

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Aleksandra STRITAR

**AKUMULACIJA SVINCA, CINKA IN KADMIJA V
RAKIH ENAKONOŽCIH VRSTE *Porcellio scaber* Latr.
KOT BIOMARKER BIODOSEGLJIVOSTI KOVIN V
TLEH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Aleksandra STRITAR

**AKUMULACIJA SVINCA, CINKA IN KADMIJA V RAKIH
ENAKONOŽCIH VRSTE *Porcellio scaber* Latr. KOT BIOMARKER
BIODOSEGLJIVOSTI KOVIN V TLEH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ACCUMULATION OF LEAD, ZINC AND CADMIUM IN ISOPODS
Porcellio scaber Latr. AS BIOMARKER OF BIOAVAILABILITY OF
METALS IN SOIL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Franc BATIČ
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

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

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.

Aleksandra Stritar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
 DK UDK 631.453: 549.25: 504.5: 591.5 (043.2)
 KG onesnaženost tal/remediacija tal/spiranje tal/svinec/cink/ kadmij/*Porcellio scaber* Latr./ bioakumulacija
 KK AGRIS P01/ P33/ T01
 AV STRITAR, Aleksandra
 SA LEŠTAN, Domen (mentor)/ DROBNE, Damjana (somentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
 LI 2009
 IN AKUMULACIJA SVINCA, CINKA IN KADMIJA V RAKIH ENAKONOŽCIH VRSTE *Porcellio scaber* Latr. KOT BIOMARKER BIODOSEGLJIVOSTI KOVIN V TLEH
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP VII, 33, [1] str., 5 pregl., 7 sl., 39 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Ocenili smo učinkovitost remediacije tal s pomočjo kopenskih rakov enakonožcev vrste *Porcellio scaber* Latr. Na podlagi nakopičenih kovin v njihovi biomasi smo ocenili biodostopnost kovin v tleh po remediaciji. Uporabili smo metodo spiranja tal z EDTA. Tla smo spirali z štirimi različnimi koncentracijami EDTA (2,5, 20, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA). Remediacija 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 remediacija Zn, saj se ga je s spiranjem z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA odstranilo le 23%. Zn je v tleh prisoten predvsem v kemijsko nedostopnih oblikah, vezan na organsko snov in na frakcijo preostanka, kar je glavni razlog za slabšo odstranitev iz tal. Določili smo frakcionacijo kovin s sekvenčno ekstrakcijo, mobilnost kovin (TCLP-test), dostopnost kovin rastlinam (DTPA-test) ter oralno biodosegljivost kovin (PBET-test) v onesnaženih in remediranih tleh. Mobilnost Pb se je po izpiranju z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA zmanjšala za 87,8%, Cd za 71,7% ter Zn za 88,4%, prav tako se je zmanjšala oralna biodosegljivost Pb (za 87,6%), Cd (pod mejo določanja) in Zn (za 68%). Po remediaciji smo na onesnažena in remedirana tla naselili *P.scaber* za 14 dni. Po koncu poskusa smo živali razklopili z zlatotopko in opravili meritve Pb, Zn in Cd. Pričakovali smo, da bodo živali, ki so bile izpostavljene tlem spranim z višjo koncentracijo EDTA akumulirale manj Pb, Zn in Cd, kar se je tudi pokazalo. Test z uporabo rakov enakonožcev *P.scaber* se lahko uporabi skupaj z ekstrakcijskimi testi za določanje biodostopnosti kovin v tleh po remediaciji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 631.453: 549.25: 504.5: 591.5 (043.2)
 CX soil pollution/soil remediation/soil leaching/lead/zinc/cadmium/*Porcellio scaber* Latr./
 bioaccumulation
 CC AGRIS P01/ P33/ T01
 AU STRITAR, Aleksandra
 AA LEŠTAN, Domen (supervisor)/ DROBNE Damjana (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
 PY 2009
 TI ACCUMULATION OF LEAD, ZINC AND CADMIUM IN ISOPODS *Porcellio scaber* Latr. AS BIOMARKER OF BIOAVAILABILITY OF METALS IN SOIL
 DT Graduation Thesis (University Studies)
 NO VII, 33, [1] p., 5 tab., 7 fig., 39 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Efficiency of soil remediation was evaluated using isopods *Porcellio scaber* Latr. The bioavailability of metals in soil before and after remediation was estimated based on accumulated metals in their biomass. For remediation, method of soil leaching with EDTA was used. Soil was leached with four different concentration EDTA (2,5, 20, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA). Remediation was successful in removing Pb and Cd from soil, soil leaching with 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA removed 73% Pb and 74% Cd, respectively. Remediation of Zn was less successful, soil leaching with 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA removed only 23% Zn. Zn was mostly bound to the organic matter and in the residual fraction, which are chemically less available soil fractions. Fractionation (using sequential extraction), metal mobility (Toxicity Characteristic Leaching Procedure), phytoavailability (diethylenetriaminepentaacetic acid extraction) and human oral-bioavailability (Physiologically Based Extraction Test) were assessed as measures of metal bioavailability in soil. Soil leaching with 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA reduced mobility of Pb (for 87,8%), Cd (for 71,7%) and Zn (for 88,4%) and oral bioavailability of Pb (for 87,6%) and Zn (for 68%). After feeding on contaminated and remediated soil for two weeks *P. scaber* accumulated Pb, Zn and Cd in a concentration dependent manner. We expected lower accumulation in *P. scaber* maintained on soil leached with EDTA than those exposed to contaminated soil. The amounts of metal accumulated in *P. scaber* were higher, in remediated and contaminated soil, than expected, on the basis of extraction tests. Test using *P. scaber* can be used as a supplement to the extraction test for assessing bioavailability of metals in soil after remediation.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ONESNAŽENOST TAL	3
2.2 TEHNIKE REMEDIACIJE	3
2.2.3 Spiranje tal	4
2.3 FRAKCIONACIJA KOVIN	5
2.4 UGOTAVLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL	5
2.5 BIOINDIKATORJ IN BIOMARKERJI	6
2.5.1 Bioindikatorji	6
2.5.2 Biomarkerji	7
2.6 KOPENSKI RAKI ENAKONOŽCI	7
2.7 TESTNI ORGANIZEM <i>Porcellio scaber</i> , Laterille 1804	8
2.7.1 Prebavni sistem	8
2.8 TESTI STRUPENOSTI	9
3 MATERIALI IN METODE DE LA	11
3.1 ANALIZA TAL	11
3.2 REMEDIACIJA TAL	11
3.3 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA KOVIN	12
3.4 MOBILNOST Pb, Zn in Cd V TLEH (12
3.5 ORALNA BIODOSEGLJIVOST	12
3.6 OCENA RASTLINAM DOSEGLJIVIH KOVIN (DTPA)	13
3.7 MERITVE KOVIN	13
3.8 AKUMULACIJA KOVIN V RAKIH ENAKONOŽCIH (<i>Porcellio scaber</i>)	14
3.9 STATISTIČNA ANALIZA	14
4 REZULTATI	16
4.1 REMEDIACIJA TAL	16
4.2 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA ANALIZA	16
4.3 OCENA MOBILNOSTI Pb, Zn in Cd (rezultati TCLP testa)	18
4.4 OCENA ORALNE BIODOSEGLJIVOSTI (rezultati PBET testa)	18
4.5 OCENA BIODOSEGLJIVOSTI ONESNAŽAIL RASTLINAM (rezultati DTPA testa)	19
4.6 AKUMULACIJA KOVIN V RAKIH ENAKONOŽCIH (<i>Porcellio scaber</i>)	19
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	27
5.1 RAZPRAVA	27
5.1.1 Remediacija tal	27
5.1.2 Akumulacija Pb, Zn in Cd v telesu vrste <i>P. scaber</i>	28
5.2 SKLEPI	29
6 POVZETEK	30
7 VIRI	31
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica 1: Standardne pedološke lastnosti tal in celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd v tleh pred remediacijo z EDTA. 16
- 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 določanja. 17
- Preglednica 3: Koncentracije Pb, Zn in Cd v TCLP ekstraktu v onesnaženih in remediiranih tleh.. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. 18
- Preglednica 4: Oralna biodosegljivost Pb, Zn in Cd v želodčni in črevesni frakciji v onesnaženih in remediiranih tleh, določena s fiziološko osnovanim ekstrakcijskim testom (PBET). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. 19
- Preglednica 5: Rastlinam dostopne koncentracije Pb, Zn in Cd določene z DTPA ekstrakcijskim testom v onesnaženih in remediiranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom. 19

