

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Andreja ŠEKORANJA

**IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI
VRSTE *Eisenia fetida* Savigny KOT INDIKATOR
ONESNAŽENOSTI TAL S SVINCEM, CINKOM IN
KADMIJEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Andreja ŠEKORANJA

**IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI VRSTE *Eisenia fetida* Savigny
KOT INDIKATOR ONESNAŽENOSTI TAL S SVINCEM, CINKOM
IN KADMIJEM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**AVOIDANCE TEST WITH EARTHWORMS *Eisenia fetida* Savigny AS
INDICATOR CONTAMINATED SOIL WITH LEAD, ZINC AND
CADMIUM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstva – agronomija. Opravljeno je bilo na Centru za pedologijo in varstvo okolja (CPVO) Oddelka za agronomijo, Biotehniška Fakulteta, Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 4. junija 2007 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja VADNAL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

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.

Andreja Šekoranja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 631.453:549.25:504.5:591.5(497.4 Mežica) (043.2)
 KG onesnaženost tal/čiščenje tal/remediacija tal/težke kovine/svinec/cink/
 kadmij/izogibalni test/deževniki/*Eisenia fetida*/Mežica
 KK AGRIS P01/P33
 AV ŠEKORANJA, Andreja
 SA LEŠTAN, Domen (mentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
 LI 2008
 IN IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI VRSTE *Eisenia fetida* Savigny KOT
 INDIKATOR ONESNAŽENOSTI TAL S SVINCEM, CINKOM IN KADMIJEM
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP X, 30, [2] str., 4 pregl., 4 sl., 1 pril., 47 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Proučevali smo uporabnost izogibalnega testa z deževnikom vrste *Eisenia fetida* Savigny za ugotavljanje strupenosti težkih kovin v visoko onesnaženih tleh Mežiške doline pred in po remediaciji. Določili smo frakcionacijo kovin s sekvenčno ekstrakcijo, mobilnost kovin (TCLP-test) in oralno biodosegljivost kovin (PBET-test) v neremediranih in remediranih tleh. S spiranjem tal s šestimi različnimi koncentracijami EDTA (2,5, 5, 10, 20, 40 in 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA) smo dosegli gradientno zmanjšanje vsebnosti Pb, Zn in Cd v tleh. Remediacija z EDTA je bila uspešna pri odstranjevanju Pb in Cd iz tal, kjer se je pri spiranju z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA odstranilo 73 % Pb in 74 % Cd. Manj uspešna je bila odstranitev Zn, kjer se je pri spiranju z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA skupno odstranilo 23 % Zn. Zn v tleh je bil prisoten predvsem v kemijsko nedostopnih frakcijah, vezan na organsko snov in v frakciji preostanka, kar pojasnjuje njegovo majhno odstranitev iz tal. Mobilnost Zn se je po remediaciji z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA zmanjšala za 88,2 %. Koncentracije mobilnega Cd in Pb v istem obravnavanju so bile zmanjšane pod mejo detekcije. Po remediaciji tal smo proučevali izogibanje epigeične vrste deževnika *Eisenia fetida* med kontrolnimi tlemi (tla sprana z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA) in testnimi tlemi (neremedirana tla in remedirana tla z 2,5, 5, 10, 20, 40 mmol kg⁻¹ EDTA). Pričakovali smo, da se bodo deževniki izogibali testnim tlam z večjimi vsebnostmi težkih kovin v primerjavi s kontrolnimi tlemi. Rezultati so pokazali, da se deževniki niso izogibali bolj onesnaženim tlam. Iz pridobljenih rezultatov ne moremo potrditi primernost izogibalnega testa za ocenjevanje uspešnosti remediacije tal.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 631.453:549.25:504.5:591.5(497.4 Mežica)(043.2)
 CX soil pollution/soil remediation/heavy metals/lead/zinc/cadmium/avoidance
 test/earthworms/*Eisenia fetida*/Slovenia
 CC AGRIS P01/P33
 AU ŠEKORANJA, Andreja
 AA LEŠTAN, Domen
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2008
 TI AVOIDANCE TEST WITH EARTHWORMS *Eisenia fetida* Savigny AS
 INDICATOR CONTAMINATED SOIL WITH LEAD, ZINC AND CADMIUM
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO X, 30, [2] p., 4 tab., 4 fig., 1 ann., 47 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Avoidance test with epigeic earthworm species *Eisenia fetida* was studied in highly contaminated soil before and after remediation. Fractionation (using sequential extractions), mobility (Toxicity Characteristic Leaching Procedure, TCLP) and oral bioavailability were assessed as measures of metal bioavailability in soil. After soil leaching with different concentrations of EDTA (2.5, 5, 10, 20, 40 and 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA), Pb, Zn and Cd were gradually removed from the soil. Soil leaching of highly contaminated soil with 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA removed 73 %, 33 % and 74 % of Pb, Zn and Cd, respectively. Zn was mostly bound to the organic matter and in the residual fraction, which are chemically less available fractions. That explains its poor removal from the soil. Mobility of Zn after soil leaching with 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA decreased for 88.2 %. Concentrations of mobile Cd and Pb in the same treatment decreased below the limit of quantification. Avoidance test between control soil (soil leached with 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA) and test soil (contaminated soil and soil leached with 2.5, 5, 10, 20, 40 mmol kg⁻¹ EDTA) showed no avoidance. From our results we can not confirm the feasibility of using avoidance test for assessing the effectiveness of soil remediation.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VII
Kazalo prilog	VII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček	X
1 UVOD	1
1.1 POVOD	1
1.2 NAMEN IN RAZISKOVALNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 REMEDIACIJA TAL Z LIGANDI	3
2.2 UGOTAVLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL	4
2.3 DEŽEVNIKI	5
2.4 IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI	7
3 MATERIALI IN METODE DE LA	8
3.1 ANALIZA TAL	8
3.2 REMEDIACIJA TAL	8
3.3 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA TEŽKIH KOVIN	9
3.4 POSTOPEK MERITVE MOBILNOSTI ONESNAŽIL V TLEH (TCLP)	9
3.5 ORALNA BIODOSEGLJIVOST SVINCA	10
3.6 MERITVE TEŽKIH KOVIN	11
3.7 IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI <i>Eisenia fetida</i> Savigny	11
4 REZULTATI	13
4.1 REMEDIACIJA TAL	13
4.2 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA ANALIZA	16
4.3 TCLP	18
4.4 ORALNA BIODOSEGLJIVOST Pb	18
4.5 IZOGIBALNI TEST	19
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	22
5.1 RAZPRAVA	22
5.1.1 Remediacija tal	22
5.1.2 Izogibalni test	23
5.2 SKLEPI	25
6 POVZETEK	26
7 VIRI	27
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Standardne pedološke lastnosti tal in celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd v tleh pred remediacijo z EDTA.	13
Preglednica 2: Frakcionacija (%) Pb, Zn in Cd pred in po remediaciji z EDTA. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo detekcije.	17
Preglednica 3: Koncentracije Pb, Zn in Cd v TCLP ekstraktu pred in po remediaciji z EDTA. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo detekcije.	18
Preglednica 4: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni frakciji pred in po remediaciji z EDTA, določena s fiziološko osnovanim ekstrakcijskim testom (PBET). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.	19

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema fiziološko osnovanega testa biodosegljivosti (PBET) (Ruby in sod., 1996)	11
Slika 2: Priprava izogibalnega testa (foto: N. Finžgar, 2007)	21
Slika 3: Izogibanje deževnikov testnim tlom v %. ♦ označuje izogibanje deževnikov v posamezni ponovitvi (%); x označuje izogibanje deževnikov kot povprečje petih ponovitev (%); ◇ označuje zrcalno sliko izogibanja deževnikov v tleh spranih z 4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA - 4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA*	20
Slika 4: Izogibanje deževnikov testnim tlom v %. ♦ označuje izogibanje vseh deževnikov v posameznem obravnavanju ; ◇ označuje zrcalno sliko izogibanja deževnikov v tleh spranih z 4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA - 4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA*	21

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Število deževnikov v kontrolnih in testnih tleh ter % izogibanja pri posamezni ponovitvi izogibalnega testa.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Pb	svinec
Zn	cink
Cd	kadmij
Fe	železo
Ca	kalcij
Na	natrij
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
AAS	atomska absorpcijska spektrofotometrija
PBET	Physiologically Based Extraction Test
TCLP	Toxicity Characteristic Leaching Procedure
DTPA	dietilentriamin pentaocetna kislina
pH	Negativni logaritem koncentracije vodikovih [H ⁺] ionov v raztopini. Mera za kislost ali bazičnost vodnih raztopin.

SLOVARČEK

Absorbpcija	vsrkati, vsesati; vpijati, vsrkovati
Adsorpcija	vezava atomov, ionov ali molekul na površino druge snovi
Desorpcija	izločanje absorbiranih in adsorbiranih snovi
Frakcionacija	postopek, ki določa obliko kemijske vezave težkih kovin na talne delce
<i>in vitro</i>	latinski izraz za delo z neživimi snovmi
<i>in vivo</i>	latinski izraz za delo z živimi organizmi
kemoreceptor	čutilna celica ali organ, ki zaznava kemijske dražljaje
kemotaksija	odziv na kemični dražljaj
mehanoreceptor	čutnica za sprejem mehanskih dražljajev, kot so dotik, pritisk, gravitacija itn.
tigmotaksija zadrževalna kapaciteta tal	taksija, pogojena z otipavanjem, tipanjem okolice celotna količina vode, ki jo tla lahko zadržijo in ki ne steče skozi tla
zlatotopka	raztopina HCl in HNO ₃ v razmerju 3:1

1 UVOD

1.1 POVOD

V tleh so anorganska onesnažila prisotna naravno in pa kot posledica človekove dejavnosti. Naravna vsebnost kovin v tleh je odvisna predvsem od matične podlage. V splošnem je njihova vsebnost večja v kamninah vulkanskega kot sedimentnega izvora. Poleg naravnega pojavljanja kovin v tleh pa se z industrializacijo in urbanizacijo z različnimi človekovimi dejavnosti v biosfero vnaša vedno več kovin (Leštan, 2002).

