSFUL
REMEDICATION OF POLLUTED SOIL BY STABILISATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Centru za pedologijo in varstvo okolja (CPVO), Oddelka za agronomijo in na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške Fakultete, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija za dodiplomski študij biotehnologije je dne 26. januarja 2010 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA in somentorico doc. dr. Metko UDOVIČ.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Članica: doc. dr. Metka UDOVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Datum zagovora:

Diplomsko delo 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.

Katarina Savšek

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD Dn
DK UDK 631.453: 504.5: 546.471.49: 595.3(043.2)
KG onesnaženost tal/remediacija tal/stabilizacija tal/rdeče blato/apnenc/cink/kadmij/
svinec/*Porcellio scaber*/bioakumulacija
KK AGRIS T01/ P30
AV SAVŠEK, Katarina
SA LEŠTAN, Domen (mentor)/ UDOVIČ, Metka (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
LI 2010
IN BIOAKUMULACIJA Pb, Zn IN Cd V IZOPODNIH RAKIH VRSTE *Porcellio scaber* KOT MERILO USPEŠNOSTI REMEDIACIJE ONESNAŽENIH TAL S STABILIZACIJO
TD diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 32 str., 5 pregl., 4 sl., 41 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Preučevali smo tla iz kraja Arnoldstein (Koroška, Avstrija). Tla so močno onesnažena s cinkom, kadmijem in svincem zaradi industrije v bližini. Njihove koncentracije prestopajo meje dopustnih oziroma kritičnih vrednosti kovin v tleh, ki so določene v slovenski in avstrijski zakonodaji. Tla smo stabilizirali z apnencem in glinenimi minerali, da bi zmanjšali biološko dostopnost kovin v tleh. Učinkovitost remediacije oz. stabilizacije smo kemijsko ocenili z metodo določanja kovin rastlinam (DTPA test) in s frakcionacijo kovin s šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo ter biološko z akumulacijo kovin v testnem organizmu, enakonožnem kopenskem raku vrste *Porcellio scaber* Latr. S stabilizacijo z apnencem in glinenimi minerali je prišlo do povišanja pH vrednosti tal. Ekstrakcija z DTPA je pokazala zmanjšano biološko dostopnost kovin Zn, Cd in Pb za 66, 25 in 26% pri stabilizaciji z apnencem in za 80, 52 in 52% pri uspešnejši stabilizaciji z glinenimi minerali. Sekvenčna ekstrakcija je pokazala zmanjšanje deleža biološko dostopnih kovin, to sta predvsem frakciji vodotopnih in izmenljivih kovin, in povišanje deleža biološko nedostopnih kovin, ki so vezani na karbonate, Fe in Mn okside, organsko snov in preostale snovi. Akumulacija v organizmu *Porcellio scaber* je pokazala manjši privzem vseh treh preiskovanih kovin v stabiliziranih tleh z apnencem in glinenimi minerali v primerjavi z onesnaženimi tlemi. Akumulacija Cd je pokazala, da je stabilizacija z apnencem bolj uspešno zmanjšala privzem Cd oz. njegovo biološko dostopnost. Najmanjši privzem Pb je bil v z glinenimi minerali stabiliziranih tleh.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 631.453: 504.5: 549.471.49: 595.3(043.2)
CX soil pollution/soil remediation/soil stabilisation/red mud/limestone/zinc/cadmium/
lead/*Porcellio scaber*/bioaccumulation
CC AGRIS T01/ P30
AU SAVŠEK, Katarina
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)/ UDOVIČ, Metka (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty
PY 2010
TI BIOACCUMULATION OF Pb, Zn AND Cd IN ISOPODS OF THE SPECIES
Porcellio scaber AS STANDARD OF SUCCESSFUL REMEDIATION OF
POLLUTED SOIL BY STABILISATION
DT Graduation thesis (University Studies)
NO IX, 32 p., 5 tab., 4 fig., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We studied soil from Arnoldstein (Carinthia, Austria). The soil was heavily
polluted with zinc, cadmium and lead due to industry located nearby. The
concentrations of these metals exceed the limits of permissible/critical values in the
soil as stipulated by Slovenian and Austrian legislation. The soil was stabilised by
limestone and clay minerals in order to decrease their bioaccessibility in soil. The
effectiveness of remediation/stabilisation was chemically evaluated by
determination of potential metal uptake by plants (DTPA test) and by metal
fractionation via six-step sequential extraction and biologically evaluated by the
measurement of accumulation of metals in the test organism *Porcellio scaber* Latr.
The stabilisation with limestone and clay minerals resulted in an increased pH
value of the soil. DTPA extraction showed a decreased potential bioaccessibility of
Zn, Cd and Pb for 66, 25 and 26 percent, respectively, at stabilisation with
limestone and for 80, 52 and 52 percent, respectively, at more effective stabilisation
with clay minerals. Sequential extraction showed a decreased in share of
bioaccessible metals, especially fractions of water-soluble and exchangeable
metals, and an increased share of biologically inaccessible ones, which are bound
to carbonates, Fe and Mn oxides, organic matter and residual matter. The
accumulation in the *Porcellio scaber* showed a smaller ingestion of all three studied
metals from soil stabilised with limestone and clay minerals in comparison with
polluted soil. The accumulation of Cd showed that the stabilisation with limestone
was more successful in decreasing the ingestion of Cd i.e. its bioaccessibility. The
ingestion of Pb was smallest from the soil stabilised with clay minerals.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ONESNAŽENOST TAL	3
2.2 KOVINE V TLEH	3
2.2.1 Vpliv kovin na okolje	5
2.2.2 Cink	6
2.2.3 Kadmij	6
2.2.4 Svinec	6
2.3 KEMIJSKE METODE DOLOČANJA KOVIN	7
2.4 BIOINDIKATROJI IN BIOMARKERJI	8
2.4.1 Bioindikatorji	8
2.4.1.1 Bioindikatorji akumulacije	8
2.4.1.2 Bioindikatorji učinka	9
2.4.2 Biomarkerji	9
2.5 RAKI ENAKONOŽCI	10
2.5.1 Navadni prašiček, <i>Porcellio scaber</i> Latr.	11
2.5.1.1 Prebavni sistem	11
2.6 REMEDIACIJA TAL	12
2.6.1 Stabilizacija	13
2.6.1.1 Stabilizacija z apnencem	13
2.6.1.2 Stabilizacija z glinenimi minerali	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 NAČRT POIZKUSA	15
3.2 ANALIZA TAL	15
3.3 RAZKLOP Z ZLATOTOPKO	16
3.4 DOLOČITEV RASTLINAM DOSTOPNIH KOVIN	16
3.5 SEKVENČNA EKSTRAKCIJA KOVIN	17
3.6 VZORČENJE ŽIVALI	17
3.7 AKUMULACIJA KOVIN V ŽIVALIH	18
3.8 RAZKLOP ŽIVALI	18
3.9 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA	19
3.10 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	19

4	REZULTATI	20
4.1	ANALIZA TAL	20
4.2	ZLATOTOPKA	20
4.3	EKSTRAKCIJA Z DTPA	20
4.4	ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA	21
4.5	AKUMULACIJA KOVIN V ENAKONOŽNIH RAKIH <i>PORCELLIO SCABER</i>	22
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1	RAZPRAVA	25
5.1.1	Stabilizacija tal	25
5.1.2	Akumulacija Zn, Cd in Pb v <i>P. scaber</i>	26
5.1.3	Primerjava metod	26
5.2	SKLEPI	27
6	POVZETEK	28
7	VIRI	29
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za nekatere kovine v tleh v slovenski zakonodaji (Uredba ..., 1996) in dopustne mejne vrednosti kovin za tla v avstrijski (dežela: Koroška) zakonodaji (Zülassige ..., 2003).	5
Preglednica 2: Standardne pedološke značilnosti onesnaženih in stabiliziranih tal.	20
Preglednica 3: Celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.	20
Preglednica 4: Rastlinam dostopne koncentracije Zn, Cd in Pb določene z DTPA ekstrakcijskim testom v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.	21
Preglednica 5: Frakcionacija (%) Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo kvantifikacije.	22

KAZALO SLIK

- Slika 1: navadni prašiček (*Porcellio scaber* Latr.) 11
- Slika 2: Koncentracije Zn v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Zn v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onasnažena tla, CA- tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali 23
- Slika 3: Koncentracije Cd v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Cd v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onasnažena tla, CA- tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali 24
- Slika 4: Koncentracije Pb v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Pb v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onasnažena tla, CA- tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali 24

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektroskopija
BAF	bioakumulacijski faktor
CA	oznaka za tla stabilizirana z apnencem
CEC	kationska izmenjevalna kapaciteta
DTPA	dietilen triamin pentaocentna kislina
GC	oznaka za glineni material
K_{OW}	porazdelitveni koeficient
ON	oznaka za onesnažena tla iz Arnoldsteina (Koroška, Avstrija)
RM	oznaka za tla stabilizirana z glinenimi minerali
S/S	solidifikacijska/stabilizacijska metoda

1 UVOD

Tla so stična točka med litosfero, hidrosfero in atmosfero. Zaradi počasnega nastajanja predstavljajo neobnovljiv naravni vir, ki je neobhodno potreben za obstoj človeka. Funkcije tal v okolju so številne; tla služijo za pridelavo biomase, kot filter za vodo, nudijo prostor in hrano za številne organizme, so vir surovin in shranjujejo mnogo antropogenih (arheoloških) in naravnih (fosilnih) ostankov. Tla so izpostavljena številnim procesom degradacije in drugim nevarnostim, ki izvirajo iz naravnih ali antropogenih dejavnikov (Zupan in sod., 2008).

Koncentracija onesnažil v zraku in vodah se zmanjšuje, v tleh pa se številna onesnažila akumulirajo. Onesnaženje tal s potencilano strupenimi kovinami predstavlja velik okoljski problem. V tleh so anorganska onesnažila prisotna naravno in pa kot posledica človekove dejavnosti. Antropogeni viri onesnaženja s kovinami so rudarjenje, talilništvo, industrija, atmosferski depozit, kmetijstvo, odlaganje odpadkov ipd. (Leštan, 2002a).

V Sloveniji tla večinoma niso močno onesnažena, razen na območjih, kjer je bila v preteklosti ali je še danes prisotna rudniško topilniška dejavnost (Zupan in sod., 2008). Ocenjevanje onesnaženosti tal v Sloveniji temelji na določanju celokupne koncentracije onesnažil v tleh za vse vrste rabe tal (Uredba ..., 1996). V Avstriji je ocenjevanje onesnaženosti razdeljeno po posameznih deželah, kjer določajo dopustne mejne vrednosti za tla (Zulassige ..., 2003). Celokupna koncentracija kovin v tleh nam pove zelo malo o biološko dostopnem deležu kovin za organizme. Za določitev tveganja izpostavljenosti onesnažilom za organizme (tudi za človeka) je nujna ocena biodostopnosti onesnažil v tleh. Za določanje biodostopnosti onesnažil v tleh lahko uporabimo kemijske ekstrakcijske teste ali testne organizme. Kemijski testi namreč ne morejo popolnoma simulirati kompleksnosti živega organizma, zato nam ne podajo celotne informacije o biološki dostopnosti kovin (Udovič, 2009).

Strupenost posameznega onesnažila na organizem je odvisna od trajanja izpostavitve, količine zaužitega onesnažila in mehanizma, ki preprečuje strupene učinke. Do večjih posledic pri izpostavljenosti strupenim kovinam lahko pride pri daljši (kronični) izpostavitvi, kjer lahko pride do nastanka hude bolezni. Onesnažena tla s potencialno strupenimi kovinami je zato potrebno očistiti (Leštan, 2002a).

Na podlagi koncentracije akumuliranih kovin v organizme lahko sklepamo o biološki dosegljivosti kovin v onesnaženih tleh. Poznamo kemijske metode (ekstrakcija z DTPA), ki nam pomagajo pri določitvi biodostopnosti kovin in ostalih mikronutrientov za rastline (Udovič, 2009). Akumulacijo kovin pa lahko izvajamo tudi v testnih živalih. Za študije akumulacije kovin se uporabljajo nevretenčarji (Hopkin, 1989). Najprimernejši testni organizmi med njimi pa so kopenski izopodi zaradi zmožnosti akumulacije visokih koncentracij kovin v telo (Drobne, 1997).