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Porcellio scaber</i>	8
Slika 2: Koncentracije Pb v telesu testnih živalih <i>P. scaber</i> . Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (\bar{x}), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Pb v telesu <i>P. scaber</i> . (a,b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).	20
Slika 3: Koncentracije Zn v telesu testnih živalih <i>P. scaber</i> . Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (\bar{x}), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Zn v telesu <i>P. scaber</i> . (a) označuje statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).	21
Slika 4: Koncentracije Cd v telesu testnih živalih <i>P. scaber</i> . Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (\bar{x}), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Cd v telesu <i>P. scaber</i> . (a,b,c) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).	21
Slika 5: Bioakumulacijski faktorji za Pb, Zn in Cd.	22
Slika 6: Koncentracije akumuliranega Pb, Zn in Cd v telesu <i>P. scaber</i> kot funkcija teh kovin prisotnih v različnih talnih frakcijah določenih s šest-stopenjsko sekvenčno ekstrakcijo.	24
Slika 7: Koncentracije akumuliranega Pb, Zn in Cd v telesu <i>P. scaber</i> kot funkcija teh kovin glede na celokupno koncentracijo (ekstrakcija z zlatotopko), dostopnost rastlinam (DTPA ekstrakcija), mobilnost (TCLP ekstrakcija) ter oralno biodosegljivost (PBET test).	25

1 UVOD

Tla zaradi počasnega nastajanja in regeneracije predstavljajo neobnovljiv naravni vir. Tla kot odeja pokrivajo naše vire pitnih voda in vplivajo na kakovost zraka. Izpostavljena so številnim procesom degradacije in drugim nevarnostim, ki izvirajo iz naravnih ali antropogenih dejavnikov (Zupan in sod., 2008).

V razvitih delih sveta predstavlja onesnaženje tal s potencialno strupenimi kovinami velik okoljski problem. V tleh so anorganska onesnažila prisotna naravno in pa kot posledica človekove dejavnosti. Antropogeni izvori oziroma viri onesnaževanja so rudarjenje in taljenje rude, industrija, kmetijstvo, promet, odlaganje odpadkov... (Leštan, 2002).

Tla v Sloveniji večinoma niso močno onesnažena: razen na območjih, kjer je bila v preteklosti ali je še danes rudniško topilniška dejavnost, je opaziti povečano koncentracijo kovin. Na kmetijskih območjih je moč zaznati ostanke fitofarmaceutskih sredstev tudi po več desetih letih (Zupan in sod., 2008).

V Sloveniji ocenjevanje onesnaženosti tal temelji na določanju celokupne koncentracije onesnažil v tleh (Uredba ..., 1996), kar pa le malo pove o njihovi dostopnosti za žive organizme. Za organizme dostopen (biodostopen) je tisti del celokupne koncentracije onesnažil v tleh, ki jo organizem lahko privzame, oziroma ima vpliv na biološki material (Greebelen in sod., 2003). Za določitev tveganja izpostavljenosti onesnažilom za ljudi in druge organizme je nujna ocena biodostopnosti onesnažil v tleh. Za določanje biodostopnosti onesnažil v tleh lahko uporabimo fiziološko osnovane *in vitro* ekstrakcijske teste ali testne organizme.