Mnogi viri poročajo o močno povišanih koncentracijah kovin v biosferi povsod po svetu (Yanqun in sod., 2004; Archer in Caldwell, 2004; Vashegyi in sod., 2005). Onesnaženje tal s težkimi kovinami kot posledica industrializacije in moderne agronomske prakse predstavlja velik problem, saj so težke kovine v tleh težko razgradljive in predstavljajo dolgoročen negativen vpliv na okolje in zdravje.

V evropskem merilu je s težkimi kovinami onesnaženih nekaj milijonov ha kmetijskih zemljišč. V Sloveniji so tla razmeroma neonesnažena s težkimi kovinami, vendar imamo nekaj žarišč, med njimi tudi s Pb, Zn in Cd obremenjena Mežiška dolina (Leštan, 2002), kjer gre za točkovno onesnaževanje okolja, saj z oddaljenostjo od dimnikov onesnaženost tal s kovinami Pb, Zn in Cd pada (Druškovič, 1981; Regvar in sod., 2006).

Onesnaženost tal s kovinami predstavlja globalni problem za okolje in ljudi. Kontaminirana tla je potrebno obravnavati drugače od nekontaminiranih, potrebna je remediacija (Leštan, 2002).

Remediacija pomeni izboljšavo lastnosti degradiranih tal, predvsem tal, ki so onesnažena. Remediacijo s kovinami onesnaženih tal omogočajo tudi metode spiranje tal. Ena najbolj obetavnih metod je spiranje s pomočjo kelatnih ligandov, kot je npr. etilendiamin tetraacetna kislina (EDTA). Z njo običajno odstranimo le biodosegljive kovine, bionedosegljive kovine pa le deloma, saj so kovine v tleh vezane na različne talne frakcije, ki se razlikujejo v biodosegljivosti in so redko 100 % biodosegljive organizmom (Arnold in sod., 2003, cit. po Udovič in Leštan, 2008). EDTA odstrani kovine vezane na nesilikatne frakcije tal (Ure, 1996). Kovine po remediaciji so kemijsko stabilne, biološko nedosegljive (Nowack in sod., 2006; Finžgar in Leštan, 2007; Leštan in sod., 2008).

Deževniki zaznavajo že majhne koncentracije onesnažil v tleh in se posledično izogibajo takšnim tlom (Salminen in Sulkava, 1996; Hund-Rinke in Wiechering, 2001; Hund-Rinke in sod., 2003).

1.2 NAMEN IN RAZISKOVALNA HIPOTEZA

Namen diplomske naloge je ugotoviti, ali se uspešnost remediacije tal s spiranjem z EDTA lahko vrednoti z izogibalnim testom.

Zaradi padajočega gradienta težkih kovin v tleh po remediaciji s čedalje višjimi koncentracijami EDTA pričakujemo izogibanje deževnikov testnim tlom v prid kontrolnim.

2 PREGLED OBJAV

Nekatera onesnažila in njihove spojine so naravni del tal in posledica pedogenetskih procesov, vendar se kemizacija okolja zaradi človekove dejavnosti odraža v večji pestrosti in višji vsebnosti kemikalij v tleh. Koncentracija onesnažil v zraku in vodah se zaradi mešanja in razredčevanja zmanjšuje, medtem ko se v tleh številna onesnažila akumulirajo. Škodljivost nevarnih snovi v tleh za naravo in ljudi je odvisna od njihove toksičnosti, fizikalno-kemijskih lastnosti in lastnosti tal (Leštan, 2002).

Strupene težke kovine in drugi elementi v tleh ostajajo večinoma vezani na trdno fazo tal. Močno onesnažena tla so mrtva in izgubijo samoočiščevalno sposobnost. Taka tla so nevarna za okolje in jih je potrebno remedirati (očistiti) (Leštan, 2002).

Remediacija je odvisna od zakonodaje, ki predpisuje dovoljene vrednosti onesnažil za tla določene rabe ter od izbire metode, ki je odvisna od zahtevane stopnje očiščenja tal (Leštan, 2002).

2.1 REMEDIACIJA TAL Z LIGANDI

V grobem obstajata dva načina remediacije onesnaženih tal, in sicer remediacija z odstranitvijo onesnažil ter remediacija s stabilizacijo le-teh v tla (Rampley in Ogden, 1998). S stabilizacijo imobiliziramo onesnažila in tako zmanjšamo njihovo migracijo (Reed in sod., 1996). Nepovratno imobilizacijo onesnažil v tla dosežemo z različnimi dodatki tlom npr. cementa, apna in različnih fosfatov (Leštan, 2002).

Eden izmed načinov odstranitve onesnažil iz tal je metoda spiranja/ekstrakcije, ki obsega separacijo toksičnih kovin z raztapljanjem kovin iz trdne faze tal v talno raztopino. Z dodatkom kislin ali kelatnih ligandov (kelatov) v ekstrakcijsko raztopino povečamo mobilnost kovin v tleh in s tem povečamo učinkovitost njihovega spiranja iz tal (Peters, 1999; Leštan in sod., 2008). Kelati desorbirajo kovine iz trdne faze tal in z njimi tvorijo vodotopen kovinsko-kelatni kompleks. Pri zmanjševanju celokupne koncentracije raztopljenih kovin se je kot najbolj učinkovit kelat izkazala etilendiamin tetraocetna kislina (EDTA) (Reed in sod., 1996), ki omogoča ekstrakcijo kovin iz nesilikatne faze tal (Ure, 1996). Vendar so kovine kelatom le delno dosegljive in zato lahko le delno odstranjene, kemijsko stabilno vezane v trdno fazo tal (Nowack in sod., 2006; Finžgar in Leštan, 2007; Leštan in sod., 2008).

2.2 UGOTAVLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL

Ocenjevanje tal z vidika onesnaženosti v Sloveniji temelji na celokupni koncentraciji onesnažil v tleh (Uredba...,1996). Razklop z zlatotopko (SIST ISO 11466) je ekstrakcijska metoda, s katero merimo celokupno talno koncentracijo kovin. Z dodajanjem močnih kislin in kuhanjem sprostim vse težke kovine v tleh, torej tiste, ki so dostopne rastlinam in človeku in tiste, ki so v tleh, vendar so premočno vezane na talne delce in niso dostopne.

Celokupne vrednosti onesnažil v tleh in drugih substratih ne dajejo vpogleda v dejansko toksičnost nevarnih snovi in je ne smemo enačiti z biološko dostopno koncentracijo (Udovič in Leštan, 2008). Ta je le tisti del celokupne koncentracije onesnažil v tleh, ki jo organizem lahko privzame oz. predstavlja nevarnost za celoten ekosistem (Greebelen in sod., 2003). Biodosegljivost kovin je odvisna od lastnosti tal, kot so vsebnost organske snovi, teksture tal, vsebnost in vrsta glinenih mineralov, vsebnosti Al-, Fe- in Mn oksidov ter od prevladujočih fizikalno-kemijskih razmer v tleh, kot npr., nasičenost tal, pH in redoks potencial (Leštan in sod., 2003).

Tla sestavljajo raznolike talne frakcije, na katere se težke kovine, zaradi svojih kemijskih lastnosti, različno vežejo. Zato je pomembno ločevanje težkih kovin v posamezne frakcije. Frakcionacijo kovin določamo s sekvenčno ekstrakcijo. Sekvenčna ekstrakcija je kemijski postopek izločanja težkih kovin iz tal z zaporednimi ekstrakcijami z uporabo različnih ekstrakcijskih reagentov. Z vsako od zaporednih ekstrakcij izločimo težke kovine, ki so vezane na določeno talno frakcijo (Baćac, 2005). Oblikovane so bile različne sheme sekvenčnih ekstrakcij. Pri vseh pa gre za skoraj enak princip. Iz tal se najprej izločijo težke kovine v biološko dostopnih frakcijah (ioni kovin, raztopljeni v talni raztopini in ioni kovin izmenljivo adsorbirani na površini talnih koloidov) ter nato kovine v biološko nedostopnih frakcijah (kovine, izborjene kot karbonati, sulfati ali fosfati; kovine, koordinativno vezane na Fe- in Mn-oksidi; kovine, vezane na netopno organsko snov tal ter kovine, vključene v kristalne rešetke glinenih mineralov). V našem poizkusu je bila za meritev frakcionacije Zn, Pb in Cd v onesnaženih in remediranih tleh uporabljena delno spremenjena Tessierova sekvenčna analiza (Leštan in sod., 2003).

Za ugotavljanje potencialne toksičnosti nevarnih snovi za človeka in organizme so bile razvite številne kemijske in biološke metode, ki pa jih je potrebno pred njihovo uporabo v okoljski zakonodaji natančno ovrednotiti. Za ugotavljanje biodosegljivosti je vpeljanih veliko ekstrakcijskih testov (Jing in sod., 2004). Za ugotavljanje oralne biodosegljivosti toksičnih kovin za človeka uporabljamo fiziološko osnovane teste biodosegljivosti, ki simulirajo dogajanje v človekovih prebavilih (Udovič in Leštan, 2008). Takšen je tudi test PBET (Physiologically Based Extraction Test). PBET je *in vitro* test za ugotavljanje biodosegljivosti težkih kovin iz trdne snovi. Test temelji na fizioloških lastnostih prebavnega sistema otrok med drugim in tretjim letom starosti. Zaradi igralnih navad, ob katerih pride tudi do nenamernega zaužitja tal, so bolj izpostavljeni onesnažilom kot

odrasli (Ruby in sod., 1996; Davis in Mirick, 2006). Test ne simulira celotnega fiziološkega procesa absorpcije Pb skozi črevesni epitel, temveč le biodosegljivost Pb v človeškem želodcu in tankem črevesju.

Zaradi možnosti širjenja onesnažil po površini vode in izpiranje v podtalnico in podtalje je pomembno ugotoviti njihovo mobilnost (Udovič in Leštan, 2008). Ekstrakcijska metoda TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) meri potencial onesnaženih tal (in drugih odpadkov) za sproščanje onesnažil v okolje. Izmerjene koncentracije onesnažil v ekstraktu primerjamo z dovoljenimi predpisanimi koncentracijami. Če so vrednosti presežene, tla oz. odpadek obravnavamo kot nevaren odpadek, ki zahteva posebne pogoje deponiranja (Udovič in Leštan, 2006).