1.1 NAMEN IN HIPOTEZA

Namen naloge je na podlagi akumulacije Pb, Zn in Cd v izopodih vrste *Porcellio scaber* Latr. ovrednotiti uspešnost remediacije s kovinami onesnaženih tal s postopkom stabilizacije.

Z dodajanjem stabilizacijskih dodatkov (apnenec, glineni minerali) v onesnažena tla znižamo biološko dosegljivost kovin brez spreminjanja celokupne koncentracije kovin in s tem zmanjšamo potencialno tveganje, ki ga taka tla predstavljajo za okolje. Akumulacija kovin v izopodnih rakih vrste *Porcellio scaber* je učinkovito merilo biološke dostopnosti kovin v tleh, na podlagi katerega lahko sklepamo o uspešnosti remediacije tal.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽENOST TAL

Tla so površinski del litosfere, ki ga sestavljajo mineralne in organske snovi, voda, zrak in organizmi (Uredba ... 1996). Nastajajo s preperevanjem kamninske osnove in s tvorbo humusa ob razgradnji organskih ostankov v tleh. V spodnjih plasteh tal prevladujejo mineralne komponente, ki v geokemični sestavi odražajo izvorno kamninsko osnovo. V zgornjih plasteh je mineralni osnovi primešana organska snov, ki daje tlem temnejšo barvo in potencial za mikrobiološko aktivnost (Zupan in sod., 2008). Tla ljudje uporabljamo za pridelavo hrane, pridobivanje industrijskih surovin in pridobivanje energetskih virov. Tla so naravni vir, naravna vrednota, ki jo je treba varovati kot naravno dediščino, saj so za obstoj in razvoj človeštva nenadomestljiva (MOP, 2001). Tla je potrebno varovati in to v Sloveniji ureja Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (1996), na Koroškem (Avstrija) to ureja deželni zakon (Zulassige ..., 2003). Gospodarjenje s tlemi mora zagotoviti ohranjanje naravnih značilnosti tal in omogočiti ustrežno raven kakovosti življenja človeka (MOP, 2001).

Nekateri kemijski elementi in spojine so naravni del tal in posledica pedogenetskih procesov. Kemizacija okolja se zaradi človekove dejavnosti odraža v večji pestrosti in višji vsebnosti kemikalij v tleh. V tleh se številna onesnažila akumulirajo. Onesnažila pridejo v tla po zraku (industrijske in urbane emisije), z odlaganjem odpadkov, uporabo fitofarmaceutskih sredstev in mineralnih gnojil v kmetijstvu, pa tudi z nenadnimi izlivami in izpusti kemikalij, ki so posledica nesreč. Onesnažila so lahko anorganska in organska (Leštan, 2002a).

Anorganska onesnažila so v tleh prisotna naravno ali pa kot posledica človekove dejavnosti. Naravna prisotnost kovin je odvisna od matične podlage. Onesnaženje je lahko razpršeno, točkovno ali linijsko. Anorganska onesnažila se nabirajo na organskih in mineralnih delcih ali pa so v tleh prisotna v obliki soli (sulfidi, karbonati, hidroksidi, fosfati itd.). Med anorganskimi onesnažili največkrat zasledimo kovine, kot so svinec (Pb), cink (Zn), baker (Cu), nikelj, kadmij (Cd), živo srebro, krom, pa tudi druge elemente, nekovine, kot so arzen, selen in azbest (Leštan, 2002a).

2.2 KOVINE V TLEH

Kovine so v tleh prisotne v različnih oblikah, v prostih ionskih oblikah ali vezane na različne trdne faze tal. Distribucijo kovin v tleh imenujemo frakcionacija. Biološko so kovine najbolj dostopne v ionski obliki v talni raztopini in adsorbirane na kationskih izmenjalnih mestih na talnih koloidih. Biološko najmanj dosegljive so kovine v trdnih oblikah, kjer so lahko vključene v kristalne rešetke glinenih materialov, vezane na železove in manganove okside in izoborjene, izoborjene v obliki karbonatov, sulfatov ali fosfatov ter vezane na netopno organsko snov v tleh. Frakcionacija kovin je odvisna od vira kovin in vrst reakcij, kot so ionska izmenjava, specifična adsorpcija, penetracija v kristalno

strukturo alumosilikatnih glinenih mineralov, raztapljanje in obarjanje, tvorjenje koordinacijskih spojin (kompleksacija) ter biološka stabilizacija (mobilizacija in imobilizacija). Prehajanje kovin iz ene kemijske oblike v drugo oziroma iz trdne v tekočo fazo je odvisna od lastnosti tal, to je pH, redoks potencial, delež gline v tleh, delež železovih in manganovih oksidov ter prisotnost ostalih kationov in anionov v talni raztopini (Leštan, 2002a)

Globalno gledano pride največ kovin v okolje iz ozračja, od koder pridejo na zemljo kot prašni delci npr. vulkanskega ali industrijskega izvora (Hopkin, 1989). Kovine, kot so npr. Zn, Cu, Ni in Cd, lahko ostanejo več tisoč let v tleh (Cvetko, 2008), kjer se vežejo na organsko in anorgansko snov tal. Le majhen delež kovin je prisoten v prosti (ionski) obliki, ki lahko vpliva na talne organizme (Leštan, 2002a). Eden izmed resnih problemov previsoke koncentracije kovin v tleh je izpostavljenost ljudi in ekosistema, kar ima lahko dolgoročne posledice (Dallinger in sod., 1992). Prisotnost kovin lahko zmanjša rodovitnost zemlje in produktivnost agrokultur (Cvetko, 2008).

Prisotnost kovin v tleh upočasni razgradnjo organske snovi v tleh, posebno razgradnjo težje razgradljivih komponent rastlinske biomase, kot je lignin in druge večje molekule. Zaradi razgradnje in mineralizacije organskih snovi v tleh prihaja do višje specifične respiracije, ki je definirana kot razmerje med CO_2 , ki se sprošča zaradi razgradnje in mineralizacije organskih snovi v tleh, in celotno mikrobno biomaso. V tleh so prisotni encimi, ki depolimerizirajo organske makromolekule v rastlinskih organskih ostankih in so nasplošno ključnega pomena pri procesih v tleh. Kovine lahko delujejo kot inhibitorji talnih encimov. Na primer Cd, Zn, Cu v koncentracijah 50 – 500 mg kg^{-1} inhibirajo sintezo amilaze, celulaze in ureaze (Leštan, 2002a).

Za učinkovanje strupenih snovi, kot so to pri nas kovine, je potreben njihov vstop v organizem, kar imenujemo absorpcija. Ta je odvisna od vodotopnosti, topnosti v lipidih in od velikosti delcev strupenih snovi. Na prehod strupenih snovi preko celičnih membran v organizmu vplivajo njihove fizikalno-kemijske lastnosti, kot so ionizacija, molekularna teža, lipofilnost in koncentracija. pH talne raztopine vpliva npr. na naboj, ionizacijo in hidratacijski ovoj molekul spojin. Disociirane molekule v ionski obliki niso prehodne. Manjše molekule so bolj prehodne. Na akumulacijo v lipofilnih tkivih vpliva porazdelitveni koeficient – K_{ow} : kjer je večji K_{ow} , je snov bolj lipofilna, kar pomeni, da lahko večji delež snovi vstopi iz okolja v organizem. Koncentracija snovi vpliva na njen koncentracijski gradient in ko je ta večji, je večji tudi pretok snovi skozi membrano. Redoks potencial in pH tal pomembno vplivata na kemijsko obliko onesnažil in fazo tal, v kateri se onesnažilo nahaja, na sorpcijo onesnažil, na adsorpcijski kompleks tal, na topnost onesnažil in na tvorbo koordinacijskih spojin (Leštan, 2002a).

Na količino asimiliranih kovin v nevretenčarjih v talnem ekosistemu vplivata dva dejavnika. Prvi je koncentracija razpoložljivih kovin v prehrani in drugi je fiziološki mehanizem prevzemanja in izločanja elementov. Za primarne konzumente je stopnja

asimilacije odvisna od koncentracije in kemijske oblike kovine v živem ali mrtvem rastlinskem materialu, s katerim se hranijo. Za sekundarne konzumente je stopnja asimilacije odvisna od razpoložljivosti kovin v vrstah primarnih konzumentov, ki so njihova prehrana (Hopkin, 1989).

2.2.1 Vpliv kovin na okolje

Strupenost kemikalij se pri talnih organizmih odraža v spremembah smrtnosti, rasti, številčnosti in biomasi, številčnosti zaroda, reprodukciji, obnašanju, preživetju, privzemu hrane, reproduktivnem vedenju (Drobne, 1997). Pri tem ni pomembna samo koncentracija, kateri so izpostavljeni, vendar tudi čas izpostavljenosti (Dallinger in sod., 1992). V Republiki Sloveniji velja Uredba, ki določa mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za posamezne nevarne snovi v tleh (1996). Imisija snovi v tleh je gostota posamezne nevarne snovi v tleh in se izraža v miligramih ali mikrogramih na kilogram mase suhih tal. Mejna imisijska vrednost (v nadaljnjem besedilu: mejna vrednost) je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni takšno obremenitev tal, da se zagotavljajo življenjske razmere za rastline in živali, in pri kateri se ne poslabšuje kakovost podtalnice ter rodovitnost tal. Pri tej vrednosti so učinki ali vplivi na zdravje človeka ali okolje še sprejemljivi. Opozorilna imisijska vrednost (v nadaljnjem besedilu: opozorilna vrednost) je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni pri določenih vrstah rabe tal verjetnost škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali okolje. Kritična imisijska vrednost (v nadaljnjem besedilu: kritična vrednost) je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, pri kateri zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na človeka in okolje onesnažena tla niso primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode (Uredba ... 1996). V Avstiji je zakonodaja razdeljena po deželah. Za potrebe te raziskave smo upoštevali zakonodajo za deželo Koroško (Zulassige ..., 2003).

Preglednica 1: Meje, opozorilne in kritične imisijske vrednosti za nekatere kovine v tleh v slovenski zakonodaji (Uredba ..., 1996) in dopustne mejne vrednosti kovin za tla v avstrijski (dežela: Koroška) zakonodaji (Zulassige ..., 2003).

Kovine, ekstrahirane z zlatotopko (Slovenska zakonodaja)	Mejna vrednost (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Opozorilna vrednost (mg kg ⁻¹ suhih tal)	Kritična vrednost (mg kg ⁻¹ suhih tal)
Zn in njegove spojine	200	300	720
Cd in njegove spojine	1	2	12
Pb in njegove spojine	85	100	530
Kovine (Avstrijska zakonodaja)	Dopustne mejne vrednosti za tla (mg kg ⁻¹)		
	5<pH<5,5	5,5<pH<6,5	pH>6,5
Zn	100	150	200
Cd	0,5	1	1,5
Pb	50	70	100

2.2.2 Cink

Zn je za organizme esencialen element, prisoten je v številnih encimih, ki sodelujejo v metabolnih poteh, na primer pri sintezi in razgradnji ogljikovih hidratov, lipidov, proteinov ter nukleinskih kislin. V tleh je dosegljivost Zn obratno sorazmerna s pH reakcijo tal. Glina, organska snov tal in seksvioksidi vežejo Zn v trdno fazo tal (Leštan, 2002a). Antropogeni izvori Zn so rudarjenje in talilništvo, industrija tekstila, mikroelektronike in metalurgije ter odlaganje odpadkov in blat čistilnih naprav. Zn se pogosto pojavlja v tleh v povečanih količinah, vendar je obenem tudi mikrohranilo, ki je nujno potrebno v določenih koncentracijah za rast in razvoj rastlin, pa tudi živali in človeka. V Sloveniji je mejna imisijska vrednost presežena v 4 % površinskih in 2 % podpovršinskih vzorcih (Zupan in sod., 2008).

P. scaber vsebuje Zn kot sestavni del več kot 200 metaloencimov in drugih metaboličnih komponent (Bibič in sod., 1997). Zn se akumulira v hepatopankreasu, manjši del pa tudi v črevesju (Dallinger, 1993).