Daljša izpostavljenost potencialno strupenim kovinam lahko povzroči hude bolezni, še zlasti dovzetni za kovine, kot sta Pb in Cd, so otroci. Tla onesnažena s potencialno strupenimi kovinami je potrebno očistiti, remediirati (Leštan, 2002). Remediacija pomeni izboljšavo lastnosti degradiranih tal, predvsem tal, ki so onesnažena.

Strupenost posameznega onesnažila na organizem je odvisna od trajanja izpostavitve, količine zaužitega onesnažila in mehanizma, ki preprečuje strupene učinke.

Za študije akumulacije kovin so med nevretenčarji najpogosteje uporabljeni mehkužci, deževniki, izopodi, raki, insekti in pajki (Hopkin, 1989). Med njimi so kopenski izopodi najprimernejši testni organizmi, zaradi zmožnosti akumulacije visokih koncentracij kovin v telo. Prav tako so dovolj veliki, številčni in enostavni za ravnanje v laboratoriju, živali so dobro raziskane, kar so glavni razlogi za izbiro izopodov kot testnih organizmov (Drobne, 1997).

Izopodni raki so razširjeni po vsem svetu v različnih okoljih. Terestrični izopodi živijo v zgornji plasti tal in so v stalnem stiku z onesnažili v tleh. Sposobni so preživeti v okolju s povišanimi koncentracijami onesnažil.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZA

Namen naloge je oceniti učinkovitost remediacije tal s pomočjo kopenskega raka enakonožca (*Porcellio scaber* Latr.). Na podlagi nakopičenih kovin v njihovih telesih bomo ocenili biološko dosegljivost kovin v tleh in iz tega ocenili učinkovitost remediacije tal s spiranjem z etilendiamin tetraocetno kislino (EDTA).

Pričakujemo, da bo v remediranih tleh biodostopnost kovin manjša, posledično bodo izopodi akumulirali manj kovin.

Pričakujemo, da bo v remediranih tleh z višjimi koncentracijami EDTA biodosegljivost kovin najmanjša, in da bodo izopodi v teh tleh akumulirali najmanj kovin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ONESNAŽENOST TAL

Kovine so v tleh naravno prisotne, nastajajo s preperevanjem matične podlage in se v tleh pojavljajo v različnih koncentracijah. V splošnem je njihova vsebnost večja v kamninah vulkanskega izvora, kot pa v kamninah sedimentnega izvora. Poznamo tudi številne antropogene izvore kovin, ki jih imenujemo tudi viri onesnaženja, to so industrija, rudarjenje, kmetijstvo, odlagališča odpadkov itd. Onesnaževanje je lahko razpršeno, točkovno ali linijsko (Leštan, 2002).

Onesnaženost tal s potencialno strupenimi kovinami predstavlja globalen problem za okolje in ljudi. Koncentracija onesnažil v zraku in vodah se zaradi mešanja in razredčevanja zmanjšuje, medtem ko se v tleh številna onesnažila akumulirajo. Škodljive snovi prehajajo v tla po zraku (industrijske in urbane emisije), z odlaganjem odpadkov, uporabo fitofarmaceutskih sredstev in mineralnih gnojil v kmetijstvu. Snovi, ki onesnažujejo tla delimo na anorganska in organska (Leštan, 2002).

Med anorganskimi onesnažili v tleh največkrat zasledimo kovine, kot so svinec, cink, baker, nikelj, kadmij, krom. Mnogi izmed teh elementov so za organizem esencialni, kar pomeni, da so organizmu nujno potrebni za delovanje, pri višjih koncentracijah pa so strupeni. Kovine so v tleh prisotne v različnih kemijskih oblikah in so vezane na različne frakcije tal, od česar je odvisna njihova biološka dosegljivost (Leštan, 2002).

Kovine se kopičijo v zgornjih plasteh tal. Za razliko od organskih onesnažil kovine v okolju niso razgradljive in lahko ostanejo v tleh tudi več desetletij ali celo stoletij. Onesnaženost tal s potencialno strupenimi kovinami ima lahko dolgoročne okoljske in tudi zdravstvene posledice (Leštan in sod., 2008).

Škodljivost nevarnih snovi v tleh za naravo in za ljudi je odvisna od njihove toksičnosti, fizikalno-kemijskih lastnosti in lastnosti tal. Močno onesnažena tla so mrtva in izgubijo samoočiščevalno sposobnost. Taka tla so nevarna za okolje in jih je potrebno remediirati (očistiti) (Leštan, 2002).

2.2 TEHNIKE REMEDIACIJE

Odločitev o čiščenju oziroma remediaciji tal je odvisna od zakonodaje, ki predpisuje dovoljene vednosti onesnažil za tla določene rabe (npr. Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (1996)). Na odločitev o remediaciji vplivajo tudi sociološki vidiki in pa razpoložljivost finančnih sredstev (Leštan, 2002). Pri izbiri najbolj primerne remediacijske metode je najbolj pomembno poznavanje lastnosti tal in lastnosti onesnažila (Leštan in sod. 2008), izbira pa je odvisna tudi od koncentracije in vrste onesnažila v tleh ter od namembnosti onesnaženih tal (Leštan, 2002).

Remediacija tal se lahko opravi na mestu (*in situ*), lahko pa onesnažena tla izkoplremo in šele nekje drugje začnemo s postopki čiščenja (*ex situ*). Prednost tehnologije čiščenja tal *in situ* so manjši stroški, vendar je čas čiščenja ponavadi daljši (Leštan, 2002).

Pri remediaciji onesnaženih tal uporabljamo biološke in fizikalno-kemijske metode.

Poznamo tri osnovne načine odprave onesnaženja (Leštan, 2002):

- uničenje ali spremembo molekularne strukture onesnažila v neškodljivo obliko,
- ekstrakcija ali odstranitev onesnažila iz okolja, odstranitev dosežemo že z najosnovnejšo metodo-izkop onesnaženih tal. Z metodami ekstrakcije onesnažilo odstranimo iz tal (spiranje tal, ekstrakcija hlapov),
- nepovratna imobilizacija onesnažil v tleh, ki jo dosežemo z različnimi dodatki tlom.