Ekstrakcija z dietilentriaminpentaocetno kislino (DTPA) (Lindsay in Norwell, 1978) je pogosto uporabljena enostopenjska ekstrakcija za ugotavljanje biodosegljivosti toksičnih kovin in mikronutrientov za rastline (Dean, 2007), ki pa je v našem poizkusu nismo izvedli.

Z ekstrakcijskimi metodami, kot so *in vitro* testi, ne pridobimo zadostnih informacij o dejanski biodosegljivosti kovin za organizme, kar lahko privede do rezultatov, ki so v nasprotju z rezultati *in vivo* testov (Kamnev in van der Lelie, 2000). Talni organizmi zaznavajo in so občutljivi na toksične kemikalije v tleh, ki imajo negativen vpliv na opravljanje primarnih funkcij in življenjski cikel talnih organizmov, zato se izogibajo onesnaženim območjem v prid manj onesnaženim. Spurgeon in Hopkin (1996) sta odkrila odsotnost deževnikov na razdalji 1 km od 6 rudnikov na jugozahodu Anglije. Na podlagi vedenjskih lastnosti talnih živali, kamor sodi tudi izogibanje onesnaženim tlam, lahko sklepamo o prisotnosti biodosegljivih onesnažil v tleh (Lukkari in sod., 2005).

2.3 DEŽEVNIKI

Med makrofavno imajo daleč največji ekološki pomen deževniki (*Lumbricidae*). Njihova koristna vloga je poznana že dolgo (Leštan, 2002). Deževniki so bili med vsemi edafskimi živalmi prvi, ki so jim priznali koristno vlogo pri tvorbi plodnih tal. Aktivni so v celotnem talnem profilu, od organskega horizonta do matične podlage, in so nepogrešljiv člen v kroženju snovi v naravi. So sekundarni razgrajevalci, ker se hranijo z bolj ali manj razgrajenimi organskimi snovmi. Njihova vloga v tleh je večstranska: talne horizonte mešajo s prenašanjem organskih snovi v globino in mineralnih delcev na površino tal, rijejo rove skozi talni profil in tako omogočajo prezračevanje tal ter pronicanje vode skozi rove – povečujejo drenažnost. Ko deževniki požirajo organske snovi, pojedjo z njimi tudi mineralne delce, v njihovih prebavilih nastajajo organsko-mineralni kompleksi; hkrati izločajo v prebavilo kalcijeve ione, ki vežejo posamezne delčke tal v tvorbe, obstojnejše proti delovanju vode, in s tem izboljšujejo sestavo ter strukturo tal. Največji pomen za tla imajo deževniki v procesih nastajanja humusa. V prsti, ki je šla skozi deževnikovo

prebavilo, je veliko več mikroorganizmov kot v drugih tleh. Deževniki dihajo s kožo, ki je močno prekrvavljena. Imajo zaprt krvožilni sistem. Krvožilje je sestavljeno iz hrbtna in ene ali dveh trebušnih žil. Pri odraslem deževniku izstopa na prednjem delu telesa žlezasta odebelitev – sedlo, ki se izoblikuje pri spolno zrelih osebkih. Namenjeno je izločanju sluzi, s katero se spolna partnerja ovijeta med ploditvijo. Površino telesa prekriva tanka kutikula. Deževniki imajo posamične mehanoreceptorje in fotoreceptorje v vsej povrhnjici, bolj zgoščeni pa so na glavini krpi. Oči in drugih bolj zapleteno zgrajenih čutil nimajo. Dobro sta razviti tigmo- in kemotaksija, ki omogočata odkrivanje hrane in zaznavanje kislosti podlage. Kemoreceptorji so razmeščeni pretežno v ustnem epitelu in na glavini krpi. Na številčnost osebkov vplivajo vlaga, temperatura, pH, matična podlaga, hrana, predvsem količina in stopnja razgrajenosti organskih snovi. Na razširjenost posameznih vrst in njihovo številčnost vpliva tudi vegetacijska odeja (Mršič, 1997).

Bioindikator je organizem, ki se na povsem specifičen način odziva na določene spremembe v okolju in jih izraža z videzom, uspevanjem in razširjenostjo (Mršič, 1997).

Deževniki so primerni bioindikatorji onesnažil zaradi (Dean, 2007):

- stalnega stika s tlemi,
- nahajajo se na kontaminiranih mestih,
- zaradi tanke kutikule lahko onesnažila vstopajo v deževnike preko celotne telesne površine,
- prisotnost kemoreceptorjev na površini telesa,
- znan je metabolizem deževnikov,
- deževniki, kot je *Eisenia fetida*, so lahko gojeni v laboratoriju in so prilagojeni na različne tipe tal.

Po Boucheju (1971, 1977, cit. po Edwards in Bohlen, 1996) delimo evropske lumbricide v tri ekološke skupine, in sicer:

- epigeični deževniki, ki živijo na površju tal pod steljo in se prehranjujejo z razgradljivo organsko snovjo. Med te vrste med drugim uvrščamo *Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida* in *Dendrobaena octaedra*;
- anepeični deževniki, ki živijo v zgornjem delu talnega horizonta in se prehranjujejo z razgradljivo organsko snovjo na površju tal ter z mineralnim delom tal. Za njih je značilno, da ponoči pridejo na površje;
- endogeični deževniki, ki živijo v mineralnem delu talnega horizonta in se prehranjujejo z mineralnim delom tal, zlasti z organsko bogatimi snovmi. Mednje uvrščamo *Octolasion tyrtaeum*.

2.4 IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI

Za ugotavljanje biodosegljivosti kovin se uporablja tudi standardiziran *in vivo* test, izogibalni test z deževniki (ISO/DIS 17512-1).

Izogibalni test je preprosta metoda, s katero na podlagi izogibanja organizmov, v našem primeru deževnikov, lahko sklepamo o kontaminiranosti tal. Osnovan je na dejstvu, da deževniki s kemoreceptorji zaznavajo onesnaženo okolje in se mu izogibajo (Edwards in Bohlen, 1996). Princip izogibalnega testa je, da so deževniki neprekinjeno izpostavljeni kontrolnim in testnim tlom in na podlagi tega lahko deževniki izbirajo za njih ugodnejša tla (Garcia in sod., 2008). Ob koncu izvajanja testa (48 ur) preštejemo število deževnikov v posameznih tleh.

Toksičnost onesnažil in njihov vpliv na deževnike lahko merimo tudi z standardnimi akutnimi in reprodukcijskimi testi. Onesnaženost tal se pri teh testih vrednoti s smrtnostjo, reprodukcijskimi spremembami, spremembo teže in ostalimi subletalnimi dejavniki (Løkke in Van Gestel, 1998). Ti testi pa ne vključujejo vedenjskih lastnosti organizma, kamor sodi tudi izogibanje onesnaženim tlom, in nenazadnje, ti testi puščajo negativne posledice na organizmu (Lukkari in sod., 2005). Standardni akutni testi so dolgotrajni in časovno zamudni. Zagotovljene morajo biti ustrezne razmere, kot so primerna temperatura, vlaga in svetloba (Yearlly in sod., 1995).

Prednosti izogibalnega testa so, da se organizmi, zaradi občutljivosti izognejo toksičnim tlom, pridobljeni so rezultati ekoloških dejavnikov, ki niso merjeni s stresom spremljajočimi akutnimi in subletalnimi testi, ter relativno enostavna izvedba (Yearlly in sod., 1996). Wentsel in Guelta (1988) sta z uporabo deževnikov dokazala, da so ti občutljivejši indikator onesnaženosti tal, kot lahko razberemo iz standardnih akutnih in subletalnih testov. Izogibalni test je preprosta metoda, ki vključuje štetje deževnikov, kjer niso potrebne drage aparature in ni časovno zamudna metoda (Yearlly in sod., 1996).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 ANALIZA TAL

Leta 1990 je po 300 letih rudarjenja prenehal delovati rudnik Pb v Mežiški dolini ($x = 489300$ m in $y = 152300$ m, Gauß-Krüger koordinatni sistem). Za proučevanje smo uporabili zgornjo plast tal (0-30 cm) iz oskrbovanega zelenjavnega vrta blizu zapuščenega svinčevega rudnika v Mežiški dolini.

Osnovne pedološke značilnosti talnih vzorcev so izmerili 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 (razmerje tla : raztopina = 1:2) izmerili pH vzorcev tal, količino organske snovi smo ugotovili s titracijo po metodi Walkley-Black, kationsko izmenjevalno kapaciteto z amonij-acetatno metodo, teksturo tal z mehansko analizo in dostopen fosfor (v obliki P₂O₅) kolorimetrično po Egner-Domingovi metodi.

3.2 REMEDIACIJA TAL

Na zraku posušena tla (4,5 kg) smo presejali skozi 5 mm sito ter jih dali v šest kolon, dimenzij 15 cm v premeru in 27 cm v višini. Plastična mrežica premera 0,2 mm je na dnu vsake kolone zadrževala tla. Tla so bila sprana z različnimi koncentracijami EDTA: 2,5, 5, 10, 20, 40 in 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA.

Pri spiranju je izpiralna raztopina (3,1 L) s pomočjo peristaltične črpalke v zaprti procesni zanki s hitrostjo pretoka 15 ml min⁻¹ 24 ur počasi krožila skozi kolone in pri tem iz tal spirala Pb, Zn in Cd in tudi vodotopne komplekse težkih kovin-EDTA. Po 24 h spiranja z izpiralno raztopino (3,1 L) smo odvzeli vzorce (25 mL) izpiralne raztopine, da smo izmerili koncentracije Pb, Zn in Cd v tej raztopini. Vsako kolono smo nato še izpirali z 80 L čiste vode v odprti procesni zanki s hitrostjo 15 ml min⁻¹, da so se iz tal sprale mobilne težke kovine in EDTA. Tla v eni izmed kolon so bila sprana v štirih zaporednih korakih (4X40 mmol kg⁻¹ EDTA). Pri vsakem spiranju je izpiralna raztopina (3,1 L) krožila skozi kolono v zaprti procesni zanki 24 ur in nato smo začeli z novo stopnjo spiranja, spiranje z novo izpiralno raztopino, ki je vsebovala 40 mmol kg⁻¹ EDTA. Sledilo je spiranje s čisto vodo kot je opisano zgoraj. EDTA v vzorcih izpiralne raztopine smo izmerili spektrofotometrično po protokolu Hamano in sod. (1993), vsebnost težkih kovin pa smo izmerili z atomskim absorpcijskim spektrofotometrom (AAS) (Perkin-Elmer 1100-B, Norwalk, ZDA) in se tako prepričali, da v tleh ni več prisotnih mobilnih težkih kovin in/ali EDTA.