2.2.3 Kadmij

Cd je kovina, ki se akumulira v zgornjih plasteh tal, kjer se veže predvsem na seksvioksidge. Pri nižjih pH vrednostih preide iz trdne faze tal v talno raztopino, kjer je dostopen organizmu. Lahko pride tudi do izpiranja Cd iz tal v podtalnico (Leštan, 2002a). Antropogeni izvor Cd je rudniška in topilniška dejavnost, kovinska industrija, industrija plastike in mikroelektronike, izgorevanje fosilnih goriv, mineralna gnojila in odlaganje odpadkov (Zupan in sod., 2008), avtomobilski promet, sežiganje odpadkov in fosilnih virov energije. Ti vplivi na urbano okolje imajo nato vpliv na človeka in njegovo zdravje ter na ekosistem (Dallinger in sod., 1992).

Pri *P. scaber* se 55 – 80 % asimilirane Cd nahaja v hepatopankreasu. Cd se deponira v lizosome v hepatopankreasu, najdemo pa ga tudi v citosolu vezanega na citosolne komponente (metalotionini, glikoproteini). V neonesnaženem okolju se količina Cd stalno povečuje v organizmu, vendar ga je organizem v glavnem sposoben tudi odstraniti. Cd se iz lizosomov ne more izločiti. Bolj mobilni je Cd v citosolu, od koder se lahko izloči iz organizma (Dallinger, 1993).

2.2.4 Svinec

Pb je poleg Zn in Cd med najpogostejšimi onesnažili v tleh. Pb se močno veže na adsorpcijski kompleks tal tako, da ostaja v glavnem v vrhnjih slojih tal. Pb ni ali ga je zelo malo v talni raztopini, razen v kislih tleh, kjer je dosegljivost Pb večja. Pb ni esencialen element (Leštan, 2002a). Antropogeni izvori Pb so rudarjenje in talilništvo, rafinerije, atmosferski depoziti (sežigalnice, fosilna goriva in promet) in odlaganje odpadkov. V preteklosti se je Pb vnašal v okolje tudi z uporabo fitofarmaceutskih pripravkov v

kmetijstvo (Zupan in sod., 2008). Kontaminacija s Pb je povečana na območjih s cestami z visoko prometno gostoto in upada z oddaljenostjo od centra mesta, saj se je v preteklosti dodajalo Pb gorivu. Njegova uporaba se v Evropi zmanjšuje (Dallinger in sod., 1992).

V neonesnaženem in onesnaženem okolju se v *P. scaber* akumulira 70 – 80 % Pb v hepatopankreasu, najdemo ga pa tudi v črevesju. Če v okolju ni Pb, se v organizmu njegova koncentracija začne zmanjševati. Obstajata mobilna in neaktivna oblika (skladiščenje v lizosomih) Pb v organizmu (Dallinger, 1993).

2.3 KEMIJSKE METODE DOLOČANJA KOVIN

Kovine so v tleh prisotne v različnih kemijskih oblikah in vezane na različne talne frakcije z različno topnostjo ter so redko 100 % dostopne organizmom. Frakcionacijo kovin določamo s selektivnimi sekvenčnimi ekstrakcijami, kjer v več zaporednih stopnjah izpostavimo tla vedno močnejšim reagentom (ekstraktom) (Udovič, 2009). Frakcionacijo kovin (modificirana po Tessier-u) ponazorimo s šestimi zaporednimi ekstrakcijami (sekvencami) (Leštan in sod., 2003):

- I. vodotopna frakcija
- II. izmenljiva frakcija
- III. frakcija, vezana na karbonate
- IV. frakcija, vezana na železove in manganove okside
- V. frakcija, vezana na organsko snov
- VI. preostanek, ki se običajno nahaja, vezan na silikate in sulfate

Frakcionacija kovin v tleh je odvisna od kemijskih lastnosti kovine in od naslednjih vrst reakcij v tleh (Leštan in sod., 2003):

- adsorpcije in desorpcije, ki vplivata na nastanek vezi in kelatnih kompleksov ter na ionsko izmenjavo;
- obarjanja kovin iz talne raztopine v fosfatni, karbonatni, sulfatni ali hidroksidni obliki. Na obarjanje vpliva pH raztopine, v kislih tleh je obarjanje manjše;
- prodiranja kovin v kristalno strukturo alumosilikatnih glinenih mineralov, kjer pride do izomorfne izmenjeve s silicijem in aluminijem, in od
- biološke stabilizacije kovin.

Te reakcije vplivajo na prehajanje kovin med frakcijami in so odvisne od številnih lastnosti tal, kot so: pH, tekstura tal, vsebnost organske snovi, vsebnost in tip glinenih mineralov ter aluminijevih, železovih in manganovih oksidov, prevladujoče fizikalno-kemijske razmere v tleh ter mineralogija kovin (Leštan in sod., 2003).

Brez poznavanja frakcionacije kovin se ni možno utemeljeno odločiti o primernosti rabe s kovinami onesnaženih tal oziroma o njihovi sanaciji (Leštan, 2002a).

Najšibkeje vezani in s tem organizmom najlažje dostopni sta prvi dve frakciji. Biološko dostopna koncentracija se nanaša na tisti delež oz. frakcijo celokupne koncentracije kovin,

ki jo organizem lahko privzame oz. ki ima vpliv na biološki material. Rastline preko koreninskega sistema črpajo kovinske ione iz talne ratopine. Na podlagi koncentracije akumuliranih kovin v rastlinskih tkivih lahko do določene mere sklepamo tudi o izpostavljenosti lokalnega prebivalstva kovinam. Ekstrakcija z dietilentriamin pentaocentno kislino (DTPA) je zelo razširjena enostopenjska ekstrakcija za določanje biodostopnosti strupenih kovin in ostalih mikronutrientov za rastline. Vendar kemijski ekstrakcijski testi ne morejo popolnoma simulirati kompleksnosti živega organizma, zato nam kemijske selektivne ekstrakcije ne nudijo celotne informacije o biološki dostopnosti kovin. V ta namen so primernejši *in vivo* testi z organizmi (Udovič, 2009).

2.4 BIOINDIKATROJI IN BIOMARKERJI

2.4.1 Bioindikatorji

Za ocenjevanje dosegljivosti kovin v tleh se uporabljajo nekatere rastlinske in živalske vrste. Ti organizmi akumulirajo kovine sorazmerno s koncentracijo kovin v okolju in tako jih lahko uporabljamo kot bioindikatorje za s kovinami onesnaženo okolje (Udovič in sod., 2009). Za uporabo živali kot testnih organizmov je pomembno, da živali ustrezajo določenim kriterijem, kot so velikost, številčnost, enostavna identifikacija in enostavno določanje starosti (Drobne, 1997).

Bioindikatorji so organizmi, ki dajo na onesnažila merljiv biološki odziv, ki odraža tudi spremembe v kakovosti in funkcioniranju tal. Bioindikatorji naj bi bili zato ključni organizmi, ki imajo pomembno vlogo pri funkcioniranju talnih ekosistemov (Leštan, 2002a). Zanje je značilno, da (Cortet in sod., 1999):

- naj bi imeli pomembno vlogo pri funkcioniranju talnih ekosistemov,
- naj bi bili običajni in prisotni v vseh tipih tal ter naj bi jih bilo enostavno vzorčiti,
- naj bi bili bioindikatorski organizmi dovolj robustni, da preživijo koncentracije strupenih spojin, ki se pojavljajo v okolju, in
- naj bi bili biološki odzivi bioindikatorjev na različne koncentracije strupenih snovi merljivi, na primer motnje v rasti ali plodnosti. Odziv naj bi bil ponovljiv, se pravi podoben na enake koncentracije strupene snovi.

Bioindikatorje delimo na bioindikatorje akumulacije in bioindikatorje učinka (Cortet in sod., 1999).

2.4.1.1 Bioindikatorji akumulacije

Pri bioakumulaciji onesnažilo iz okolja preide v organizem, kjer se skladišči na različne načine. Ni direktne povezave med biokoncentracijo onesnažila in intoksikacijo. Za primerjavo podatkov o biološki dosegljivosti, ki so dobljeni v tleh z različnimi koncentracijami onesnažila oziroma za primerjavo bioakumulacije onesnažila pri različnih pogojih v tleh ter primerjavo sposobnosti različnih organizmov za akumulacijo onesnažila, pogosto uporabljajo faktor bioakumulacije (BAF):

$$\text{BAF} = \frac{\text{koncentracija onesnažila v bioindikatorju}}{\text{koncentracija onesnažila v okolju}} \dots (1)$$

Faktorji bioakumulacije so predvsem uporabni za vodne bioindikatorje. Tla so močno heterogena, kar vpliva na biološko dosegljivost onesnažil in s tem na BAF. Biološka dosegljivost kovin je na primer odvisna od njihove speciacije v tleh, ta pa je odvisna od lastnosti kovine, sestave tal in fizikalno-kemijskih pogojev v tleh (Cortet in sod., 1999).

2.4.1.2 Bioindikatorji učinka

Bioindikatorji učinka dajejo podatke o odzivu na izpostavljenost onesnažilom (Cortet in sod., 1999). Bioindikatorje učinka ločimo na toksikološke in ekološke bioindikatorje učinka onesnažil. Za primerne toksikološke bioindikatorje je značilno, da (Leštan, 2002a):

- obstaja tesna povezava med koncentracijo onesnažila in odzivom indikatorskega organizma, in
- da omogočajo zgodnje opozarjanje na onesnaženje, ko so učinki onesnaženja še reverzibilni.

2.4.2 Biomarkerji

Biomarkerji so merljivi individualni biološki odzivi: biokemični, molekularni, fiziološki ali genetski, na onesnažila in druge strupene količine. Biomarkerji so bioindikatorji učinka, z njimi merimo učinkovite koncentracije strupenih spojin ter izpostavljenost, odzive in občutljivost organizmov (Leštan, 2002a).

Biomarkerji imajo naslednje lastnosti (Leštan, 2002a):

- obstajati mora jasna in nedvoumna zveza med koncentracijo strupene snovi v okolju ali v gostiteljskem organizmu, kjer se biomarker nahaja in kvantitativnim ali kvalitativnim odzivom biomarkerja,
- biomarker mora imeti znano in primerno specifičnost in občutljivost na strupeno spojino,
- odziv biomarkerja mora biti ponovljiv. Trajanje odziva mora biti znano, in
- biomarker mora biti običajen za člane populacije gostiteljskega organizma. Variabilnost odziva biomarkerja znotraj populacije gostiteljskega organizma mora biti določena.

Primeri biomarkerjev so stresni in metalo proteini v celicah organizmov, citološke spremembe v celicah, encim acetilholin-esteraza (Leštan, 2002a).

2.5 RAKI ENAKONOŽCI

Kopenske rake enakonožce (izopodni raki) uvršamo v podred kočičev (Oniscoidea). Izopodi so se preselili na kopno pred 400 milijoni let (Hopkin, 1989). Telo je podolgovato ovalno in hrbtnotrebušno sploščeno. Telo sestavljajo tri regije: glava, oprsje in zadek. Na glavi sta dva para tipalnic, ustni aparat je grizalo. Oprsje je sestavljeno iz sedmih, med seboj gibljivo povezanih segmentov, ki so sestavljeni iz hrbtnih (tergitov) in trebušnih (sternitov) ploščic. Obstransko se tergit podaljšuje v stranske krpe (epimere). Na sternitih je na trebušni strani (ventralno) po en par nog hodilk. Na prvem paru nog, pogosto na končnih členkih, je namreč tako imenovani »čistilni aparat«, 7. par pa je pri samcih pogosto izoblikovan kot pomožni organ za kopulacijo. Zadek sestavlja pet členov, ki med seboj niso trdno zrasli. Na vsakem je po en par zadkovih nožic (pleopodov). »Rep« ali končni člen (telson), ki je pravzaprav 6. člen zadka, je običajno trikotne oblike, na njem je en par »repnih« nožic (uropodov) (Mršič, 1997).