Remediacijske metode vključujejo (Finžgar in Leštan, 2006):

- izkop in odvoz onesnaženih tal,
- imobilizacijo onesnažil in dovajanje snovi, kot so cement, apno in različni fosfati,
- elektrokinetično mobilizacijo in obarjanje kovin iz tal z elektrodami,
- fitoekstrakcijo kovin iz tal (kopičenje kovin v rastlinskih organih),
- spiranje tal, temelji na ločevanju kovin iz trdnega dela tal s solubilizacijo (raztopitev kovin v topilu, v katerem v naravnem okolju niso topna) v izpiralni raztopini.

2.2.3 Spiranje tal

Spiranje tal je fizikalno-kemijska metoda čiščenja tal, pri kateri s pralno raztopino ločimo onesnažilo od talnih delcev. Ta metoda je tlom prijazna zaradi ohranjanja njihove strukture med samim procesom. Trenutno je ena najbolj obetavnih remediacijskih metod spiranje tal z raztopinami, ki vsebujejo kelatne ligande (Udovič in Leštan, 2007).

Ligandi so spojine, ki z alkalijskimi kationi ali s kovinskimi ioni tvorijo vodotopne, stabilne komplekse. Za formiranje vezi, oziroma tvorbo kompleksov, morajo imeti vsaj en prost elektronski par. Ligandom, ki hkrati prispevajo dva ali več elektronskih parov pravimo večvezni ali kelatni ligandi.

Ligandi desorbirajo kovine iz trdnega dela tal, tako da se z njimi vežejo v vodotopen kompleks, ki ga iz tal odstranijo rastline z fitoekstrakcijo ali pa ga odstranimo s spiranjem tal (Leštan in sod. 2008). Ti kompleksi so zelo stabilni, preprečijo obarjanje in sorpcijo kovin ter ne sproščajo ionov kovin, razen pri večjem padcu pH (Leštan in sod. 2008).

Za spiranje tal je bilo testiranih veliko različnih kelatov, v literaturi pa se najpogosteje, zaradi dostopnosti in relativno nizke cene, pojavlja etilen diamin tetraocetna kislina (EDTA), (Leštan in sod. 2008), ki se je izkazala kot zelo učinkovita pri spiranju tal onesnaženih s Pb, Zn, Cd in Cu (Finžgar in Leštan, 2006).

Kovine so v tleh prisotne v različnih kemijskih oblikah in vezane na različne frakcije tal (Udovič in Leštan, 2007), zato so kovine kelantom le delno dosegljive in jih lahko zato z njimi le delno odstranimo (Nowack in sod., 2006; Finžgar in Leštan, 2007).

Pb se v tleh večinoma veže na organsko snov in karbonate (Kabata-Pendias in Pendias, 1992), Zn pa je večinoma prisoten v kristalnih rešetkah alumosilikatnih glinenih mineralov (Rivero in sod, 2000; Kabala in Singh, 2001). Močna vez s trdno fazo tal onemogoča, da bi s spiranjem tal Pb in Zn v celoti odstranili, posebno če so tla bogata z organsko snovjo in glino.

2.3 FRAKCIONACIJA KOVIN

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 izmenjave s silicijem in aluminijem,
- biološke mobilizacije in imobilizacije 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, prevladujoči fizikalno-kemijske razmere v tleh ter mineralogija težkih kovin (Leštan in sod., 2003).

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

2.4 UGOTAVLJANJE ONESNAŽENOSTI TAL

Frakcionacijo kovin določamo s sekvenčnimi ekstrakcijami. To je kemijski postopek izločanja kovin iz tal z zaporednimi ekstrakcijami z uporabo različnih ekstrakcijskih reagentov. Z vsako od zaporednih ekstrakcij izločimo kovine, ki so vezane na določeno talno frakcijo (Bačac, 2005). Iz tal se najprej izločijo 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 vezane na Fe- in Mn-oksidi; kovine, vezane na netopno organsko snov tal ter kovine, vključene v kristalne rešetke glinenih mineralov).

Zaradi možnosti izpiranja onesnažil iz tal v podtalnico merimo mobilnost onesnažil. Ekstrakcijska metoda TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) meri potencial onesnaženih tal 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, 2007).

Za ugotavljanje biodostopnosti onesnažil rastlinam obstaja več ekstrakcijskih testov, med katerimi je tudi ekstrakcijski test z dietilentriaminpentaoctno kislino (DTPA) (Lindsay in Norwell, 1978). Gre za enostopenjsko ekstrakcijo frakcije kovin, ki predstavlja delež kovin v tleh, ki je razpoložljiva rastlinam.

Za določanje oralne biodosegljivosti potencialno strupenih kovin za človeka uporabljamo fiziološko osnovane teste biodosegljivosti, ki simulirajo dogajanje v človekovih prebavilih (Udovič in Leštan, 2008). Fiziološko osnovani ekstrakcijski test (Physiologically Based Extraction Test) je *in vitro* test za ugotavljanje biodosegljivosti kovin. Temelji na fizioloških lastnostih prebavnega sistema otrok med drugim in tretjim letom starosti. Otroci v tej starosti so zaradi igralnih navad, kjer lahko pride do nenamerne zaužitja tal (tla-roka-usta), bolj izpostavljeni onesnažilom. S tem testom simuliramo želodčno in črevesno fazo v človeškem prebavnem sistemu (Ruby in sod., 1996). Test ne simulira celotnega fiziološkega procesa absorpcije težkih kovin skozi črevesni epitel, temveč le biodostopnost le-teh v človeškem želodcu in tankem črevesju.