3.3 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA TEŽKIH KOVIN

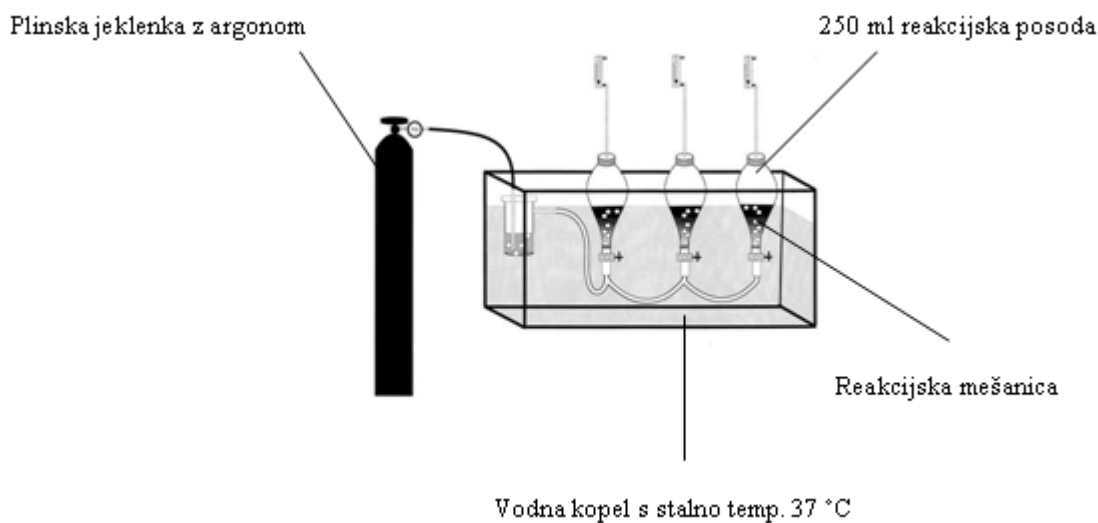
Spremenjena Tessierova sekvenčna ekstrakcija (Leštan in sod., 2003) je bila uporabljena za meritve frakcionacije Pb, Zn in Cd v šestih frakcijah. Prvo frakcijo, ione težkih kovin, raztopljenih v talni raztopini, smo pridobili z ekstrakcijo 1 g zračno posušenih tal, presejanih skozi 2 mm sito, prelitih z 10 mL deionizirane vode za 1 h. Drugo frakcijo izmenljivih ionov kovin iz talnih koloidov v talno raztopino smo ekstrahirali iz ostankov talnega vzorca predhodne frakcije, ki smo ga prelili z 10 mL 1 M magnezijevega nitrata (Mg_2NO_3) za 2 uri. Magnezijev nitrat povzroči izmenjavo elektrostatično vezanih ionov kovin na talne koloide. Tretjo frakcijo vezanih težkih kovin na karbonate smo ekstrahirali z 10 mL 1 M amonoacetata (NH_4OAc) pri pH 5 za 5 h. Amonacetat povzroči raztapljanje karbonatov (kalcit, dolomit) in obaritev (sprostitev) vezanih kovin. Četrto frakcijo koordinativno vezanih težkih kovin na Fe- in Mn-okside smo ekstrahirali z 20 ml hidroksilamino hidrokloridom $NH_2OH \cdot HCl$ pri pH 2 za 12 ur. Hidroksilamin hidroklorid povzroči zmanjšanje Fe- in Mn-oksidov v topno obliko. Peto frakcijo, težke kovine vezane na organsko snov, smo pridobili po izpostavitvi tal vročini, v 3 mL 0,002 M dušikove (V) kisline (HNO_3) in 5 ml 30 % peroksida (H_2O_2) za 3 h pri 85 °C, ki ji je sledila ekstrakcija s 15 mL 1 M amonacetata (NH_4OAc) za 3 h. Dušikova (V) kislina in peroksid (H_2O_2) povzročita oksidacijo organske snovi in sprostitve vezanih težkih kovin ter raztapljanje kovinskih sulfidov. Šesto frakcijo, frakcijo preostankov (kovin, vključenih v kristalne rešetke glinenih mineralov), pa smo pridobili v razklopu z *aqua regia* (zlatotopko), s pomočjo katere smo povzročili raztapljanje silikatov in preostalih mineralov. V vsaki frakciji smo merili koncentracije Pb, Zn in Cd v treh ponovitvah. Z seštevkom koncentracij Pb, Zn in Cd v vseh šestih frakcijah smo izmerili celotno vsebnost Pb, Zn in Cd v sekvenčni ekstrakciji.

3.4 POSTOPEK MERITVE MOBILNOSTI ONESNAŽIL V TLEH (TCLP)

S TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) vrednotimo potencialno mobilnost onesnažil iz tal in iz drugih odpadkov v okolje (US EPA, 1995). S TCLP smo ugotovili potencialno mobilnost Pb, Zn in Cd v tleh. Analizo smo izvedli v treh ponovitvah. 1 g tal smo presejali skozi 2 mm sito, ekstrahirali z 20 mL ekstrakcijske raztopine (v razmerju 1:20), ki je vsebovala 0,0992 M očetne kisline (CH_3COOH) in 0,0643 M natrijevega hidroksida (NaOH) pri pH $4,93 \pm 0,05$ za 18 ur na stresalniku pri 300 obratih min^{-1} . Po ekstrakciji smo vzorce filtrirali (Whatman št. 4), filtrat pa zakisali z 65 % dušikovo kislino (HNO_3) do pH < 2 in shranili v hladilnik pri 5 °C za meritve težkih kovin.

3.5 ORALNA BIODOSEGLJIVOST SVINCA

Fiziološko ekstrakcijski test (Physiologically Based Extraction Test, PBET) temelji na fiziološki lastnosti prebavnega sistema otrok med drugim in tretjim letom starosti (Ruby, 1996), saj je zaradi igralnih navad večja nevarnosti zaužitja tal in posledično tudi onesnažil kot pri odraslih (Davis in Mirick, 2006). PBET vsebuje 2 fazi, in sicer biodosegljivost Pb v želodcu in tankem črevesju. Želodčno fazo PBET smo simulirali z dodajanjem želodčne raztopine, ki je vsebovala 1,25 g pepsina, 0,5 g citrata, 0,5 g malata, 420 μL laktata ter 500 μL očetne kisline, raztopljene v 1 L vode pri $\text{pH } 2,50 \pm 0,05$, ki smo ga uravnali z HCl. Za analizo smo potrebovali 0,4 g zračno posušenega vzorca, presejanega skozi 250 μm sito. Pripravljeni vzorec smo v 250 μL polipropilenski posodi prelili s 40 mL želodčne ekstrakcijske raztopine in tako pripravili reakcijsko mešanico. V posodo smo dovajali inertni plin argon s pretokom 20 L h^{-1} in s tem simulirali peristaltične gibe v prebavnem traktu. Vsakih 10 min smo merili pH reakcijske mešanice in po potrebi dodajali HCl, da smo ohranjali pH pri vrednosti $2,50 \pm 0,05$. Ekstrakcija je potekala v vodni kopeli pri stalni temperaturi 37 °C. Po 1 h smo odpipetirali po 2 mL reakcijske mešanice (za analizo oralne biodosegljivosti Pb v želodčni fazi). Vzorce (2 mL) smo centrifugirali 25 min pri 2500 g min^{-1} in jih uporabili za nadaljne analize. Volumen vzorca smo nadomestili z 2 mL sveže želodčne raztopine. pH vzorca smo zvišali na vrednost 7 z natrijevim karbonatom (NaHCO_3) v dializni vrečki (8000 MWCO, spectra/Por Cellulose ester tubing). Vzorcju smo dodali 20 mg pankreatina in 70 mg žolčnega ekstrakta. Reakcijsko mešanico smo 1 h inkubirali pri 37 °C in nato odpipetirali 2 mL za analizo oralne biodosegljivosti Pb v črevesni fazi. Odpipetirane vzorce smo centrifugirali 25 min pri 2500 g min^{-1} . Supernatant smo shranili pri temperaturi 5 °C za nadaljno analizo vsebnosti Pb. Analizo smo opravili v treh ponovitvah.



Slika 1: Shema fiziološko osnovanega testa biodosegljivosti (PBET) (Ruby in sod., 1996)

3.6 MERITVE TEŽKIH KOVIN

Zračno suhe vzorce zemljine pred remediacijo s spiranjem z EDTA smo zmelili v ahatni terilnici (1 g), jih presejali čez 160 μm sito, razklopili v zlatotпки (28 mL) (SIST ISO 11466), razredčili z deionizirano vodo do končnega volumna 100 mL in izmerili celokupno vsebnost Pb, Zn ter Cd z AAS (Perkin-Elmer 1100-B, Norwalk, CT, USA). Pri razklopu smo pravilnost postopka preverili s standardnim referenčnim materialom iz HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Irdning, Avstrija (ALVA 2001 Boden 1). Doseženi odstotek je znašal za Pb $105,7 \pm 5,9$, Zn $108,3 \pm 12,7$ in za Cd $104,9 \pm 30,1$. Zaznavna meja (LOQ) je znašala za Pb $0,25 \text{ mg L}^{-1}$, Zn $0,018 \text{ mg L}^{-1}$ in za Cd $0,028 \text{ mg L}^{-1}$. Slepri vzorec in analitične duplikate smo uporabili, kjer je bilo primerno za zagotovitev natančnosti v analizi.