Srce se nahaja v zadku. Kočiči dihajo s škrgami, ki so na pleopodih (Mršič, 1997). Ker živijo na kopnem, je potrebno, da imajo stalno zagotovljeno vlaženje škrg in preprečiti je potrebno izsuševanje telesa (Sket, 2003). Izločalo je večja spodnječeljustna (maksilarna) žleza. Kočiči so ločenih spolov, z izrazitim spolnim dimorfizmom. Oploditev je notranja (Mršič, 1997). Življenjski cikel večine kopenskih izopodov je relativno dolg, pogosto več kot 6 do 8 mesecev (Drobne, 1997).

Raki enakonožci so kopenske živali, ki se zadržujejo v habitatih z višjo talno, predvsem pa stalno visoko zračno vlago. Zadržujejo se predvsem na apnencih ali dolomitih, le redke vrste uspevajo na podlagi brez kalcija. Prehranjujejo se z odmrlo organsko snovjo, predvsem rastlinskega izvora. Živijo v gozdni stelji, trhlem lesu, pod skorjo, v panjih, pod kamni, v kletah itd. Največ vrst se nahaja v vlažnih listnatih in mešanih gozdovih, manj pa v iglastih (Mršič, 1997).

Enakonožci so pomemben člen v procesu nastajanja humusa. Pomembni so pri mehanskem drobljenju rastlinskih ostankov, ker s tem povečujejo aktivno površino delcev in lajšajo dostop bakterijam in glivam, ki razgrajujejo organske snovi. Ne prebavljajo celuloze in lignina (Mršič, 1997). Pri prehrani si lahko izberejo različno kontaminirano hrano ali pa se selijo na različne lokacije (Drobne, 1997).

Izopodi se navadno hitro odzovejo na kontaminacijo okolja s kovinami in vplivajo na naraščanje smrtnosti, izgubo biomase in upadanje števila vrst. Izopodi lahko akumulirajo velike količine kovin, predvsem Cu, ostale kovine, kot so Zn, Pb in Cd pa akumulirajo v veziklih, kot so lizosomi. Izopodi tolerirajo visoke koncentracije akumuliranih kovin v hepatopankreasu in se lahko uporabljajo kot bioindikatorji (Paoletti in Hassall, 1999). Na območju industrijskega onesnaženja ali drugih virov onesnaženja je dobro dokumentirano zmanjšanje števila in raznolikosti kopenskih nevretenčarjev (Hopkin, 1989).



Slika 1: navadni prašiček (*Porcellio scaber* Latr.)

2.5.1 Navadni prašiček, *Porcellio scaber* Latr.

Porcellio scaber Latr. spada v rod *Porcellio*, družino Porcellionidae. Slovensko ime zanj je navadni ali kletni prašiček. Pogosto ga najdemo v kletih, a tudi zunaj. Je temnosiv ali temnosivo marogast in zelo hrapav po hrbtu. (Sket, 2003).

Kraljestvo: Animalia
Deblo: Arthropoda (členonožci)
Razred: Malacostraca (višji raki)
Red: Isopoda (enakonožci)
Družina: Porcellionidae
Rod: *Porcellio*
Vrsta: *Porcellio scaber*

2.5.1.1 Prebavni sistem

Kopenski nevretenčaji so morali prilagoditi svoj prebavni in izločevalni sistem za svoj obstoj na kopnem. Hrano poje le, če je informacija, ki jo posredujejo receptorji pravilna. Receptorji so občutljivi na okus, vonj, vsebnost vlage, teksturo in/ali vizualni izgled. Fiziološki mehanizem je razvit, ki lahko regulira koncentracijo esencialnih in neesencialnih kovin v tkivih. Količino privzete hrane narekuje koncentracija najbolj omejujočega esencialnega nutrienta v prehrani. Razmerje različnih kovin v hrani je prav tako pomembno. Razvit je mehanizem, ki lahko regulira koncentracijo esencialnih in neesencialnih kovin v tkivih (Hopkin, 1989).

Epitelij črevesa je prevzel skoraj popolno odgovornost za izmenjavo kovin z okoljem. Epitelij prebavnega sistema je po navadi le iz ene plasti celic in predstavlja prepreko med notranjim okoljem živali in hrano v črevesju. Črevo pri izopodih je sestavljeno iz sprednjega črevesa, ki žveči, filtrira in sortira hrano, zadnjega črevesa, ki je diferenciran v

srednji prekat, papilnato regijo in rektum (danka), in srednjega črevesa, ki ga predstavljajo štiri slepo končani tubuli, ki skupaj tvorijo hepatopankreas (Hopkin, 1989).

Izopodi se prehranjujejo v glavnem z odpadnim listjem. Njihovo črevo sestavljajo enoslojne membrane iz lipidnega dvosloja. Kovine lahko prehajajo membrano kot ioni skozi kanalčke ali preko pinocitotskih veziklov. Stopnja asimilacije kovin v izopode iz vira hrane je odvisna od topnosti elementa v prebavni tekočini, koliko kovine je žival zaužila ter relativni privzem teh v hepatopankreas in srednje črevo (Hopkin, 1989).

Ko izopod zaužije hrano, se ta v sprednjem črevesu filtrira, naprej gre samo tekočina in v njej raztopljeni snovi. Sledi transport čez membrane do hepatopankreasa, ki izloča prebavne encime v hrano. Tekočina, ki vsebuje kovine, ki so se sprostili v raztopino s prebavnimi encimi, gre skozi filtre v hepatopankreas, kjer poteka absorpcija (Hopkin, 1989).

Hepatopankreas je najbolj pomemben skladiščni organ za Zn, Cd, Pb in Cu. Ta organ predstavlja samo 5 % suhe teže živali, vendar vsebuje več kot 75 % Zn, 95 % Cd, 80 % Pb in 85 % Cu v celem organizmu izopoda. Hepatopankreas je sestavljen iz štirih slepo končanih tubulov. Epitelij je tu sestavljen iz dveh tipov celic, B- in S-celic. B-celice vsebujejo velike količine glikogena in lipidov. Znanstveniki predvidevajo, da so B-celice vpletene v sekrecijo prebavnih encimov in skladiščenje hrane. Glavna funkcija S-celic je skladiščenje kovin v obliki granul (Hopkin, 1989).

2.6 REMEDIACIJA TAL

Kovine in drugi elementi v tleh ostajajo večinoma vezani na trdno fazo tal. Močno onesnažena tla so mrtva in izgubijo samoočiščevalno sposobnost. Takšna tla so nevarna za okolje in jih je potrebno očistiti. Dovoljene vrednosti onesnažil za tla namenjena določeni rabi predpisuje zakonodaja, od katere je odvisna odločitev o čiščenju oziroma remediaciji tal. Na to odločitev vplivajo tudi sociološki vidiki, odziv javnosti na nevarnost, ki jo predstavlja onesnaženje in pa razpoložljivost finančnih sredstev. Izbira metode remediacije je odvisna od zahtevane stopnje očiščenja tal, ki jo določata zakonodaja in raba tal (Leštan, 2002a).

Čiščenje tal lahko poteka na mestu onesnaženja (in situ) ali pa onesnažena tla izkopljemo in šele na to začnemo s postopki čiščenja (ex situ). Ceneje je čiščenje tal na mestu onesnaženja, vendar je čas čiščenja po navadi daljši. Pri remediaciji onesnaženih tal uporabljamo fizikalno-kemijske in biološke metode. Poznamo tri osnovne načine odprave onesnaženja (Leštan, 2002a):

- uničenje ali kemijska sprememba molekularne strukture onesnažila v neškodljivo obliko,
- ekstrakcija ali odstranitev onesnažila iz okolja, kar lahko dosežemo z najosnovnejšo metodo – izkop in deponiranje na odlagališčih. Danes pa se uporabljajo metode, ki

temeljijo na izpiranju tal s topili, ekstrakciji hlapov onesnažil, termični desorpciji onesnažil iz tal in termičnem uničenju – sežig, in

- nepovratna stabilizacija onesnažil v tla, ki jo dosežemo z različnimi dodatki tlem.

2.6.1 Stabilizacija

Stabilizacija elementov v kontaminiranih tleh je tehnika remediacije, ki reducira dosegljivost elementov v tleh z dodajanjem stabilizacijskih dodatkov (Kumpiene in sod., 2008). Stabilizacija/solidifikacija (v nadaljevanju S/S metoda) je tehnologija, ki uporablja materiale, kot so npr. cement, apnenec ali organski polimeri, ki transformirajo kontaminirana tla s kovinami v bolj obvladljivo obliko in/ali manj strupeno obliko s fizikalnimi in/ali kemijskimi metodami. Pri solidifikaciji kontaminirana tla vključimo v monolit trdne oblike z omejeno površino. Stabilizacija je pojem, ki opredeljuje tehnologijo, ki kemijsko spremeni kovine v manj strupene in dostopne oblike. Veliko procesov uporablja oba postopka za stabilizacijo onesnažil (Yukselen in Alpaslan, 2001).

S/S metoda, ki vključuje redukcijo dosegljivosti onesnažil samo s kemijskimi metodami, imenujemo kemijska stabilizacija. Stabilizacijo onesnažil v tleh je mogoče doseči z dodatki, ki adsorbirajo, kompleksirajo ali precipitirajo kovine (Kumpiene in sod., 2008). Material, ki ga uporabljamo za S/S, se ne le spremeni v trdno agregatno stanje s kemijskimi reakcijami, ampak povzroči tudi insolubilizacijo, imobilizacijo, enkapsulacijo, uničenje, sorpcijo ali druge interakcije s tretiranimi odpadnimi materiali (Malviya in Chaudhary, 2006). S/S metoda inhibira izpiranje nevarnih snovi z zmanjšanjem površine za izpiranje in oblikuje stabilen pH okolja, v katerem so mnoge kovine v okolju še vedno prisotne, vendar v netopni obliki (Fitch in Cheeseman, 2003). Rezultat teh interakcij so trdne oblike odpadkov, ki niso nevarni ali so manj nevarni kot izvorna oblika. Stopnja učinkovitosti S/S produktov je definirana z dvema parametroma, trdnost in rezistenco izluževanja (Malviya in Chaudhary, 2006).

Končni rezultat stabilizacije ni odstranitev onesnažil iz tal, vendar zmanjšanje njihove dostopnosti in njihovega delovanja (Gray in sod., 2006).

2.6.1.1 Stabilizacija z apnenecem

V onesnaženo zemljo lahko dodamo apnenec. Uporaba tega je bolj ekonomična in manj strupena za okolje v primerjavi z ostalimi dodatki (Lee in sod., 2007). Pri dodajanju apnenca v onesnažena tla pride do signifikantnega povečanja pH vrednosti, ker se sprosti hidroksilni ion ob hidrolizi kalcijevega karbonata. Ob dodatku apnenca se kovine v tleh oborijo kot kovinski karbonati in njihov izmenljivi delež se v onesnaženih tleh zmanjša. Posledično se zmanjša tudi biološko dostopni delež kovin v tleh in s tem njihov privzem v rastline in živali (Lee in sod., 2004). Apnenec se uporablja tudi v kmetijstvu, saj je 100 % naravni material, njegovo delovanje je postopno, dolgoročno izboljšuje pH in strukturo kislinskih tal, prihaja do manjšega izpiranja hranil, mobilizira vezana hranila v tleh, zmanjša nevarnost suše, izboljšuje vpojnost površine tal, povečuje kapaciteto tal za rastlinam

dostopno vodo, ni agresiven in omogoča sobivanje ter razvoj talnih organizmov (Poljedeljci – vrnimo ..., 2010).

2.6.1.2 Stabilizacija z glinenimi minerali

Mešanica rdečega blata in gramoznega mulja vsebuje glinene minerale.

Rdeče blato (ang. red mud) je stranski produkt pri proizvodnji aluminija in je material, ki ostane po tretiranju boksita z natrijevim hidroksidom v procesu odstranitve aluminija. Rdeče blato je bazičen material, ki je bogat z železom (25–40 %) in aluminjevim oksidom (15–20 %). Z dodajanjem rdečega blata v kontaminirana tla s kovinami se poveča sorpcija kovin in zmanjša koncentracija topnih kovin. V rdečem blatu je prisoten krom, zaradi česar se njegova koncentracija zviša v tleh tretiranih z rdečim blatom, ne vsebuje pa ostalih kovin (Gray in sod., 2006).