Z ekstrakcijskimi metodami ne pridobimo zadostnih informacij o dejanski biodosegljivosti kovin za organizme. Talni organizmi zaznavajo in so občutljivi na strupene kemikalije v tleh, ki imajo negativen vpliv na opravljanje primarnih funkcij in njihov življenjski cikel, zato se izogibajo onesnaženim območjem. Pomanjkljivost kemijskih ekstraktov je, da ne zajamejo dinamične in kompleksne narave interakcij med kovino, tlemi in organizmom (Udovič, 2009).

2.5 BIOINDIKATORJI IN BIOMARKERJI

2.5.1 Bioindikatorji

Bioindikatorji so organizmi, ki dajo na onesnažila merljiv biološki odziv, ki odraža tudi spremembe v kakovosti in funkcioniranju tal. Imeli naj bi sledeče lastnosti (Cortet in sod. 1999):

- imeli naj bi pomembno vlogo v ekosistemu,
- bili naj bi običajni in prisotni v vseh tipih tal, oziroma analiziranih delov ekosistema, ter naj bi jih bilo lahko vzorčiti,
- bili naj bi dovolj odporni, da preživijo dejanske koncentracije strupenih spojin, ki se pojavljajo v okolju,
- biološki odziv na onesnažila naj bi bil merljiv in ponovljiv,
- enostavni za uporabo v laboratorijskih testih in tudi v *in situ* testih.

Bioindikatorje delimo v akumulacijske bioindikatorje in odzivne bioindikatorje (Arndt in sod. 1987). Odzivni bioindikatorji dajejo podatke o odzivu organizmov na izpostavljenost onesnažilom.

Pri akumulacijskih bioindikatorjih onesnažilo iz okolja preide v organizem, kjer se skladišči na različne načine (Cortet in sod., 1999).

Bioakumulacija onesnažil v bioindikatorskih organizmih nam da podatek o biološki dosegljivosti onesnažila. Za primerjavo bioakumulacije onesnažila pri različnih talnih razmerah, ter primerjavo sposobnosti organizmov za akumulacijo onesnažila uporabljamo faktor bioakumulacije. Faktor bioakumulacije je razmerje med koncentracijo onesnažila v organizmu in med koncentracijo onesnažila v tleh (Gál in sod., 2008)

2.5.2 Biomarkerji

Biomarkerji so merljiv individualni biološki odziv (biokemični, molekularni, fiziološki, vedenjski ali genetski) na onesnažila. Biomarkerji so deli organizma (npr. stresni proteini, citološke spremembe). Imeti morajo primerne lastnosti (Leštan, 2002):

- obstajati mora jasna in nedvoumna povezava med koncentracijo toksične snovi v okolju ali v gostiteljskem organizmu in kvantitativnim ali kvalitativnim odzivom biomarkerja,
- imeti mora znano in primerno specifičnost in občutljivost na onesnažilo,
- mora biti običajen za člane populacije. Variabilnost odziva znotraj populacije mora biti določena.

2.6 KOPENSKI RAKI ENAKONOŽCI

Vrsto enakonožnega raka *Porcellio scaber* uvrščamo v red *Isopoda* (enakonožci), podred *Oniscoidea* (kočiči). Zanje je v rabi tudi ime kopenski enakonožci (terrestrial isopods). Red *Isopoda* spada v razred *Malacostraca* (višji raki), poddeblo *Crustacea* (raki) in v deblo *Arthropoda* (členonožci).

Slovensko ime zanj je navadni prašiček (Mršič, 1997).

Telo je podolgovato ovalno in sploščeno v hrbtno-trebušni smeri. Razdeljeno je na tri regije: glavo (glavopršje, ker se glavi pridruži še prvi člen oprsja), oprsje in zadek. Na glavi sta dva para tipalnic; prvi tipalnici, antenuli, sta zelo majhni in komaj opazni. Drugi par tipalnic, antene, je normalno razvit. Ustni aparat je grizalo. Oprsje je sestavljeno iz sedmih, med seboj povezanih segmentov, ki so sestavljeni iz hrbtnih (tergitov) in trebušnih ploščic (sternitov). Ob strani se tergiti podaljšujejo v stranske krpe, epimere. Na sternitih je na trebušni strani po en par nog hodilk, periopodov. Vsaka noga je sestavljena iz šestih prostih členkov. Sedmi par nog je pri samcih pogosto izoblikovan kot pomožni organ za kopulacijo. Zadek je iz petih členov, ki med seboj niso trdno zrasli. Na vsakem je po en par zadkovih nožic, pleopodov. Rep ali končni člen, telzon, je trikotne oblike, na njem je en par repnih nožic, uropodijev (Hopkin 1989, Mršič 1997).



Slika 1: *Porcellio scaber*

Izopodi naseljujejo zgornjo plast tal in steljo, živijo v trhljem lesu, pod drevesno skorjo, v panjih, pod kamni, v vlažnih kletih. Najdemo jih v mestnem in podeželskem okolju. Razširjeni so povsod po svetu, izopodi so edini red, ki ima svoje predstavnike v vseh večjih ekosistemih (Hopkin, 1989). Za vrsto *P. scaber* je značilno, da se zadržuje v bližini človeških bivališč.

Glede na velikost telesa sodijo med mezo- in makro favno. Prehranjujejo se z odmrlo organsko snovjo, odmrlim listjem in lesom.

Izopodi so pomemben člen pri nastajanju humusa, njihov pomen pri razgrajanju organske snovi je precejšen, zlasti v tistih habitatih, kjer nastopajo bolj množično. Ne prebavljajo celuloze in lignina, pomembni so pri mehanskem drobljenju rastlinskih ostankov, ker s tem povečujejo aktivno površino delcev in lajšajo dostop bakterijam in glivam, ki razgrajujejo organsko snov (Mršič, 1997). Pomembno vlogo imajo tudi pri širjenju talnih bakterij, gliv in vzpostavljanju mikorize.

Kopenski izopodi so sposobni razlikovanja hrane. Sposobni so se izogniti hrani z višjo koncentracijo kovin in raje izberejo neonesnaženo (Zidar in sod., 2005).