3.7 IZOGIBALNI TEST Z DEŽEVNIKI *Eisenia fetida* Savigny

Za poizkus smo uporabili okrogle plastične posode s prostornino 2 L, premera 16 cm, ki smo jih z razdelilcem razdelili na dva enaka dela. V posode smo na eno polovico dali 300 g testnih tal (onesnažena tla in remedirana tla z 2,5, 5, 10, 20, 40 mmol kg^{-1} EDTA), na drugo stran pa 300 g kontrolnih tal (remedirana tla z 4X40 mmol kg^{-1} EDTA). Poizkus smo izvedli v 5 ponovitvah. Tla smo presejali skozi 2 mm sito in jih navlažili na 60 % max. zadrževalne kapacitete tal.

Deževnike *Eisenia fetida* Savigny smo pridobili iz kontroliranega gojišča (Biobrazda d.o.o.). Deževnike smo ohranjali v temi, pri konstantni temperaturi 20 °C in 80-odstotni relativni zračni vlagi. Za poizkus smo izbrali spolno dozorele deževnike, ki imajo razvito sedlo in pubertetne izboklinice. Izbrane deževnike smo predhodno očistili z vodo in jih za

1 dan, zaradi prilagajanja, držali v kontrolnih tleh. Po enem dnevu prilagajanja smo deževnike zopet sprali z vodo in stehali. Povprečna teža deževnikov pred vnosom v poizkusno posodo je bila $0,28 \pm 0,06$ g.

Po odstranitvi delilca v posodi smo na razmejitveno linijo vstavili 10 deževnikov. Posode smo zaprli s papirnato brisačo, tako da je bila omogočena prosta izmenjava plinov med tlemi in zrakom ter dostop svetlobe z zgornje strani.

Zaprte posode smo zaprli v komoro, kjer je potekal dnevno/nočni cikel - 12h/12h. Dnevna temperatura je znašala 22 °C, nočna pa 15 °C.

Po 48 urah smo v posode vstavili delilec. Vstavili smo ga že v komori, preden smo posode vzeli iz kontroliranega okolja. Sledilo je štetje deževnikov na obeh polovicah.

Izogibalni test smo opravili v petih ponovitvah. Pri vsaki ponovitvi smo izračunali izogibanje (A) deževnikov po sledeči enačbi:

$$A = [(C-T)/N] * 100, \quad \dots(1)$$

kjer C = število deževnikov v kontrolnih tleh, T = število deževnikov v testnih tleh, N = skupno število deževnikov. Po vseh opravljenih meritvah smo izračunali izogibanje (%) v posamezni ponovitvi, povprečje izogibanja v posameznem obravnavanju ter % izogibanja vseh deževnikov v posameznem obravnavanju.

Pozitivni odgovor (+) kaže na izogibanje deževnikov testnim tlam, negativni odgovor (-) pa ne kaže izogibanja deževnikov na prisotnost onesnažil v tleh. Testna tla, v katerih je prisotnih manj kot 20 % deževnikov, se obravnavajo kot tla z omejeno habitatno funkcijo (ISO/DIS 17512-1).



Slika 2: Priprava izogibalnega testa (foto: N. Finžgar, 2007)

4 REZULTATI

4.1 REMEDIACIJA TAL

Standardne pedološke lastnosti tal pred remediacijo in celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd so podane v Preglednici 1.

Remediacija tal z EDTA je zmanjšala vsebnost kovin v analiziranih tleh. Z uporabo raztopin s šestimi različnimi koncentracijami EDTA (2,5, 5, 10, 20, 40 in 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA) smo dosegli gradientno zmanjšanje vsebnosti Pb, Zn in Cd v tleh. Z remediacijo smo odstranili 6, 13, 41, 45, 54 in 73 % začetnega Pb, 3, 4, 13, 15, 20 in 23 % začetnega Zn in 17, 33, 54, 61, 66 in 74 % začetnega Cd v posameznih obravnavanjih. Remediacija z EDTA je bila uspešna pri odstranjevanju Pb in Cd iz tal, manj uspešna je bila remediacija Zn. Po izpiranju remediranih tal z 80 L čiste vode ni bilo več zaznati prisotnost Pb, Zn, Cd in EDTA.

Po remediaciji se je pH zvišal in vsebnost organske snovi zmanjšala. Ob primerjavi pH in organske snovi po remediaciji s spiranjem z različnimi koncentracijami EDTA ni prišlo do bistvenih sprememb.

Preglednica 1: Standardne pedološke lastnosti tal in celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd v tleh pred remediacijo z EDTA.

	pH	P ₂ O ₅ (mg 100g ⁻¹)	K ₂ O (mg 100g ⁻¹)	Org. snov (%)	C/N razmerje	* Teksturni razred	CEC (mmol C ⁺ 100g ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
Onesnažena tla	6,6	150,4	27,8	13,8	11,8	I	51,2	4602±94	1826±61	30,4 ± 0,3

* Teksturni razred: I - ilovica

4.2 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA ANALIZA

Rezultati frakcionacije Pb, Zn in Cd pred in po remediaciji s spiranjem z EDTA so podani v Preglednici 2. Pred remediacijo je bil večji del Pb vezan na karbonate in organsko snov. Spiranje z EDTA je odstranilo do 85 % Pb vezanega na karbonate in do 75,4 % Pb, vezanega na organsko snov. Večina Zn je bila vezanega na organsko snov in na frakcijo preostanka, vendar le manjši del na najbolj dosegljivi frakciji, frakcijo talne raztopine in izmenljivo frakcijo (2,1 % celotnega Zn), kar do neke mere pojasni učinkovitost EDTA pri odstranjevanju Zn iz teh tal. Po pričakovanjih je bil Zn uspešno odstranjen iz frakcije »vezanega« na karbonate (do 87,9 % od skupno vezanega Zn na karbonate) in na Fe in Mn-oksido (do 87,2 % od skupno vezanega Zn na Fe in Mn-oksido). Večji del Cd je bilo vezanega na karbonate in organsko snov, vendar je bil uspešno odstranjen iz vseh ostalih frakcij, razen iz frakcije preostanka.

Preglednica 2: Frakcionacija (%) Pb, Zn in Cd pred in po remediaciji z EDTA. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo detekcije.

	I	II	III	IV	V	VI
Pred remediacijo						
Pb(%)	LOQ	0,3±0,0	29,2±2,9	0,4±0,0	63,5±1,3	6,6±0,2
Zn(%)	0,1±0,0	2,0± 0,0	19,0±0,8	3,1±0,3	30,8±0,8	45,1±3,9
Cd(%)	LOQ	7,6±0,1	48,0±0,9	9,4±0,2	30,4±0,4	LOQ
Po remediaciji						
2,5 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	LOQ	LOQ	24,3±0,5	0,5±0,0	64,9±9,0	10,3±1,8
Zn(%)	0,04±0,0	1,0±0,0	11,2±0,2	3,2±0,3	31,4±1,3	53,3±2,8
Cd(%)	LOQ	3,9±0,2	38,7±0,4	9,2±0,6	34,6±2,7	13,1±2,1
5 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	LOQ	0,1±0,0	27,0±2,3	0,5±0,1	59,4±0,1	13,0±2,3
Zn(%)	LOQ	0,8±0,0	10,6±0,5	3,0±0,3	28,9±3,4	56,7±4,3
Cd(%)	0,9±0,0	3,5±0,0	37,7±1,3	8,4±0,2	35,9±3,7	13,5±0,8
10 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	0,2±0,1	0,1±0,0	23,0±0,5	0,5±0,1	67,8±6,5	14,4±4,1
Zn(%)	0,04±0,0	0,4±0,0	8,3±0,9	2,2±0,0	31,8±2,1	57,3±2,4
Cd(%)	LOQ	2,7±0,3	34,6±0,9	8,5±0,6	41,3±2,5	15,2±3,8
20 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	LOQ	0,1±0,0	20,0±1,5	0,4±0,0	65,2±4,3	14,2±0,7
Zn(%)	LOQ	0,2±0,0	5,9±0,3	1,6±0,0	31,1±0,2	61,1±2,4
Cd(%)	LOQ	2,0±0,2	27,1±1,0	7,1±0,3	43,6±1,1	19,8±0,4
40 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	0,2±0,1	LOQ	18,1±1,5	0,5±0,3	64,7±9,2	16,4±3,5
Zn(%)	0,1±0,0	0,2±0,0	4,3±0,1	1,2±0,1	30,5±3,5	63,7±3,9
Cd(%)	LOQ	LOQ	24,8±1,8	5,8±0,2	43,2±6,2	23,2±2,2
4X40 mmol kg ⁻¹						
EDTA						
Pb(%)	LOQ	LOQ	18,5±0,4	LOQ	65,7±4,8	15,6±2,1
Zn(%)	0,1±0,0	0,1±0,0	2,4±0,1	0,6±0,0	30,9±2,1	66,0±4,9
Cd(%)	LOQ	LOQ	16,9±0,4	4,3±0,7	46,7±2,5	29,3±3,4

I – v talni raztopini; II – izmenljiva; III – vezana na karbonate; IV – vezana na Fe- in Mn-okside;
V – vezana na organsko snov; VI – frakcija preostanka

4.3 TCLP

Mobilnost Pb, Zn in Cd pred in po remediaciji smo določili s TCLP. Izmerjeni rezultati, podani v Preglednici 3, niso dosegli mejne vrednosti po US EPA (1995), ki znašajo za Pb 5 mg L⁻¹, Zn 250 mg L⁻¹ in Cd 1 mg L⁻¹. Spiranje z EDTA je zmanjšalo delež mobilnega Pb, Zn in Cd v tleh. Koncentracije mobilnega Zn, izmerjenega s TCLP v tleh remediranih z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA, se je zmanjšala za 88,2 % v primerjavi s koncentracijo mobilnega Zn v neremediranih tleh. Koncentracije mobilnega Cd in Pb v istem obravnavanju so bile zmanjšane pod mejo zaznave.

Preglednica 3: Koncentracije Pb, Zn in Cd v TCLP ekstraktu pred in po remediaciji z EDTA. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. LOQ, pod mejo detekcije.