Gramozni mulj (ang. gravel sludge) je stranski produkt v industriji gramoza. Gramozni mulj ima relativno nizko specifično površino in kationsko izmenjevalno kapaciteto (Krebs in sod., 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAČRT POIZKUSA

Živali smo nabrali v Podšentjurju blizu Litije, na področju, ki ni v bližini potencialnih virov onesnaženja. Živali so se nahajale na strohnelem lesu. Živali smo prenesli v steklen terarij v laboratorij, kjer smo jih hranili do poizkusa. V terarij smo dali plast peska, nato plast tal, kjer smo nabrali živali, nanj smo dali živali. Dodali smo manjši kos lesa, vejo in listje leske ter breze za hrano. Gojišče smo vlažili na 2 do 3 dni vedno v istem kotu terarija, da smo ustvarili gradientno vlažnost. Tla smo vzorčili v Avstriji, kjer poteka poizkus, v katerem so onesnažena tla stabilizirali z dodatkom apnenca ali glinenih mineralov (Friesl in sod., 2009). Tla smo posušili, presejali in jih s tem pripravili za nadaljnje delo. Živali smo izpostavili onesnaženim in stabiliziranim tlem za 14 dni in določili koncentracijo akumuliranih Zn, Cd in Pb v celotnem telesu. Izvedli smo analize tal, ekstrakcijo z dietilen triamin pentaocetno kislino, in sekvenčno ekstrakcijo kovin. Rezultate akumulacije in kemijskih ekstraktov smo primerjali in preverili ustreznost akumulacije kovin v izopodnih rakih kot merilo za ugotavljanje uspešnosti stabilizacije tal.

3.2 ANALIZA TAL

Tla smo vzorčili v kraju Arnoldstein v Avstriji, in sicer s kovinami onesnažena tla, stabilizirana tla z apnencem in glinenimi minerali (Friesl in sod., 2009). Tla smo posušili in presejali skozi 5 mm sito.

Podklošter (Arnoldstein, Avstrija) se nahaja v južni Avstriji na meji med Slovenijo in Italijo. Kraj je onesnažen z Pb, Zn, Cd, Cu kot posledica emisij iz Pb/Zn talilnice v Arnoldsteinu. Območje okrog Podkloštra je naseljeno, kar pomeni, da se tla uporabljajo za vrtnarjenje in igranje otrok, poleg tega pa sta prisotni tudi kmetijstva in gozdarstva dejavnost. Analize tal, vzorčenih v vrtovih, so pokazale signifikantno kontaminirana tla z Zn, Cd, Pb, Cu in As (Friesl in sod., 2006). Onesnaževanje se je začelo leta 1495 s taljenjem Pb, nadaljevalo se je v 50. letih 20. stoletja s produkcijo Zn, Cd in germanija (Ge). Poleg je potekala tudi proizvodnja superfosfatov, žveplove kisline in barvil. Leta 1989 so uradne emisijske slike za območje Karantanije pokazale zelo velike količine SO₂ in kovin. Leta 1992 so se emisije zmanjšale zaradi zaprtja talilnice. Opravljene so bile študije (Friesl in sod., 2006) o vplivu onesnaženja povečanja koncentracij kovin v okolju na konje, členonožce in celo na človeka (analize krvi in urina).

Na poskusnem polju, kjer smo vzorčili, so tla stabilizirana z dodatkom glinenih mineralov (v nadaljevanju oznaka RM) in apnenca (v nadaljevanju oznaka CA). RM je mešanica, onesnaženim tlem je bilo skupno dodanih 2,5 % (w/w) gramoznega mulja in 0,5 % (w/w) rdečega blata. Rdeče blato je stranski produkt v proizvodnji boksita (industrija aluminija) in je uvoženo iz Madžarske. Proizvede se ga več kot 60 milijonov ton na leto. Rdeče blato vsebuje 15 – 17 % Al₂O₃, 12 – 14 % SiO₃, 39 – 43 % Fe₂O₃, 8 – 10 % Na₂O in Cr. Gramozni mulj vsebuje 40 – 65 % SiO₂, 10 – 14 % Al₂O₃, 3 – 7 % Fe₂O₃, 5 – 12 % CaO in

4 – 6 % MgO. CA vsebuje 97 % CaCO₃, onesnaženim tlem je bilo dodanega 0,5 % (w/w) (Friesl in sod., 2009). Onesnažena netretirana tla imajo v nadaljevanju oznako ON.

Osnovne pedološke značilnosti talnih vzorcev so določili v Centru za pedologijo in varstvo okolja (Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) v skladu s standardno prakso. Za standardno pedološko analizo smo v suspenziji 0,01 CaCl₂ (tla:raztopina = 1 : 2) izmerili pH vzorcev tal, količino organske snovi smo izmerili s titracijo po metodi Walkley-Black (ISO 14235, 1998), kationsko izmenjevalno kapaciteto smo izmerili z amonij-acetatno metodo (Rhoades, 1982) in teksturo tal z mehansko metodo.

pH smo izmerili tako, da smo 10 g suhih in presejanih tal (skozi 2 mm sito) zmešali z 20 ml 0,01 M raztopino CaCl₂ (pH 5,0 – 6,5) v razmerju 1 : 2. Vzorce smo pustili, da so se prepojili z raztopino, nato pa jih v 30 minutah 4–5 x temeljito premešali. Vzorce smo pustili, da so se posedli. Izmerili smo vrednost pH supernatanta. Meritve smo delali v treh ponovitvah (Kalra in Maynard, 1991).

3.3 RAZKLOP Z ZLATOTOPKO

Zlatotopka (»aqua regia«) je kislinska mešanica koncentrirane dušikove kisline (65 % HNO₃) in koncentrirane klorovodikove kisline (37 % HCl) v volumskem razmerju 1 : 3. Zlatotopka je izjemno močan oksidant, ki raztaplja vse kovine razen srebra, tudi zlato in platino (SIST ISO 11466).

Zatehtali smo 3 g suhih presejanih tal (skozi sito 160 µm) v reakcijske posode volumna 250 mL. Vzorce smo navlažili z 10 kapljicami 37 % HCl. Med mešanjem smo počasi dodali 21 mL 37 % HCl in po kapljicah 7 mL 65 % HNO₃. Dobljeno reakcijsko mešanico smo pustili stati 16 ur. Reakcijsko mešanico smo segrevali 2 uri v termobloku pod povratnim hladilnikom. Po 2 urah smo izklopili gretje termobloka, da se je reakcijska mešanica shladila. Prefiltrirali smo vsebino reakcijskih posod v 100 mL bučke, sprali z minimalnim možnim volumnom dušikove kisline in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Koncentracijo posameznih kovin smo merili na atomskem absorpcijskem spektrometru (oznaka: AAS) (SIST ISO 11466).

3.4 DOLOČITEV RASTLINAM DOSTOPNIH KOVIN

Ekstrakcija z dietilen triamin pentaocetno kislino (DTPA) je ekstrakcijski test za ugotavljanje biodosegljivosti onesnažil za rastline. (Lindsay in Norwell, 1978)

DTPA ekstrakcijska raztopina vsebuje 0,005 M DTPA, 0,01 M CaCl₂ in 0,1 M TEA (trietanolamin). Raztopino uravnamo na pH vrednost 7,30 ± 0,05. 10 g zračno suhih tal, presejanih skozi 5 mm sito, smo prelili z 20 ml ekstrakcijske raztopine v 125-ml posodah. Zamašene posode smo stresali na stresalniku 2 uri pri 120 obratov min⁻¹. Suspenzijo smo po stresanju filtrirali (Whatman No. 42). Filtrat smo shranili v hladilniku do analiz z AAS.

3.5 SEKVENČNA EKSTRAKCIJA KOVIN

S šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo smo določili kemijske oblike kovin v tleh, kot je opisano v poglavju 2.3.

Pri prvi frakciji smo 1 g zračno posušenih tal, presejanih skozi 2 mm sito, prelili z 10 mL deionizirane vode, jih stresali za 1 uro pri sobni temperaturi, centrifugirali (2500 obratov na min^{-1} , 30 min) in odpipetirali supernatant. Določili smo vodotopni delež kovin v tleh.

Drugo frakcijo smo ekstrahirali iz ostankov talnega vzorca predhodne frakcije, ki smo ga prelili z 10 mL 1 M magnezijevega nitrata (MgNO_3), stresali za 2 uri na sobni temperaturi, centrifugirali in odpipetirali supernatant. Magnezijev nitrat povzroči izmenjavo elektrostatično vezanih ionov kovin na talne koloide.

Tretjo frakcijo smo ekstrahirali z 10 mL 1 M amonoacetatom (NH_4OAc) pri pH 5, stresali 5 ur na sobni temperaturi, centrifugirali in odpipetirali supernatant. Amonoacetat povzroči raztapljanje karbonatov (kalcit, dolomit) in oboritev (sprostitev) vezanih kovin.

Četrto frakcijo smo ekstrahirali z 20 mL 0,1 M hidrosilamino hidrokloridom ($\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$) pri pH 2, stresali 12 ur na sobni temperaturi, centrifugirali in odpipetirali supernatant. Hidrosilamino hidroklorid povzroči zmanjšanje železovih in manganovih oksidov v topno obliko.

Peto frakcijo smo ekstrahirali z dodatkom 3 mL 0,02 M dušikove (V) kisline (HNO_3) in počasnim dodajanjem 5 mL 30% peroksida (H_2O_2) v vodni kopeli pri 85°C . Pustili smo, da je H_2O_2 izhlapel, nato smo sproščene kovine ekstrahirali s 15 mL 1 M raztopine amonoacetata v 6 % HNO_3 , stresali za 30 min na sobni temperaturi, centrifugirali in odpipetirali supernatant. Dušikova (V) kislina in peroksid (H_2O_2) povzročita oksidacijo organske snovi in sprostitvev vezanih kovin ter raztapljanje kovinskih sulfidov.

Šesto frakcijo smo pridobili po razklopu z zlatotopko, s katero smo povzročili raztapljanje silikatov in preostalih mineralov. Ostanke iz prejšnje frakcije smo prenesli v steklene reakcijske posode za razklop z zlatotopko in jih obravnavali, kot je opisano v poglavju 3.3.

Pri vsaki frakciji smo shranili supernatant in ga na koncu analizirali z AAS.

3.6 VZORČENJE ŽIVALI

Vzorčenje živali vrste *Porcellio scaber* je potekalo septembra 2009 na naslovu Podšentjur 3, Litija, Slovenija. Živali so se nahajale na kmetiji, natančneje smo jih našli ob hlevu in pod kozolcem, pod kakšnim starim kosom lesa ali kamna. Največ jih je bilo prav blizu kupa hlevskega gnoja. Živali smo nabrali v plastično posodo z luknjami na pokrovu in jih prenesli v laboratorij na Centru za pedologijo in varstvo okolja (Oddelek za agronomijo,

Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani). V laboratoriju smo živali gojili v stekleni posodi na tleh prinešenih iz kraja Šklendrovec (Zagorje ob Savi, Slovenija), in hranili z listjem leske in breze nabranih v Šklendrovcu (Zagorje ob Savi, Slovenija), Tivoliju, na Rožniku in na Šišenskem hribu (Ljubljana, Slovenija). Živalim smo dodajali vodo vedno v isti konec terarija, da smo jim ustvarili gradientno vlažnost tal. Živali so bile gojene v laboratoriju 10 tednov pri sobni temperaturi. Poizkus smo začeli konec novembra.