2.7 TESTNI ORGANIZEM *Porcellio scaber*, Laterille 1804

Porcellio scaber, Latr. spada v rod *Porcellio*, družino Porcellionidae.

Je sivkaste barve. Odtенок se spreminja v skladu s stopnjo razvoja in levitvijo. Mladiči so belkasti, mlade živali svetlo sive, odrasle pa sive do sivo-rjave. V dolžino merijo do 17 mm.

2.7.1 Prebavni sistem

Prebavni sistem vrste *Porcellio scaber* je sestavljen iz prebavne cevi in žlez (hepatopankreasa). Črevo je preprosta ravna cev, razdeljena na tri dele: sprednje, srednje in zadnje črevo. Sprednje črevo sestavljata požiralnik in želodec. Srednje črevo je omejeno na štiri žleze, ki skupaj tvorijo hepatopankreas. Zadnje črevo je sestavljeno iz sprednjega dela (anteriorne regije), srednjega dela (papilarnne regije) in rektuma.

Sprednje črevo ima vlogo pri mletju, filtriranju in razvrščanju hrane. Mišice v hrbtnem delu želodca omogočajo stiskanje vsebine in ločevanje tekočine. Tekoči del hrane in drobni delci hrane vstopajo skozi filtre v prebavne žleze, neprebavljen del pa gre v zadnje črevo. V hepatopankreasu se proizvajajo prebavni encimi, ki se izločajo v želodec in v anteriorni del zadnjega črevesja. Prebavljena hrana potuje iz anteriornega dela po tiflosolnih kanalih nazaj v želodec, od tam pa v hepatopankreas, kjer poteka absorpcija hranil. Neprebavljen del hrane gre skozi papilarno regijo, kjer se reabsorbira voda, ioni in ostanek hranil, preostanek gre v rektum, kjer se oblikujejo iztrebki, ki jih žival izloči skozi anus (Hopkin, 1989).

Hepatopankreas služi za absorpcijo hranilnih snovi, skladiščenje lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov, je tudi najpomembnejši organ za shranjevanje cinka, kadmija, svinca in bakra, ki so shranjeni v obliki granul v S in B celicah. B celice vsebujejo glikogen in lipide, ter izločajo prebavne encime. Glavna vloga S celic je shranjevanje kovin.

Hepatopankreas zavzema samo 5% suhe teže živali, vendar lahko vsebuje 75% Zn, 95% Cd in 80% Pb od celotnih koncentracij v telesu. V ostalih delih telesa so koncentracije teh kovin konstantne (Hopkin, 1989).

Nalaganje kovin v S celicah v hepatopankreasu predstavlja način razstrupljanja (detoksifikacije) in s tem zaščito organizma pred strupenostjo kovin (Hopkin, 1989).

Asimilacija kovin iz hrane je odvisna od večih dejavnikov: biodostopnosti kovin v zaužiti hrani, mikroorganizmov v prebavilu, koncentraciji kovin, trajanja izpostavljenosti in razmerju med količino zaužite hrane in pH v črevesju (Hopkin, 1989).

2.8 TESTI STRUPENOSTI

Test strupenosti je postopek z zelo natančno določenimi koraki, v katerih merimo odzive organizmov na povišane koncentracije kemikalij. Test mora biti ponovljiv, zanesljiv, dokaj enostaven ter mora dati kar največ podatkov (Connel in sod., 1999).

Enovrstni testi so testi pri katerih se uporabi le organizme ene vrste. Delijo se na akutne in kronične teste strupenosti. Testi akutne strupenosti pokrijejo le krajše obdobje življenja organizma. Za teste kronične strupenosti so potrebna opazovanja in merjenja v dolgem obdobju življenja organizma ali celo v večih generacijah (Kononenko, 2006).

Laboratorijski testi se smatrajo za najbolj ekstremne razmere, ki jim je organizem izpostavljen. Testni organizem je konstantno izpostavljen visokim koncentracijam onesnažil. Razmere v naravnem okolju so blažje, onesnažila niso enakomerno razporejena, zaradi različnih sorpcijskih procesov pa je biodosegljivost manjša. Prav tako lahko v naravnem okolju organizem izbere različno kontaminirano hrano (Drobne, 1996).

V rutinskih testih strupenosti se uporablja smrtnost organizma kot odgovor na strupenost onesnažila. Smrtnost organizmov ne pove dovolj o delovanju onesnažila in ni primeren način za ugotavljanje strupenosti nizkih koncentracij onesnažil (Drobne 1996).

Za merjenje strupenosti onesnažil se uporabljajo različni toksikološki odzivi. V glavnem se uporabljata dve skupini odzivov, in sicer ocenjeni odzivi in merljivi odzivi. Ocenjeni odzivi se nanašajo na populacije in združbe, npr. rast populacije. Merljivi odzivi pa se nanašajo na

merjenja, pogosto tudi posameznih osebkov, za vrednotenje ocenjenih kazalcev. So merljiv odziv na onesnažilo (Drobne, 1996). Merljivi odzivi so smrtnost, rast, število potomcev, reprodukcijski cikel, levitveni cikel, obnašanje, prehrana... Najpogosteje uporabljeni toksikološki odzivi so smrtnost, rast in reprodukcija (Drobne, 1997).

Poleg deževnikov so izopodi najpogosteje uporabljeni organizmi v testih strupenosti. Izopodi ustrezajo večini kriterijev, ki jih zahteva pravilen izbor testnih organizmov (Drobne, 1997). Izopodi so primerni organizem za teste strupenosti, ker živijo v na površju tal, stelji, kjer se onesnažila največ akumulirajo in so z onesnažili v stalnem siku. Imajo sposobnost akumuliranja kovin v hepatopankreasu. So dovolj veliki, številčni in enostavni za gojenje in ravnanje v laboratoriju (Hopkin, 1993; Drobne 1997). Prav tako so dobro raziskane živali, poznani pa so tudi učinki onesnažil na smrtnost, reprodukcijski in levitveni cikel in prehranjevanje.