TLA	Pb (mg L ⁻¹)	Zn (mg L ⁻¹)	Cd (mg L ⁻¹)
Pred remediacijo	1,11±0,04	2,12±0,11	0,09±0,01
Po remediaciji			
2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	0,95±0,01	1,55±0,04	0,06±0,00
5 mmol kg ⁻¹ EDTA	0,83±0,09	1,41±0,13	0,06±0,00
10 mmol kg ⁻¹ EDTA	0,66±0,03	1,04±0,07	0,03±0,00
20 mmol kg ⁻¹ EDTA	0,38±0,03	0,56±0,02	LOQ
40 mmol kg ⁻¹ EDTA	0,38±0,03	0,42±0,01	LOQ
4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA	LOQ	0,25±0,03	LOQ

4.4 ORALNA BIODOSEGLJIVOST Pb

S spiranjem z EDTA se je zmanjšala tudi oralna-biodosegljivost Pb, izmerjenega s PBET (Preglednica 4). Analiza je pokazala, da se je oralna-biodosegljivost po remediaciji v želodčni fazi glede na začetno vrednost zmanjšala pri vseh koncentracijah EDTA, razen pri 2,5 mmol kg⁻¹ EDTA, kjer se je povečala za 20,1 %. Pri spiranju z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA se je oralna biodosegljivost zmanjšala za 87,6 %.

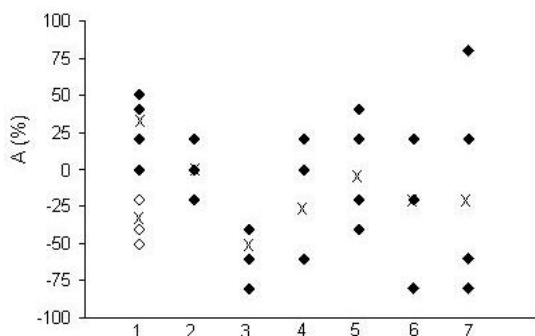
V fazi tankega črevesa se je oralna-biodosegljivost glede na začetno vrednost pri vseh spiranjih z EDTA zmanjšala. Pri spiranju z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA se je oralna biodosegljivost zmanjšala za 83,6 % od začetne biodosegljivosti Pb v fazi tankega črevesa.

Preglednica 4: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni frakciji pred in po remediaciji z EDTA, določena s fiziološko osnovanim ekstrakcijskim testom (PBET). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom.

TLA	PBET Pb (mg kg ⁻¹)	
	Želodčna faza	Faza tankega črevesa
Pred remediacijo	760,9 ± 47,9	328,4±63,9
Po remediaciji		
2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	913,8±350,9	169,9±77,8
5 mmol kg ⁻¹ EDTA	305,6±35,5	214,6±97,7
10 mmol kg ⁻¹ EDTA	275,8±28,3	127,2±60,4
20 mmol kg ⁻¹ EDTA	291,5±77,36	133,0±63,0
40 mmol kg ⁻¹ EDTA	238,1±90,3	40,4±23,8
4 X 40 mmol kg ⁻¹ EDTA	94,7±4,2	53,9±26,6

4.5 IZOGIBALNI TEST

Izogibanje deževnikov smo izrazili v odstotkih izogibanja deževnikov testnim tlom v posamezni ponovitvi in kot povprečje petih ponovitev (Slika 3). Iz povprečja petih ponovitev lahko zaključimo, da deževniki v obravnavanju 2 (Slika 3) ne izbirajo med tlemi remediranimi z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA in onesnaženimi tlemi. V celoti gledano je v vseh primerih povprečna vrednost izogibanja negativna, kar pomeni, da je po 48 urni izpostavitvi več deževnikov na bolj onesnaženih tleh. Za primerjavo smo izvedli poizkus, kjer so bila kontrolna in testna tla remedirana z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA. Pričakovali smo izogibanje deževnikov okoli 0 %, vendar se je izkazalo, da je bila povprečna vrednost izogibanja 30 % in -30 %. Rezultat je podan kot negativna in pozitivna vrednost, saj je bilo v tem primeru proučevanje izogibanja med kontrolnimi tlemi. Med tlemi, ki so remedirana z nižjimi in višjimi koncentracijami EDTA v izogibanju ni razlik.



Slika 3: Izogibanje deževnikov testnim tlom v %. ◆ označuje izogibanje deževnikov v posamezni ponovitvi (%); x označuje izogibanje deževnikov kot povprečje petih ponovitev (%); ◇ označuje zrcalno sliko izogibanja deževnikov v tleh spranih z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA*

* tla sprana z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA v našem poizkusu predstavljajo kontrolna tla in v primeru 1 smo proučevali izogibanje deževnikov med kontrolnimi tlemi; rezultat lahko podamo kot pozitivno in negativno vrednost

1 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA

2 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - onesnažena tla

3 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA

4 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - 5 mmol kg^{-1} EDTA

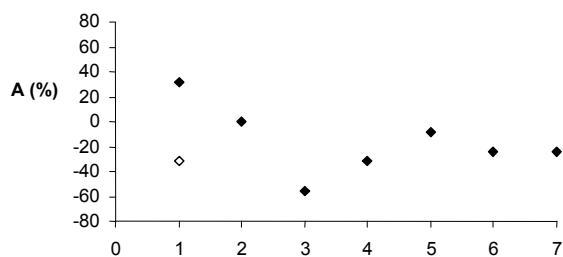
5 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - 10 mmol kg^{-1} EDTA

6 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - 20 mmol kg^{-1} EDTA

7 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA - 40 mmol kg^{-1} EDTA

A – izogibanje (%)

Izogibanje deževnikov ni bilo izrazitejše pri tleh remediranih z nižjimi koncentracijami EDTA. Izračunali smo tudi izogibanje, kjer smo združili število deževnikov v petih ponovitvah v posameznem obravnavanju in na ta način izračunali izogibanje deževnikov testnim tlom (Slika 4). Iz tako pridobljenih rezultatov smo prišli do enakih zaključkov, kot v zgoraj navedenem primeru (Slika 3). Tudi tu se deževniki niso izogibali bolj onesnaženim tlom. V obravnavanju 2 (Slika 4) deževniki ne izbirajo med tlemi, remediranimi z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA in onesnaženimi tlemi. V celoti gledano je v vseh primerih vrednost izogibanja negativna, kar pomeni, da je več deževnikov po 48 urni izpostavitvi na bolj onesnaženih tleh. V obravnavanju, kjer so bila kontrolna in testna tla remedirana z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA je bila vrednost izogibanja 30 % in -30 %. Rezultat je podan kot negativna in pozitivna vrednost, saj je bilo v tem primeru proučevanje izogibanja med kontrolnimi tlemi. Med tlemi, ki so remedirana z nižjimi in višjimi koncentracijami EDTA, v izogibanju ni razlik.



Slika 4: Izogibanje deževnikov testnim tlom v %. ◆ označuje % izogibanja vseh deževnikov v posameznem obravnavanju; ◇ označuje zrcalno sliko izogibanja deževnikov v tleh spranih z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ *

* tla sprana z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ v našem poizkusu predstavljajo kontrolna tla in v primeru 1 smo proučevali izogibanje deževnikov med kontrolnimi tlemi; rezultat lahko podamo kot pozitivno in negativno vrednost

1 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

2 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - onesnažena tla

3 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $2,5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

4 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $5 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

5 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $10 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

6 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $20 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

7 - $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$ - $40 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ EDTA}$

A – izogibanje (%)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Remediacija tal

Industrijsko onesnažena tla z Pb, Zn in Cd smo spirali z EDTA, da bi zmanjšali vsebnost kovin. Vsebnost Pb, Zn in Cd v tleh v našem primeru (Žerjav) je posledica dolgoletnega delovanja rudnika (Vidic in sod., 2006).

Ob primerjavi rezultatov remediacije v naši raziskavi s kritično mejo vsebnosti kovin v slovenski zakonodaji (Pb 530 mg kg⁻¹, Zn 720 mg kg⁻¹, Cd 12 mg kg⁻¹) (Uredba...,1996), lahko zaključimo, da je bila remediacija uspešna, predvsem pri odstranjevanju Cd. Pričakovali smo, da bo višja koncentracija EDTA pri odstranjevanju kovin bolj učinkovita kot nižja koncentracija. Najbolj obsežno spiranje z EDTA je zmanjšalo vsebnost koncentracije Cd pod kritično mejo.

V nasprotju s slednjim pa so koncentracije Pb tudi po remediaciji z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA ostale nad kritično mejo, čeprav se je spralo 73 % skupnega Pb. To lahko pripišemo visoki onesnaženosti tal s Pb in deležu Pb, ki ligandu ni bil dosegljiv. Nizki odstotki odstranjenega Zn pri vseh spiranjih z EDTA, v primerjavi z odstotki odstranjenega Pb in Cd, lahko razložimo z manjšo stabilnostno konstanto kompleksa Zn-EDTA (Sun in sod., 2001) in zaradi razlik pri desorpciji kovin (Finžgar in Leštan, 2007). Eden izmed razlogov, da se je Zn težje spiralo z EDTA je, da je večji del Zn prisoten v frakciji preostanka (Preglednica 2), saj je ekstrakcija težkih kovin z EDTA uspešnejša pri vodotopnih, izmenljivih in na karbonate vezanih kovinah (Peters, 1999).

Učinkovitost remediacije ugotavljamo tudi z mobilnostjo in biodosegljivostjo kovin. Na potencialne učinke toksičnosti kovin lahko sklepamo na podlagi celokupne koncentracije kovin, vendar na podlagi le-te ne moremo določiti mobilnosti in biodosegljivosti kovin (Sabienė in Brazauskienė, 2004; Basta in Gradwohl, 2000).

Z metodo TCLP smo merili mobilnost težkih kovin v tleh pred in po remediaciji z EDTA. Mobilnost težkih kovin, kot tudi drugih onesnažil, vpliva na njihovo izpiranje iz tal v površinske in podzemne vodne vire, kar pomeni povečano tveganje za tam živeče organizme in za vnos v prehransko verigo. Koncentracije Pb, Zn in Cd v ekstraktih tal pred in po remediaciji z EDTA so bile pod mejnimi vrednostmi (Preglednica 2) in so se po remediaciji še zmanjšale, zaradi česar obravnavanih tal po US EPA (1995) ne uvrščamo med nevarne odpadke.