3.7 AKUMULACIJA KOVIN V ŽIVALIH

Pripravili smo 15 plastičnih posod (9,9 x 15,9 x 6,5 cm) s preluknjanim pokrovom. Živali smo posamično stehali in jih razvrstili glede na težo v tri razrede, 30 – 40 mg, 40 – 50 mg in 50 – 60 mg. Živali smo razporedili v posode tako, da je bilo v vseh posodah enako število živali iz posameznega velikostnega reda. Za poizkus smo za vsako ponovitev uporabili 15 odraslih živali s težo med 30 in 60 mg, in sicer 5 iz razreda 30 – 40 mg, 6 iz razreda 40 – 50 mg in 4 iz razreda 50 – 60 mg. V posodo smo dali 400 ml zemlje, presejane skozi 5 mm sito, 15 živali in dva oprana kamna, kamor so se lahko živali skrile, hkrati pa smo jim s tem želeli narediti okolje podobno kot je v naravi. Tako smo jih pustili 14 dni na sobni temperaturi v laboratoriju, sproti pa smo jih opazovali in jim po potrebi vlažili zemljo. Tla, ki smo jih uporabili v poskusu, so stabilizirana tla z apnencem (oznaka: CA), stabilizirana tla z glinenimi minerali (oznaka: RM) in onesnažena tla (oznaka: ON) (Arnoldstein, Avstrija). Po 14-dnevni izpostavitvi smo živali prestavili v posode en dan, v katerih je bilo samo nekaj listja. V tej stopnji so si živali izpraznile črevesje. Živali smo nato vsako posamezno prestavili v 1,5 ml epice, jih stehali in jih dali čez noč v zamrzovalnik. Zjutraj smo jih vzeli ven, odprli pokrovček epice in jih pustili na sobni temperaturi na pultu v laboratoriju, da so se posušile. Pred nadaljnjo liofilizacijo, smo živali ponovno stehali. Tehtanje je sledilo tudi po liofilizaciji v liofilizerju (Udovič in sod., 2009).

3.8 RAZKLOP ŽIVALI

Epruvete smo predhodno namakali v 3 % HNO_3 in jih nato sprali z destilirano vodo in jih posušili v sušilniku. V digestoriju smo pripravili 300 ml mešanice kislin (HNO_3 : HClO_4 = 7 : 1). Razklop živali traja 3 dni. Prvi dan smo posušene živali prenesli v epruvete in jim dodali 500 μl kislinske mešanice. Pripravili pa smo tudi po štiri slepe vzorce, ki so vsebovale samo 500 μl kislinske mešanice. Epruvete smo pokrili s folijo za živila in pustili v digestoriju. Naslednji dan smo epruvete prenesli v termoblok in začeli z razklopom živali. Na začetku smo segrevali na 40° C, po 30 minutah smo nadaljevali na 65° C, čez 30 minut na 85° C, čez 1 uro na 105° C, čez eno uro na 125° C, čez eno uro na 160° C in čez eno uro na 185° C, kar smo pustili na tej temperaturi čez noč. Tretji dan smo epruvete ohladili in jih pokrili s plastičnimi zamaški. Shranili smo jih do nadaljnje analize z AAS. Rezultate koncentracij kovin v živalih smo obdelali v programu R Commander.

3.9 ATOMSKA ABSORPCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

Atomska absorpcijska spektroskopija (v nadaljevanju AAS) je ena od osnovnih instrumentalnih tehnik določanja elementov. Pri AAS atome elementa prevedemo v vzburljeno stanje v plamenu acetilena ter merimo absorpcijo svetlobe pri njenem prehodu svetlobe skozi plamen. Valovne dolžine, pri katerih se svetloba absorbira, so za vsak element značilne. Z AAS lahko določimo več kot 60 elementov (Leštan, 2002b).

Z AAS smo izmerili koncentracije Zn, Cd in Pb v telesu živali vrste *Porcellio scaber*.

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Za vsako posamezno analizo (standardne pedološke lastnosti, rezultati zlatotopke, ekstrakcije z DTPA in šeststopenjske sekvenčne ekstrakcije) smo statistično značilne razlike določili z Duncanovim testom pri 95 % intervalu zaupanja ($P < 0,05$). Uporabili smo program Statgraphics plus za Windows 4.0. Statistične razlike med koncentracijami Zn, Cd in Pb v telesu živali *P. scaber*, ki so bile izpostavljene ON, CA in RM, smo določili z Mann Whitney-evim testom pri 95 % intervalu zaupanja ($P < 0,05$). Uporabljen je bil program Statgraphics plus za Windows 4.0.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA TAL

Standardne pedološke lastnosti onesnaženih in stabiliziranih tal so podane v Preglednici 2

Preglednica 2: Standardne pedološke značilnosti onesnaženih in stabiliziranih tal.

Vzorec tal	pH	Org. snov (%)	Pesek (%)	Melj skup. (%)	Glina (%)	CEC (mmol C ⁺ 100g ⁻¹)	Tekst. razred*
ON	4,66 ± 0,03 ^a	2,8 ± 0,2 ^a	41,1 ± 0,4 ^a	46,2 ± 0,8 ^a	12,8 ± 0,4 ^a	16,4 ± 0,2 ^{ab}	I
CA	6,37 ± 0,27 ^b	3,4 ± 0,1 ^b	41,7 ± 0,2 ^a	44,1 ± 0,7 ^a	14,2 ± 0,7 ^a	16,0 ± 0,3 ^a	I
RM	6,43 ± 0,19 ^b	3,9 ± 0,1 ^c	40,9 ± 1,1 ^a	46,4 ± 2,3 ^a	12,7 ± 1,3 ^a	16,8 ± 0,3 ^b	I - MI

* - Teksturni razred: I – ilovica, I - MI – melj ilovica

a, b, c – oznake za statistično značilne razlike (Duncanov test, P < 0,05)

ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali

Onesnažena tla so kislila. Pri stabiliziranih tleh je prišlo do zvišanja pH vrednosti iz kislega (4,66 ± 0,03) v nevtralno (6,37 ± 0,27 in 6,43 ± 0,19). S stabilizacijo se je povečal delež organske snovi v tleh s statistično značilnimi razlikami med obema načinoma.

4.2 ZLATOTOPKA

Celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh so podane v Preglednici 3

Preglednica 3: Celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.

Vzorec tal	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)
ON	543,2 ± 2,9 ^a	7,44 ± 0,49 ^a	802,5 ± 13,4 ^a
CA	474,1 ± 3,6 ^b	6,03 ± 0,14 ^b	706,4 ± 11,5 ^b
RM	469,0 ± 12,4 ^b	5,78 ± 0,27 ^b	716,5 ± 11,1 ^b

a, b, c – oznake za statistično značilne razlike (Duncanov test, P < 0,05)

ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali

Stabilizacija onesnaženih tal je statistično (P < 0,05) zmanjšala vrednosti celokupne koncentracije vseh treh preiskovanih kovin. S stabilizacijo z apnencem in z glinenimi minerali je prišlo do zmanjšanja celokupnih koncentracij Zn za 12,7 in 13,7 %, Cd za 19,0 in 22,3 % ter Pb za 12,0 in 10,7 %, vendar med obema načinoma ni statistično značilnih razlik.

4.3 EKSTRAKCIJA Z DTPA

Rezultati DTPA ekstrakcije za onesnažena in stabilizirana tla so podani v Preglednici 4.

Preglednica 4: Rastlinam dostopne koncentracije Zn, Cd in Pb določene z DTPA ekstrakcijskim testom v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.

Vzorec tal	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)
ON	79,2 ± 2,0 ^a	2,00 ± 0,04 ^a	211,7 ± 3,8 ^a
CA	27,1 ± 0,2 ^b	1,51 ± 0,02 ^b	156,5 ± 3,2 ^b
RM	16,1 ± 0,9 ^c	0,97 ± 0,05 ^c	101,1 ± 4,5 ^c

a, b, c – oznake za statistično značilne razlike (Duncanov test, $P < 0,05$)

ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali

Test DTPA je pokazal razlike med onesnaženimi in stabiliziranimi tlemi pri vseh treh preiskovanih kovinah. Iz tega lahko trdimo, da je bila stabilizacija z apnencem in glinenimi minerali uspešna in da je prišlo do razlik v biološki dostopnosti med obema načinoma stabilizacije. Najmanjša biološka dostopnost je pri stabilizaciji z glinenimi minerali, in sicer za 80 % pri Zn ter za 52 % pri Cd in Pb.

4.4 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA

Rezultati frakcionacije Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh so podani v Preglednici 5 kot delež (%) skupnega seštevka vseh frakcij.

Frakcionacija Zn je pokazala, da se je s stabilizacijo zmanjšal delež Zn v frakcijah topnih in izmenljivih kovin. Pri stabilizaciji z glinenimi minerali je prišlo do statistično značilnega povišanja deleža Zn v karbonatni frakciji. S stabilizacijo se je povečal delež Zn v frakciji, vezani na železove in manganove okside ter v frakciji preostanka. Razlike so bile še večje pri stabilizaciji z glinenimi minerali. Do povišanja deleža Zn je prišlo s stabilizacijo v frakciji, vezanih na organsko snov.

Pri stabilizaciji je prišlo do zmanjšanja deleža izmenljivega Cd, največ pri stabilizaciji z apnencem. S stabilizacijo se je povečal delež vezanega Cd na karbonatno frakcijo in na organsko snov, največ pri stabilizaciji z glinenimi minerali. Zvišal se je tudi delež Cd, vezanega na frakcijo, vezano na železove in manganove okside.

Frakcionacija Pb je pokazala, da se je s stabilizacijo zmanjšal delež topnega in izmenljivega Pb. S stabilizacijo z apnencem se je zmanjšal delež Pb, vezanega na karbonate, v nasprotju s tem pa se je s stabilizacijo z glinenimi minerali ta delež povečal. Pri vezavi Pb na frakcijo, vezano na železove in manganove okside, se je s stabilizacijo z apnencem ta delež povečal, pri stabilizaciji z glinenimi minerali pa zmanjšal. S stabilizacijo je prišlo do povečanja vezave Pb na organsko snov, povečal pa se je tudi delež frakcije preostanka, največ pri stabilizaciji z glinenimi minerali.

Preglednica 5: Frakcionacija (%) Zn, Cd in Pb v onesnaženih in stabiliziranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo kvantifikacije.

Kovina	Vz. tal	I	II	III	IV	V	VI
Zn	ON	0,65 ± 0,26 ^a	7,20 ± 0,50 ^a	9,31 ± 0,19 ^a	12,2 ± 0,2 ^a	29,3 ± 0,8 ^a	14,8 ± 0,4 ^a
	CA	0,08 ± 0,01 ^b	1,44 ± 0,08 ^b	9,29 ± 0,05 ^a	15,3 ± 0,1 ^c	42,6 ± 2,2 ^b	18,4 ± 0,5 ^b
	RM	0,17 ± 0,04 ^b	0,95 ± 0,03 ^b	9,85 ± 0,10 ^b	14,0 ± 0,6 ^b	45,5 ± 4,5 ^b	19,3 ± 0,4 ^c
Cd	ON	LOQ	22,3 ± 1,0 ^a	31,2 ± 0,4 ^a	16,2 ± 0,8 ^a	14,1 ± 0,9 ^a	LOQ
	CA	LOQ	15,2 ± 0,2 ^c	40,9 ± 0,3 ^b	24,8 ± 0,4 ^b	23,2 ± 0,4 ^b	LOQ
	RM	LOQ	18,9 ± 0,6 ^b	45,1 ± 1,3 ^c	23,3 ± 1,1 ^b	30,1 ± 1,3 ^c	LOQ
Pb	ON	0,24 ± 0,07 ^a	1,65 ± 0,08 ^a	23,2 ± 0,4 ^b	19,5 ± 0,7 ^b	83,1 ± 2,5 ^a	2,7 ± 0,2 ^a
	CA	0,06 ± 0,02 ^b	1,33 ± 0,08 ^b	22,1 ± 0,2 ^c	22,8 ± 1,2 ^a	101,2 ± 0,9 ^b	3,0 ± 0,2 ^b
	RM	0,11 ± 0,07 ^b	1,33 ± 0,03 ^b	24,0 ± 0,3 ^a	15,6 ± 0,8 ^c	105,5 ± 3,7 ^b	3,4 ± 0,1 ^c

I – vodotopna frakcija, II – izmenljiva frakcija, III – frakcija vezana na karbonate, IV – frakcija vezana na železove in manganove okside, V – frakcija vezana na organsko snov, VI – preostanek, ki se običajno nahaja vezan na silikate in sulfate

a, b, c – oznake za statistično značilne razlike (Duncanov test, $P < 0,05$)

ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali

4.5 AKUMULACIJA KOVIN V ENAKONOŽNIH RAKIH *Porcellio scaber*

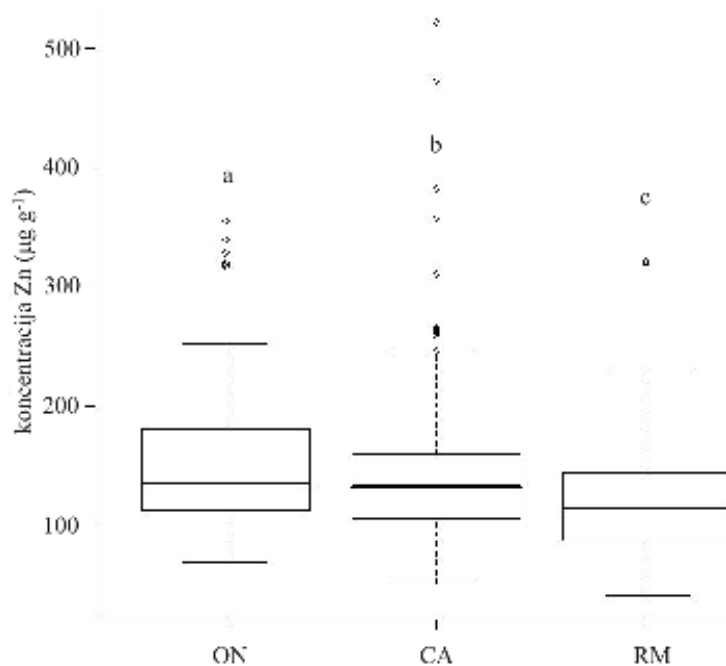
Primerjali smo koncentracije akumuliranega Zn, Cd in Pb v telesu *P. scaber* po 14-dnevni izpostavitvi onesnaženim in stabiliziranim tlem. Rezultati kažejo, da so živali, ki so bile izpostavljene stabiliziranim tlem, akumulirale manjšo količino kovin kot tiste, ki so bile izpostavljene onesnaženim tlem.