Pri uporabi izopodov kot testnih organizmov v testih strupenosti, rast, reprodukcijski cikel in življenjski cikel niso najprimernejši odzivi. Rast traja več tednov in zelo variira med posameznimi osebki. Reprodukcijski cikel ni primeren kazalec, ker lahko samice po parjenju shranijo moška semenčeca za dlje časa preden pričnejo reprodukcijo. Življenjski cikel izopodov je dolg, od 6 do 8 mesev. Bolj primerni kazalci pri uporabi izopodov so prehranjevanje (privzem hrane), levitveni cikel in struktura prebavnih žlez (Drobne, 1997).

Na kopenskih rakah je bilo izvedenih že veliko raziskav, ki so proučevale učinke kovin in drugih onesnažil na to vrsto.

Prehranjevanje lahko zelo preprosto spremljamo. Živali jedo posušene liste leske, na katere z lahkoto naneseemo testno spojino. Zaužito hrano pretvorijo v ločene in kompaktne iztrebke s podobno maso. S štetjem količine iztrebkov skozi določeno časovno obdobje lahko določimo ali je prisotnost kemikalije zmanjšala količino zaužite hrane.

3 MATERIALI IN METODE DELE

3.1 ANALIZA TAL

Tla za analizo smo nabrali v Mežiški dolini, v naselju Žerjav ($x = 489300$ m in $y = 152300$ m, Gauß-Krüger koordinatni sistem), in sicer na oskrbovanem zelenjavnem vrtu v bližini zapuščenega svinčevega rudnika. Za proučevanje smo uporabili zgornjo plast tal (0-30 cm).

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 izmenjalno kapaciteto smo izmerili z amonij-acetatno metodo (Rhoades, 1982), teksturo tal z mehansko metodo in dostopen fosfor (P₂O₅) kolorimetrično po Egner-Domingovi metodi.

3.2 REMEDIACIJA TAL

Na zraku posušena tla (4,6 kg) smo presejali skozi 5 mm sito ter jih dali v 4 kolone, 15 cm premera in 27 cm višine. Na dno vsake kolone smo dali plastično mrežico (0,2 mm), ki je zadrževala tla. Tla v vsaki koloni smo ekstrahirali z različnimi koncentracijami EDTA in sicer 2,5, 10, 40 in 4x40mmol kg⁻¹ EDTA.

Pri ekstrakciji je izpiralna raztopina (3,1 L) s pomočjo peristaltične črpalke v zaprti procesni zanki 24 ur počasi krožila skozi kolone (hitrost pretoka 15 ml min⁻¹). Pri tem so se iz tal izpirali Pb, Zn, Cd in vodotopni kompleksi kovina-EDTA. Po 24 urah spiranja smo odvzeli vzorce (25 mL) izpiralne (ekstrakcijske) raztopine za meritev Pb, Zn in Cd. Vsako kolono smo nato še spirali z 80 L čiste vode v odprti procesni zanki s pretokom 15 ml min⁻¹, da so se iz tal sprale mobilne kovine in EDTA.

V eni koloni so bila tla sprana v 4 zaporednih korakih (4x40 mmol kg⁻¹ EDTA). Pri vsakem izpiranju je izpiralna tekočina krožila skozi kolono v zaprti procesni zanki 24 ur, nato smo začeli z novo stopnjo spiranja (nova izpiralna raztopina, 40 mmol kg⁻¹ EDTA, volumen 3,1 L). Po vseh štirih stopnjah je sledilo še spiranje z čisto vodo.

Koncentracijo EDTA v odvzetih vzorcih izpiralne raztopine smo izmerili spektrofotometrično po protokolu Hamano in sod. (1993), vsebnost 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 kovin, EDTA in/ali kompleksov EDTA- kovina.

3.3 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA KOVIN

Za določitev frakcionacije Pb, Zn in Cd v šestih frakcijah smo uporabili spremenjeno Tessierovo sekvenčno ekstrakcijo (Leštan in sod., 2003). Za ekstrakcijo prve frakcije, ki predstavlja ione kovin raztopljenih v talni raztopini, smo 1 g zračno posušenih tal, presejanih skozi 2 mm sito, prelili 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. Prelili smo ga 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 kovin na karbonate smo ekstrahirali z 10 mL 1 M amonacetata (NH_4OAc) pri pH 5 za 5 h. Amonacetat povzroči raztapljanje karbonatov (kalcit, dolomit) in oboritev (sprostitev) vezanih kovin. Ekstrakcijo četrte frakcije koordinativno vezanih kovin na Fe- in Mn-oksidi smo naredili z 20 ml hidroksilamino hidrokloridom $NH_2OH \cdot HCl$ pri pH 2 za 12 ur. Hidroksilamin hidroklorid povzroči pretvorbo Fe- in Mn-oksidov v topno obliko. Za pridobitev pete frakcije, to so kovine vezane na organsko snov, smo izpostavili tla 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, nato je sledila še 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 kovin ter raztapljanje kovinskih sulfidov. Šesto frakcijo, frakcijo preostankov (kovin, vključenih v kristalne rešetke glinenih mineralov), pa smo pridobili v razklopu z zlatotopko, s pomočjo katere smo povzročili raztapljanje silikatov in preostalih mineralov. V vsaki frakciji smo merili koncentracije Pb, Zn in Cd v treh ponovitvah. S seštevkom koncentracij Pb, Zn in Cd v vseh šestih frakcijah smo izmerili celotno vsebnost Pb, Zn in Cd v sekvenčni ekstrakciji.

3.4 MOBILNOST Pb, Zn in Cd V TLEH

S TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) vrednotimo potencialno mobilnost onesnažil iz tal in iz drugih odpadkov v podtalje in podtalnico (US EPA, 1995). Z metodo TCLP smo določili mobilnost kovin v tleh pred in po remediaciji.