Zaužitje tal in prašnih delcev predstavlja pomembno obliko izpostavljanja v okolju prisotnim onesnažilom preko aktivnosti na odprtem, rekreacije, vrtnarjenja, prehranjevanja z lokalno pridelano hrano in vdihovanja prašnih delcev (Davis in Mirick, 2006). Pri PBET

s poustvarjanjem primernih razmer simuliramo dogajanje v prebavnem traktu človeka (v želodcu in črevesju). Po remediaciji se je biodosegljivost Pb v želodčnem ekstraktu pri vseh spiranjih z EDTA zmanjšala (Preglednica 4), razen iz nam neznanih razlogov, zvišala pri spiranju z 2,5 mmol kg⁻¹ EDTA. V črevesnem ekstraktu se je biodosegljivost Pb zmanjšala pri vseh spiranjih z EDTA.

5.1.2 Izogibalni test

S kemijsko ekstrakcijo tal ne moremo nadomestiti *in vivo* testov biodosegljivosti, zaradi zapletenosti in dinamičnosti bioloških sistemov (Basta in Gradwohl, 2000).

Deževniki, ki so izpostavljeni škodljivim koncentracijam težkih kovin v tleh, težje opravljajo svojo primarno funkcijo (Edwards in Bohlen, 1996). Z regulacijo težkih kovin v telesu in z izogibanjem v manj kontaminirana tla se zmanjša vpliv toksičnosti težkih kovin na deževnike (Lukkari in sod., 2005).

Rezultati raziskav so pokazali, da se deževnik *Eisenia fetida* in deževnik *Lumbricus terrestris* izogibata tlom, onesnaženim z nekaterimi organskimi snovmi, kot so benomil, trinitrotoluen in nekaterim fungicidom in pesticidom (Slimak, 1997; Hund-Rinke in sod., 2003, Schaefer, 2003). Yeardeley in sod. (1996) so dokazali izogibanje deževnika *Eisenia fetida* tlom, onesnaženim z KCl in NH₄Cl, ne pa tudi izogibanje tlom, onesnaženim z 2-kloroacetamidom. Za ta poizkus so uporabili neonesnažena tla, kjer so dodajali toksične soli, deževniki pa predhodno niso bili izpostavljeni toksičnim tlom, tako da niso bili adaptirani na onesnažena tla. Visoka občutljivost in izogibanje deževnikov je bilo odkrito tudi v študijah s ksenobiotiki (Hund-Rinke in Wiechering, 2001; Schaefer, 2003). Hund-Rinke in sod. (2005) so proučevali izogibanje deževnika *Eisenia fetida* v različno onesnaženih peščenih in glinenih tleh s tributiltinom (TBT), trinitrotoluolom (TNT) in pentaklorofenolom (PCP) in dokazali večje izogibanje tlom z višjimi koncentracijami onesnažil. Hund-Rinke in sod. (2005) so proučevali tudi izogibanje deževnika *Eisenia fetida* v peščenih tleh, onesnaženimi z različnimi koncentracijami Cu, in izogibanje deževnikov v glinenih tleh, onesnaženimi z različnimi koncentracijami Cd. V tleh, onesnaženih z Cu, je bilo izogibanje deževnikov skoraj 100 % v prid kontrolnim tlom, ne glede na koncentracijo vsebnosti Cu v tleh. V glinenih tleh, onesnaženih z različnimi koncentracijami Cd, se je izogibanje stopnjevalo z naraščanjem vsebnosti Cd v tleh. Organske substance so bile dodane tlom v obliki acetona, težke kovine pa so bile raztopljene v vodi in tako dodane tlom. Deževniki so bili gojeni v laboratoriju, tako da niso bili predhodno izpostavljeni toksičnim tlom.

Po standardu ISO/DIS 17512-1 se za proučevanje izogibanja uporablja deževnik *Eisenia fetida*. Zato smo za proučevanje izogibalnega testa izbrali to vrsto deževnikov, ki so bili pridobljeni iz kontroliranega gojišča (Biobrazda d.o.o.) in tako niso bili predhodno v stiku s toksičnimi tlemi. Po remediaciji tal so se vrednosti oralne biodosegljivosti in mobilnosti v primerjavi z onesnaženimi tlemi zmanjšale, najbolj v tleh, spranih z 4X40 mmol kg⁻¹

EDTA, zato smo ta tla izbrali kot kontrolna tla, saj predstavljajo najbolj »čista tla« med ostali tlemi v danem poizkusu. Pričakovali smo, da bodo deževniki zaznali manjšo koncentracijo težkih kovin in se tako izogibali bolj onesnaženim tlom. Po opravljenem poizkusu se naša hipoteza ni potrdila. Deževniki so se izogibali tudi kontrolnim tlom, ki so bila remedirana z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA. Možno je, da deževniki s kemoreceptorji ne zaznavajo elementov v določenih kemijskih oblikah in tako ne morejo zaznati nevarnih kontaminantov oz. kontaminiranih tal (Lukkari in sod., 2005).

V literaturi so izogibanje deževnikov proučevali tako, da so čista tla umetno onesnažili z dodajanjem toksične snovi v obliki raztopine in nato tla homogenizirali. V našem poizkusu pa smo visoko onesnažena tla spirali z EDTA in jih na ta način »očistili« biodosegljivih oblik težkih kovin. Tako so se lahko z EDTA, poleg težkih kovin, spirala tudi mikrohranila oz. določeni elementi, kot so Fe, Ca in Na, ki jih nismo izmerili pred in po remediaciji, vendar imajo pomembno vlogo pri življenju v tleh. Možno je tudi, da se je med remediacijo tal EDTA vezala v trdno fazo tal in tako postala nedosegljiva tudi po končnem izpiranju z 80 L čiste vode. Čeprav v literaturi ni podatkov o negativnem vplivu EDTA na organizme, bi le-ta lahko vplivala na izogibanje deževnikov.

pH in vsebnost organske snovi se po remediaciji med posameznimi spiranji z EDTA nista bistveno razlikovali, tako da ta dva parametra nista vplivala na izogibanje deževnikov.

Stresa pri deževnikih ni bilo zaznati. Deževniki se niso zbirali v skupke, so se prosto gibali, vsi deževniki so bili prisotni v zemlji (jih ni bilo na stenah posod). Tudi smrtnosti deževnikov ni bilo zaznati, saj je pri vseh ponovitvah umrl le en deževnik.

Na podlagi tega lahko sklepamo, da izogibalni test z deževniki *Eisenia fetida* ni primeren za ugotavljanje biodosegljivosti težkih kovin, ki v tleh preostanejo po remediaciji tal z EDTA.

Iz pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da bi bilo smiselno povečati število ponovitev in podaljšati čas izpostavljenosti deževnikov kontrolnim in testnim tlom. Na to nakazuje dejstvo, da so se tudi v obravnavanju kontrola – kontrola deževniki neenakomerno porazdelili. Morda bi bilo smiselno v eni ponovitvi uporabiti večje število deževnikov (ne 10, ampak 40-50).

Variabilen odziv deževnikov na izogibanje v našem poizkusu kaže na to, da bi bilo potrebno prirediti eksperimentalne razmere.

5.2 SKLEPI

Izogibalni test z deževniki se v našem primeru ni izkazal kot ustrezna metoda, s katero bi na podlagi izogibanja deževnikov lahko sklepali o onesnaženosti tal s težkimi kovinami. Glede na rezultate, ki se nanašajo na remedirana tla, ne moremo potrditi zaključkov drugih raziskav o potencialni splošni uporabnosti izogibalnega testa za oceno onesnaženosti tal.

Glede na postavljeno hipotezo ne moremo potrditi, da deževniki, kot bioindikatorji, splošno reagirajo (se izogibajo) onesnaženim tlam s težkimi kovinami. Vendar nismo opazili, da ima remediacija onesnaženih tal s težkimi kovinami bistven vpliv na življenje deževnikov. Potrebne so dodatne raziskave, ki bi natančneje pokazale na morebitno uporabnost izogibalnega testa v primeru remediranih tal.

6 POVZETEK

Mnogi viri poročajo o močno povišanih koncentracijah kovin v biosferi povsod po svetu (Yanqun in sod., 2004; Archer in Caldwell, 2004; Vashegyi in sod., 2005). Onesnaženje tal s težkimi kovinami kot posledica industrializacije in moderne agronomske prakse predstavlja velik problem, saj so težke kovine v tleh težko razgradljive in predstavljajo dolgoročen negativen vpliv na okolje in zdravje. Tla so vir hrane za človeka, zato je potrebno onesnažena tla remidirati. V raziskavi smo uporabili remediacijsko metodo izpiranja tal z ligandom, etilendiamin tetraocetno kislino, EDTA.

Poleg celokupne koncentracije je za toksičnost onesnažil v tleh pomembna tudi njihova mobilnost (in s tem njihovo spiranje iz tal) in njihova biodosegljivost. Zaradi praktičnih razlogov (visoka cena kelatnih ligandov in delna učinkovitost pri odstranjevanju težkih kovin, močno vezanih v tla) je cilj remediacije tal zmanjšanje toksičnega dela težkih kovin v tleh (zmanjšanje njihove mobilnosti, fito- in bio- dosegljivosti), čeprav jih iz tal popolnoma ne odstranimo.

Tla iz Žerjavskih vrtov (Mežiška dolina) smo remedirali s spiranjem z različnimi koncentracijami EDTA. Učinkovitost remediacije smo ugotavljali s primerjavo frakcionacije Pb, Zn in Cd (določenih s šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo), mobilnosti Pb, Zn in Cd (s »Toxicity Characteristic Leaching Procedure«, TCLP metodo) in oralne-biodosegljivosti Pb (določene s fiziološko osnovanim testom biodosegljivosti, PBET) v neremediranih in remediranih tleh. Učinkovitost remediacije v smislu vpliva na talne organizme smo testirali s standardiziranim izogibalnim testom z deževnikom *Eisenia fetida*. Izogibanje smo ocenili s primerjavo kontrolnih tal, ki so bila sprana z 4X40 mmol kg⁻¹ EDTA in testnih tal (neremedirana tla in remedirana tla z 2,5, 5, 10, 20, 40 mmol kg⁻¹ EDTA). Deževniki so na ta način izbrali za njih ustrežnejša tla.