Vrednosti koncentracij kovin v telesu testnih živali so porazdeljene neparametrično. Za statistično analizo smo uporabili Man Whitneyev test. Rezultati koncentracij posameznih kovin v telesu živali so podane grafično v obliki okvirja z ročaji.

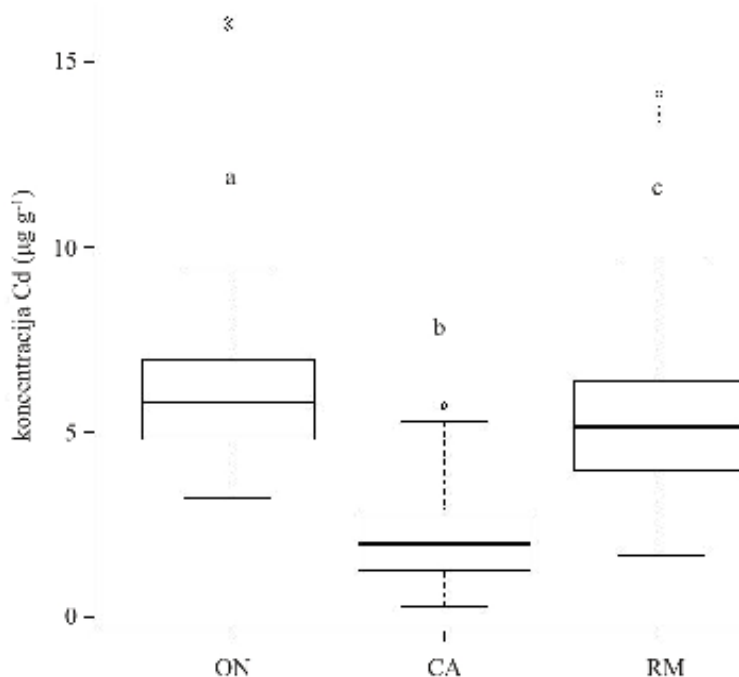
Pri Zn (Slika 2) so se pokazale statistično značilne razlike ($P < 0,05$) med koncentracijam akumuliranega Zn v živalih. Živali, ki smo jih izpostavili onesnaženim tlem, so akumulirale največje količine Zn, tiste, izpostavljene stabiliziranim tlem z apnencem in glinenimi minerali, pa manj.

Pri Cd (Slika 3) so se pokazale statistično značilne razlike ($P < 0,05$) med koncentracijami akumuliranega Cd v živalih. Živali, ki smo jih izpostavili onesnaženim tlem, so akumulirale največje količine Cd. Pri živalih, izpostavljenih stabiliziranim tlem z apnencem, je prišlo do zelo močnega upada akumulacije Cd.

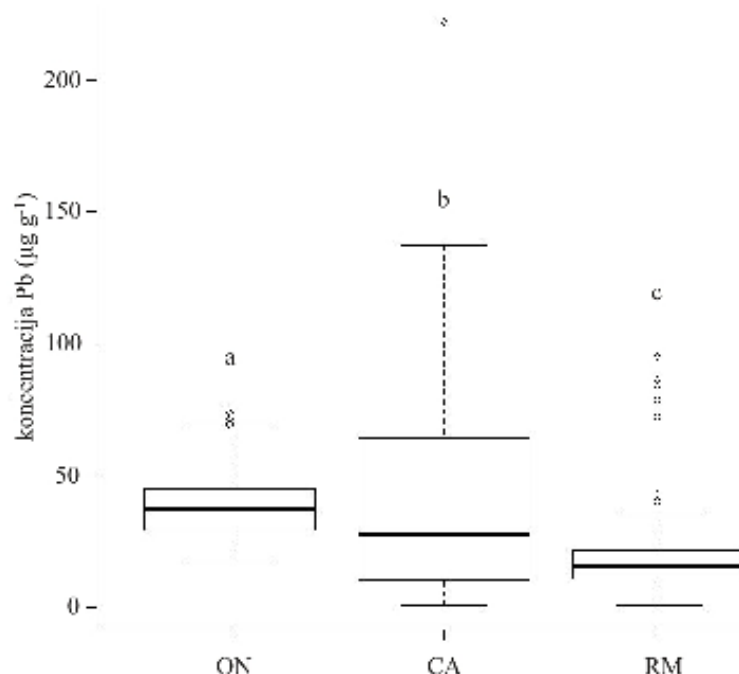
Pri Pb (Slika 4) so se pokazale statistično značilne razlike ($P < 0,05$) med koncentracijami akumuliranega Pb v živalih. Kljub razpršenosti rezultatov za akumulacijo Pb v živalih, izpostavljenih tlem stabiliziranim z apnencem, sta bila oba načina stabilizacije uspešna z vidika zmanjšanja privzema Pb v *P. scaber*.



Slika 2: Koncentracije Zn v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Zn v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali



Slika 3: Koncentracije Cd v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Cd v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali



Slika 4: Koncentracije Pb v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, mediano, tretji kvartil, maksimum vrednosti in osamelce koncentracij akumuliranega Pb v *P. scaber*. (a,b,c) – oznaka za statistično značilne razlike (Mann-Whitney-ev test, $P < 0,05$). ON – onesnažena tla, CA – tla stabilizirana z apnencem, RM – tla stabilizirana z glinenimi minerali

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za poskus smo izbrali tla iz Arnoldsteina (Avstrija), ki so bila v okviru poljskega poskusa tretirana z različnimi dodatki. Tla v Arnoldsteinu so onesnažena s kovinami Zn, Cd in Pb zaradi prisotnosti talilnice.

Vrednost pH se je pri stabiliziranih tleh z apnencem in glinenimi minerali povečala. Kislost tal vpliva tako na adsorpcijske razmere v tleh kot na speciacijo kovinskih ionov. pH vpliva na adsorpcijo oziroma vezavo kovinskih kationov v netopne oborine oziroma komplekse z organsko – mineralnim delom trdne faze tal. Zn, Cd in Cu in v manjši meri tudi Pb so veliko bolj topne v pH območju med 4 in 5 kot v pH območju med 5 in 7 (Zupan in sod., 2008). Pri stabilizaciji z apnencem se ob reakciji hidrolize kalcijevega karbonata sprosti hidroksilni ion, kar privede do povečanja pH vrednosti (Lee in sod., 2004) in s tem zmanjšanja topnosti kovin v tleh.

Celokupne koncentracije Zn, Cd in Pb v onesnaženih tleh presegajo opozorilno imisijsko vrednost nevarnih snovi v tleh določene z Uredbo o mejnih in ... (1996) po slovenski zakonodaji in dopustne mejne vrednosti po avstrijski zakonodaji (Zulassige ..., 2003). S stabilizacijo nismo pričakovali zmanjšanja celokupne koncentracije kovin, saj je to metoda, kjer v onesnažena tla dodamo določen delež stabilizacijskega sredstva. Naši podatki so pokazali rahlo zmanjšanje celokupne koncentracije s stabilizacijo, kar lahko pripišemo volumskemu redčenju onesnaženih tal zaradi dodajanja apnenca in glinenih mineralov.

S stabilizacijo smo pričakovali zmanjšanje biološke dostopnosti kovin (Zn, Cd in Pb) ter s tem zmanjšanje potencialnega tveganja, ki ga ta tla predstavljajo za okolje. Uspešnost stabilizacije običajno vrednotimo s selektivnimi kemijskimi ekstrakcijskimi testi (npr. DTPA), s katerimi določimo biološko dostopni delež kovin v tleh. Ti testi pa ne zajemajo kompleksne narave interakcij med organizmi, tlemi in kovinami v tleh. Z vrednotenjem biološke dostopnosti kovin v tleh na podlagi njihove akumulacije v izopodih pridobimo popolnejšo informacijo o uspešnosti stabilizacije tal, saj le-ti zajemajo kompleksno naravo interakcij med organizmi, tlemi in kovinami v tleh.

5.1.1 Stabilizacija tal

Ekstrakcija z DTPA omogoča ekstrahiranje kovin, prisotnih v vodni raztopini in del kovin, adsorbiranih na trdno fazo tal. Večji delež kovin je vezan na organsko snov, karbonate, okside in v frakciji preostanka. V takšnih oblikah so kovine povečini močno vezane in zato nedostopne organizmom (Udovič, 2009). Rezultati kažejo, da je bila stabilizacija najuspešnejša ob dodatku glinenih mineralov, ko smo zaradi glin povečali število vezavnih mest za kovine v tleh. Glina ima veliko specifično površino ($10 - 10.000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ tal), zaradi česar ima veliko kationsko izmenjevalno kapaciteto in s tem sposobnost

zadrževanja snovi. Glineni minerali vsebujejo negativno nabito površino, sposobni so zadržati katione v tleh – adsorpcija kationov (Suhadolc in sod., 2005).

S šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo ocenjujemo delež kovin, vezanih na biološko dostopne in biološko nedostopne talne frakcije. Rezultati so pokazali, da je prišlo s stabilizacijo do zmanjšanja deleža kovin v frakcijah topnih in izmenljivih kovin, ki so biološko najbolj dostopne (Leštan in sod., 2003). V splošnem je večji delež kovin vezan na organsko snov, karbonate, okside in v frakciji preostanka, kjer so se s stabilizacijo ti deleži še povečali. Največji delež kovin v tleh je vezan na organsko snov (Peters, 1999). Pb je le v manjšem deležu prisoten v ionski obliki Pb^{2+} , mnogo pogosteje je prisoten v obliki koordinacijskih in hidratiranih spojin $Pb(OH)^+$ in $PbCl^+$. Pb se tam, kjer je ali pa še poteka metalurška predelava svinčenih rud, pretežno nahaja kot PbS – to je delež Pb v frakciji preostanka (Leštan, 2002a). Cd se je ob stabilizaciji v večji meri vezal na karbonate in ostale biološko dostopne frakcije.

5.1.2 Akumulacija Zn, Cd in Pb v *P. scaber*

Biološko dostopnost kovin smo določili *in vivo* z akumulacijo Zn, Cd in Pb v vrsti *Porcellio scaber*, ki smo jih izpostavili onesnaženim in stabiliziranim tlem. Organizmi absorbirajo kovine in jih v organizmu kopičijo, zato so dober pokazatelj biološke dostopnosti kovin v tleh. Razpršenost rezultatov akumulacije Pb v tleh stabiliziranih z apnencem kaže, da so se živali različno odzvale. V podobnih primerih bi podaljšan čas izpostavitve vpliva na zmanjšano razpršenost podatkov (Drobne, ustno).