V nekaterih raziskavah (Yeardley in sod., 1996; Hund-Rinke in sod., 2005) so prišli do zaključka, da je izogibalni test z deževniki primerna metoda določanja onesnaženosti tal. Naši rezultati pa so v nasprotju s temi ugotovitvami, saj se izogibalni test ni izkazal kot primerna metoda za oceno uspešnosti remediacije, saj izogibanje ni bilo v nobenem primeru dovolj izrazito. Iz naše raziskave je razvidno, da izogibalni test ne more nadomestiti *in vitro* testov pri oceni biodosegljivosti in s tem uspešnosti remediacije tal.

Potrebne bodo še dodatne raziskave za razumevanje izogibalnega testa in za oblikovanje *in vivo* testov, s katerimi bomo lahko ocenili onesnaženost tal in uspešnost remediacije le-teh.

7 VIRI

- Archer M.J.G., Caldwell R.A. 2004. Response of six Australian plant species to feavy metal contamination at an abandoned mine site. *Water, Air and Soil Pollution*, 157: 257-267
- Baćac N. 2005. Vpliv nekaterih talnih lastnosti na frakcionacijo svinca in cinka v onesnaženih tleh Celjske regije. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 48 str.
- Basta N., Gradwohl R. 2000. Estimation of Cd, Pb and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *Journal of Soil Contamination*, 9: 149-164
- Davis S., Mirick D.K. 2006. Soil ingestion in children and adults in the same family. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 16: 63-75
- Dean. J.R. 2007. Bioavailability, Bioaccessebility and Mobility of Environmental Contaminants. Newcastle, John Wiley and Sons, Ltd: 292 str.
- Druškovič B. 1985. Spremembe rastlinskih populacij v okolici topilnice svinca. *Biološki vestnik*, 33, 2: 23-38
- Edwards C.A., Bohlen P.J. 1996. Biology and ecology of earthworms. 3. izdaja. London, Chapman and Hall: 426 str.
- Finžgar N., Leštan D. 2007. Multi-step leaching of Pb and Zn contaminated soils with EDTA. *Chemosphere*, 66: 824-832
- Garcia M., Römbke J., de Brito M.T., Scheffcsyk A. 2008. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical condition. *Environmental Pollution*, 153: 450-456
- Greebelen W., Adriano D.C., van der Leile D., Mench M., Carleer R., Clijsters H., Vangronsveld J. 2003. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant Soil*, 249: 217-228
- Hamano T., Mitsuhashi Y., Kojima N., Aoki N. 1993. Sensitive spectrophotometric method for the determination of ethylenediammetetraacetic acid in foods. *Analyst*, 118: 909-912
- Hund-Rinke K., Wiechering H. 2001. Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. *J Soils & Sediments*, 1: 15-20

- Hund-Rinke K., Achazi R., Römbke J., Warnecke D. 2003. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. *J Soils & Sediments*, 1: 7-12
- Hund-Rinke K., Lindemann M., Simon M. 2005. Experiences with Novel Approaches Testing Alternatives. *J Soils & Sediments*, 1: 1-7
- ISO/DIS 17512-1. Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). 2005:20 str.
- Jing C., Meng X., Korfiatis G.P. 2004. Lead leachability in stabilized/solidified soil samples evaluated with different leaching tests. *Journal of Hazardous Materials*, 114:101-110
- Kamnev A.A., van der Lelie D., 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports*, 20: 239-258
- Leštan D. 2002. Ekopedologija. Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 277 str.
- Leštan D., Grčman H., Zupan M., Bačac N. 2003. Relationship of soil properties to fractionation of P and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination*, 12,4: 507-522
- Leštan D., Luo C., Li X. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153: 3-13
- Lindsay W.L., Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428
- Løkke H., Van Gestel C.A.M. 1998. *Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.: 282 str.
- Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A., Haimi J. 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology*, 30: 133-146
- Mršič N. 1997. *Živali naših tal*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 416 str.
- Nowack B., Rainer S., Brett H.R. 2006. A critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environmental Science & Technology*, 40: 5225-5232

- Peters R.W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 66: 151-210
- Rampley C.G., Ogden K.L. 1998. Preliminary studies for removal of lead from surrogate and real soils using a water soluble chelator: adsorption and batch extraction. *Environmental Science & Technology*, 32, 7: 987-993
- Reed B.E., Carriere P.C., Moore R. 1996. Flushing of a Pb(II) contaminated soil using HCl, EDTA, and CaCl₂. *Journal of Environmental Engineering*, 122, 1: 48-50
- Regvar M., Vogel K., Kugonič N., Turk B., Batič F. 2006. Vegetational and mycorrhizal succession at a metal polluted site – indications for the direction of phytostabilisation? *Environmental pollution*, 144: 976-984
- Ruby M.V., Davis A., Schoof R., Eberle s., Sellestone C.M. 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology*, 30: 422-430
- Sabienė N., Brazauskienė D.M. 2004. Determination of heavy metal mobile forms by different extraction methods. *Ekologija*, 1: 36-41
- Salminen J., Sulkava P. 1996. Distribution of soil animals in patchily contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 28: 1349-1355
- Schaefer M. 2003. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *J Soils & Sediments*, 2: 79-84
- SIST ISO 11466. Kakovost tal – Ekstrakcija elementov v sledovih, topnih v zlatotopki. 1996: 6 str.
- Slimak K.M. 1997. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 713-715
- Spurgeon D.J., Hopkin S.P. 1996. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Applied Soil Ecology*, 4: 147-160
- Sun B., Zhao F.J., Lombi E., McGrath S.P. 2001. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environmental Pollution*, 113: 111-120
- Udovič M., Leštan D. 2006. EDTA leaching of Cu contaminated soils using ozone/UV for treatment and reuse of washing solution in a closed loop. *Water, Air and Soil Pollution*, 181: 319-327

- Udovič M., Leštan D. 2008. Remediacija zemljine z območja stare cinkarne v Celju z metodo stabilizacije s cementom. *Acta agriculturae Slovenica*, 91: 283-295
- Ure A.M. 1996. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *The Science of the Total Environment*, 179: 3-10
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih emisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh.
Ur. l. RS št. 68-5774/96.
- US EPA. Test methods for evaluation of solid waste, vol. IA. Laboratory manual physical/chemical methods, SW 86, 40 CFR Parts 403 and 503. 1995. 3rd ed. Washington, DC, US Government Printing Office.
- Vashegyi A., Mezosi G., Barta K., Farsang A., Dormány G., Bartha B., Pataki S., Erdei L. 2005. Phytoremediation of heavy metal pollution: A case study. *Acta Biologica Szegediensis*, 49, 1-2: 77-79
- Vidic T., Jogan N., Drobne D., Vilhar B. 2006. Natural revegetation in the vicinity of the former lead smelter in Žerjav, Slovenia. *Environmental Science & Technology*, 40: 4119-4125
- Wentzel S.W., Guelta M.A. 1988. Avoidance of brass powder-contaminated soil by the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 241-243
- Yanqun Z., Yuan L., Schvartz C., Langlade L., Fan L. 2004. Accumulation of Pb, Cd and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead zinc area, China. *Environmental International*, 30: 567-576
- Yeardley Jr. R.B., Lazorchak J.M., Gast L.C. 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 9: 1532-1537

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Domnu Leštanu za strokovne nasvete in mentorsko vzpodbudo.

Posebej bi se rada zahvalila asist. Metki Udovič, univ. dipl. biol., ki mi je ves čas stala ob strani, pomagala pri delu v laboratoriju, mi svetovala in razjasnila nerazumljivosti ter si vedno vzela čas, ko sem jo potrebovala.

Pri pripravi diplomske naloge sem imela priložnost spoznati delo v laboratoriju, s katerim sem pridobila veliko novega znanja in odkrila zame do sedaj neznano, vendar izredno zanimivo področje v agronomiji.

Vsem sodelavcem na Centru za pedologijo in varstvo okolja bi se rada zahvalila za prijetno delovno vzdušje.

Hvala staršema in sestrama za vso pomoč in vzpodbude v času študija.

Hvala vsem sošolkam in sošolcem za nepozabna študentska leta.

PRILOGA A

Število deževnikov v kontrolnih in testnih tleh ter % izogibanja pri posamezni ponovitvi izogibalnega testa.

	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA – 4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA- onesnažena tla	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA- 2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA-5 mmol kg ⁻¹ EDTA	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA - 10 mmol kg ⁻¹ EDTA	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA – 20 mmol kg ⁻¹ EDTA	4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA
P ₁	C=5 C=5 A=0%	C=4 T=6 A=-20%	C=2 T=8 A=-60%	C=2 T=8 A=-60%	C=3 T=7 A=-40%	C=4 T=6 A=-20%	C=1 T=9 A=-80%
P ₂	C=7 C=2 A=±50%	C=6 T=4 A=20%	C=3 T=7 A=-40%	C=6 T=4 A=20%	C=3 T=7 A=-40%	C=6 T=4 A=20%	C=6 T=4 A=20%
	1 mrtev						
P ₃	C=7 C=3 A=±40%	C=5 T=5 A=0%	C=3 T=7 A=-40%	C=2 T=8 A=-60%	C=4 T=6 A=-20%	C=4 T=6 A=-20%	C=1 T=9 A=-80%
P ₄	C=6 C=4 A=±20%	C=6 T=4 A=20%	C=2 T=8 A=-60%	C=2 T=8 A=-60%	C=7 T=3 A=40%	C=4 T=6 A=-20%	C=2 T=8 A=-60%
P ₅	C=7 C=3 A=±40%	C=4 T=6 A=-20%	C=1 T=9 A=-80%	C=5 T=5 A=0%	C=6 T=4 A=20%	C=1 T=9 A=-80%	C=9 T=1 A=80%

P – ponovitev; C – št. deževnikov v kontrolnih tleh; T – št. deževnikov v testnih tleh; A – izogibanje (%)