5.1.3 Primerjava metod

Najpopolnejšo sliko dobimo ravno iz analiz organizmov. Za takšne analize so potrebni organizmi, ki so dovolj raziskani. Najprimernejši so kopenski izopodi zaradi zmožnosti akumulacije visokih koncentracij kovin v telo, njihove velikosti, številčnosti, enostavno ravnanje z njimi v laboratoriju, živali so dobro raziskane, kar pa so glavni razlogi za izbiro izopodov kot testnih organizmov (Drobne, 1997). Rezultati kažejo, da kemične metode niso v celoti primerne za določanje biološke dostopnosti kovin. Vzrok je, da kemijski testi ne zajemajo kompleksne narave interakcij med organizmi, tlemi in kovinami v tleh. V primerjavi z akumuliranim Zn v živalih je DTPA test pokazal manjšo biološko dostopnost. Enako se je pokazalo tudi za Cd, kjer smo z DTPA ekstrakcijo podcenili delež biološko dostopnega Cd, nasprotno pa so živali akumulirale manj Pb, kot smo pričakovali na podlagi DTPA testa. Zgolj z uporabo kemijskih ekstrakcijskih testov napačno ocenimo biološko dostopni delež kovin v tleh.

S šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo ocenjujemo delež kovin, vezanih na biološko dostopne talne frakcije, to so predvsem I. in II. talna frakcija. Pri Zn, Cd in Pb je prišlo s stabilizacijo z apnencem in z glinenimi minerali do zmanjšanja deleža kovin v vodotopni in izmenljivi talni frakciji, kar je v skladu z znižanjem deleža akumulacije Zn, Cd in Pb v *P. scaber*. Vezava kovin na ostale talne frakcije predstavlja biološko nedostopne kovine. V

tem primeru je po stabilizaciji prišlo do povečanja deleža kovin v frakcijah, vezanih na organsko snov, Mn in Fe okside, karbonatno snov in v preostanku. Rezultati šeststopenjske sekvenčne ekstrakcije se ujemajo s podatki o bioakumulaciji kovin v *P. scaber*. Delež biološko dostopnih kovin se je zmanjšal, povečal pa se je delež biološko nedostopnih kovin. Z bioakumulacijo kovin v *P. scaber* smo pokazali zmanjšano akumulacijo kovin zaradi povečanja biološke nedostopnosti kovin.

5.2 SKLEPI

Stabilizacija tal z apnencem in z glinenimi minerali je učinkovito zmanjšala biološko dostopnost kovin Zn, Cd in Pb v tleh, določeno s kemijskimi ekstrakcijskimi testi. *In vivo* testi so pokazali, da je stabilizacija z apnencem bolj primerna za zmanjšanje biološke dostopnosti Cd v onesnaženih tleh, stabilizacija z glinenimi minerali pa za zmanjšanje biološke dostopnosti Pb v onesnaženih tleh. S tem smo potrdili našo hipotezo zmanjšanja biološke dosegljivosti kovin s stabilizacijo tal.

Rezultati kemijskih ekstrakcijskih metod in akumulacije kovin v *Porcellio scaber*, ki smo jih uporabljali za vrednotenje biološke dosegljivosti remediacije, so se razlikovali. Rezultati *in vivo* testa kažejo, da samo z uporabo ekstrakcijskih testov in kemijskih analiznih metod lahko neustrezno ocenimo diološko dostopnost kovin v tleh. V oceno uspešnosti stabilizacije tal je zato potrebno vključiti *in vivo* teste, saj ti dajo bolj popolno sliko interakcij okolja z organizmom. Akumulacija kovin v izopodnih rakih vrste *P. scaber* je učinkovito merilo biološke dostopnosti kovin.

6 POVZETEK

Za poskus smo uporabili tla iz Arnoldsteina (Podklošter, Avstrija), ki so močno onesnažena s kovinami. Tla v Arnoldsteinu so v okviru poljskega poskusa že stabilizirali s stabilizacijskimi dodatki (apnenec, glineni minerali), s katerim naj bi zmanjšali biološko dostopnost kovin v tleh in ne celokupne koncentracije kovin v tleh. Učinkovitost stabilizacije smo ugotavljali z ekstrakcijskimi testi, in sicer z ekstrakcijo z DTPA, s katerim ugotavljamo delež biološko dostopnih kovin, in s šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo, s katero ocenjujemo delež kovin, vezanih na biološko dostopne in biološko nedostopne talne frakcije. Za primerjavo učinkovitosti stabilizacije smo uporabili akumulacijo Zn, Cd in Pb v navadnih prašičih, *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea), ki so sposobni akumulirati kovine v telesu.

Ekstrakcijski test DTPA nam je pokazal zmanjšano biološko dostopnost kovin pri stabiliziranih tleh, najbolj učinkovita je bila stabilizacija z glinenimi minerali. Frakcionacija kovin je pokazala zmanjšanje deleža kovin v frakciji topnih in izmenljivih kovin, kjer so kovine biološko dostopne organizmom. Povečal se je delež kovin, vezanih na organsko snov, ki so nedostopne organizmom. Ugotovili smo razlike v biološki dostopnosti med ekstrakcijskimi testi in akumulacijo kovin v telesu *P. scaber*. Vzrok je, da ekstrakcijski testi ne zajemajo kompleksne narave interakcij med organizmi, tlemi in kovinami v tleh.

7 VIRI

- Bibič A., Drobne D., Štrus J., Byrne A. R. 1997. Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 5: 814-821
- Cortet J., Gomot de Vaufleury A., Poisot-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 35, 3: 115-134
- Cvetko, V. Varovanje krajine, prostora in okolja, vaje: Gradivo za 1. letnik. Ljubljana. 2008. 60 str.
http://www.zavod-irc.si/docs/Skriti_dokumenti/Varovanje_krajine_prostora_in_okolja-vaje-Cvetko.pdf (19.4.2010)
- Dallinger R. 1993. Strategies of Metal Detoxification in Terrestrial invertebrates. V: *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Dallinger R., Rainbow P. S. (ur.). London, CRC Press Online: 245-289
- Dallinger R., Berger B., Birkel S. 1992. Terrestrial isopods: useful biological indicators of urban metal pollution. *Oecologia*, 89, 1: 32-41
- Drobne D. 1997. Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 6: 1159-1164
- Drobne D. 2010. »Odziv živali vrste *Porcellio scaber* na akumulacijo kovin«. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (osebni vir, julij 2010)
- Fitch J. R., Cheeseman C. R. 2003. Characterisation of environmentally exposed cement-based stabilised/solidified industrial waste. *Journal of Hazardous Materials*, 101, 3: 239-255
- Friesl W., Friedl J., Platzer K., Horak O., Gerzabek M. H. 2006. Remediation of contaminated agricultural soils near a former Pb/Zn smelter in Austria: Batch, pot and field experiments. *Environmental Pollution*, 144, 1: 40-50
- Friesl-Hanl W., Platzer K., Horak O., Gerzabek M. H. 2009. Immobilising of Cd, Pb, and Zn contaminated arable soils close to a former Pb/Zn smelter: a field study in Austria over 5 years. *Environmental Geochemistry and Health*, 31, 5: 581-594
- Glasser F. P. 1997. Fundamental aspects of cement solidification and stabilisation. *Journal of Hazardous Materials*, 52, (2-3): 151-170
- Gray C. W., Dunham S. J., Dennis P. G., Zhao F. J., McGrath S. P. 2006. Field evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. *Environmental Pollution*, 142, 3: 530-539

- Haimi J. 2002. Decomposer animals and bioremediation of soils. *Environmental Pollution*, 107, 2: 233-238
- Heikens A., Peijnenburg W. J. G. M., Hendriks A. J. 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, 113, 3: 385-393
- Hopkin S. P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London, new York, Elsevier applied science: 366 str.
- Kalra Y. P., Maynard D. G. 1991 *Methods manual for forest soil and plant analysis*. Information Report NOR-X-313
- Krebs R., Gupta S. K., Furrer G., Schulin R. 1999. Gravel sludge as an immobilising agent in soils contaminated by heavy metals; a field study. *Water, Air, and Soil pollution*, 115: 465-479
- Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. 2008. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review. *Waste Management*, 28, 1:215-225
- Lee M., Paik I. S., Kim I., Kang H., Lee S. 2007. Remediation of heavy metal contaminated groundwater originated from abandoned mine using lime and calcium carbonate. *Journal of Hazardous Materials*, 144, 1-2: 208-214
- Lee T. M., Lai H. Y., Chen Z. S. 2004. Effect of chemical amendments on the concentration of cadmium and lead in long-term contaminated soils. *Chemosphere*, 57, 10: 1459-1471
- Leštan D. 2002a. *Ekopedologija. Študijsko gradivo za študente opredelilnega izbirnega študija Ekopedologije*. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 276 str.
- Leštan D., 2002b. *Vaje iz ekopedologije: in projekt: Inducirana fitoekstrakcija/in situ izpiranje Pb in Zn iz onesnaženih tal: delovno gradivo 2002/2003*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 55 str.
- Leštan D., Grčman H., Zupan M., Bačac N. 2003. Relationship of soil properties to fractionation of Pb and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination*, 12, 4: 507-522
- Lindsay W. L., Norvell W. A. 1978. Development of DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428
- Malviya R., Chaudhary R. 2006. Factors affecting hazardous waste solidification/stabilization: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 137, 1: 267-276
- MOP - Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija republike Slovenije za okolje. Tla. <http://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/tla/> (19.4.2010)

- Mršič N. 1997. Živali naših tal : uvod v pedozoologijo – sistematika in ekologija s splošnim pregledom talnih živali. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 416 str.
- Paoletti M. G., Hassall M. 1999. Woodlice (Isopoda:Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74, (1-3): 157-165
- Peters R. W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 66: 151-210
- Poljedeljci – vrnimo zemlji življenje in omogočimo sprostitev »zaklenjenih« hranil v tleh, IGM Zagorje (marec 2010).
<http://www.igm.si/html/PRODAJNI%20LETAK%20%282%29.pdf> (29. julij 2010)
- Rhoades J. D. 1982. Cation exchange capacity. V: *Methods of soils analysis. Part 2: Chemical and microbiological properties. Serie Agronomy N°9.* Madison, ASA-Ssa: 149-157
- SIST ISO 14235. Kakovost tla – Določanje organskega ogljika z oksidacijo v kromžveplovni kislini. 1995: 5 str.
- SIST ISO 11466. Kakovost tal – Ekstrakcija elementov v sledovih, topnih v zlatotopki. 1996: 6 str.
- Sket B. 2003. Raki – Crustacea. V: *Živalstvo Slovenije.* Sket B., Gogala M., Kuštar V. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 188-224
- Suhadolc M., Ruprecht J., Zupan M. 2005. Priročnik za vaje iz pedologije, za univerzitetni študij zootehnik. Ljubljana, Univerza v Ljubljani; Biotehniška fakulteta: 42 str.
- Udovič M. 2009. Dostopnost bakra, cinka, kadmija in svinca pred remediacijo onesnaženih tal in po njej. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani; Biotehniška fakulteta: 101 str.
- Udovič M., Drobne D., Leštan D. 2009. Bioaccumulation in *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) as a measure of the EDTA remediation efficiency of metal-polluted soil. *Environmental Pollution*, 157, 10: 2822-2829
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Ur. l. št. 68/96
- Yukselen A., Alpaslan B. 2001. Leaching of metals from soil contaminated by mining activities. *Journal of Hazardous Materials*, 87, (1-3): 289-300

Zulässige Grenzwerte (Richtwerte) für Schadstoffe in Klärschlamm und Boden, Umweltbundesamt (30.10.2003).
http://www.ubavie.gv.at/fileadmin/site/umweltthemen/boden/_bersicht_Richtwerte.pdf
(5.7.2010)

Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 63 str.

ZAHVALA

Zahvalila bi se rada:

- najprej Njemu, ki mi je vlival vedno novih moči in poguma v življenju
- mentorju, somentorici in recenzentki za strokovne nasvete in pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela diplome
- vsem v laboratoriju za njihovo pomoč in spodbudne besede
- vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu
- vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani in me vzpodbujali