Analizo smo izvedli v treh ponovitvah. Najprej smo pripravili ekstrakcijsko raztopino, ki vsebuje 0,0992 M očetne kisline in 0,0643 M NaOH. pH pripravljene raztopine mora meriti $4,93 \pm 0,05$. 1 g tal, ki smo ga prej presejali skozi 2 mm sito, smo prelili z 20 mL ekstrakcijske raztopine in stresali na stresalniku 18 ur pri 300 obratih/min. Po ekstrakciji smo vzorce filtrirali (filtri Whatman No.4), filtrat pa zakisali s 65% dušikovo kislino (HNO_3) do $pH < 2$ in ga do meritve shranili v hladilnik pri 5°C.

3.5 ORALNA BIODOSEGLJIVOST

Fiziološko osnovani ekstrakcijski test (Physiologically Based Extraction Test, PBET) temelji na fiziološki lastnosti prebavnega sistema otrok med drugim in tretjim letom starosti (Ruby, 1996). Otroci imajo zaradi igralnih navad večjo nevarnost zaužitja tal in posledično tudi onesnažil kot pri odraslih (Davis in Mirick, 2006).

Test PBET sestavljata 2 fazi, in sicer določanje biodosegljivosti kovin v želodcu in določanje biodosegljivosti kovin v tankem črevesju.

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 ekstrakcijske

raztopine, ki simulira želodčno raztopino (v nadaljevanju »želodčna raztopina«) in tako pripravili reakcijsko mešanico. Želodčna raztopina 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 pH $2,50 \pm 0,05$, ki smo ga uravnali z HCl. V posodo smo dovajali inertni plin argon s pretokom 20 L h^{-1} in s tem simulirali peristaltične gibe v prebavnem traktu. pH reakcijske mešanice smo merili vsakih 10 min in po potrebi dodajali HCl, da smo ohranjali pH vrednost $2,50 \pm 0,05$. 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 nadaljnje analize.

Volumen vzorca smo nadomestili z 2 mL sveže želodčne raztopine. Za simuliranje črevesne faze smo pH vzorca 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 nadaljnjo analizo vsebnosti Pb. Analizo smo opravili v treh ponovitvah.

3.6 OCENA RASTLINAM DOSEGLJIVIH KOVIN (DTPA)

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

Ekstrakcijska raztopina vsebuje 0,005 M DTPA, 0,01 M CaCl_2 in 0,1 M trietanolamin (TEA). Raztopini uravnamo pH vrednost na $7,30 \pm 0,05$ z razredčeno solno kislino (1:1 N HCl). Raztopina je obstojna več mesecev.

5 g zračno suhih tal presejemo skozi 2 mm sito. Tla nasujemo v 125 ml posode in prelijemo z 10 ml ekstrakcijske raztopine. Zamašene posode stresamo na stresalniku 2 h pri 120 obr/min. Po stresanju filtriramo (Whatman No. 42), koncentracije elementov določamo v filtratu.

Ekstrakcijo naredimo v treh ponovitvah.

3.7 MERITVE KOVIN

V ahatni terilnici smo zmleli zračno suhe vzorce (1 g) pred in po remediaciji, jih presejali čez 160 μm sito, ter jih razklopili v zlatotopki (28 mL) (SIST ISO 11466). Vzorce smo nato razredčili z deionizirano vodo do končnega volumna 100 mL in izmerili koncentracijo 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.

3.8 AKUMULACIJA KOVIN V RAKIH ENAKONOŽCIH (*Porcellio scaber*)

Odrasli osebki rakov enakonožcev so bili nabrani julija 2007 na območju Krškega in Celja. Do poizkusa smo jih hranili v terariju v laboratoriju pri konstantni sobni temperaturi (24°C). Zemlja v terariju je bila prinesena iz kraja nabiranja. Hranili smo jih z posušenimi listi leske (*Corylus avelana*), ki so bili nabrani v Regionalnem parku Tivoli v Ljubljani.

Za poizkus smo uporabili plastične posodice (17x13x7 cm), v katere smo nasuli približno 600 mL zračno suhih neremediranih tal in tal remediranih s spiranjem z različnimi koncentracijami EDTA (2,5, 10, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA). V vsako posodico smo naselili 15 odraslih osebkov (30-60 mg žive teže), tako da je bila v vsaki posodici približno enaka skupna masa vseh živali. Pred naselitvijo smo vsako žival stehtali (živa teža) in ji pod lupo določili spol. V poskus smo naselili oba spola. V pokrove posodic smo zvrtili luknje, da smo omogočili kroženje zraka. En vogal posodice smo dodatno navlažili in s tem ustvarili vlažnostni gradient. V posodice smo postavili tudi kamne, da so se živali lahko zadrževal ob njih. Živali smo izpostavili za 14 dni. Posode smo pustili na sobni temperaturi, živali smo vsak dan kontrolirali ter uravnavali vlažnost.

Po 14 dneh smo živali za en dan dali v posode napolnjene z neonesnaženimi listi leske, da izpraznijo črevesje. Po enem dnevu smo vsako žival stehtali, jo dali v svojo plastično tubo in postavili za en dan v zamrzovalnik (-24°C).

Pred analizami smo vzorce liofilizirali, vzorci so bili v odprtih epicah v liofilizerju 5 dni. Nato smo vsako žival stehtali (suha teža).

Za razklop smo cele živali dali vsako v svojo epruveto in dodali 1,5 mL dušikove/perklorove kisline (7:1) ter segrevali v termobloku. Segrevanje poteka zelo počasi in postopno, da mešanica ne zavre. Segrevamo do temperature 210°C, tako da izhlapi vsa kislina, izhlapeti pa morajo tudi kondenz, ki se nabere na stenah epruвет. Postopek traja okoli 14 ur. Živali se popolnoma raztopijo, na stenah epruвет ostanejo le usedline kovin.

Po razklopu dodamo v epruветe 5 mL 0,1% dušikove kisline (HNO₃), da se usedlina raztopi (resuspenzija).

Meritve Pb, Zn in Cd smo opravili na plamenskem absorpskem spektrometru (Perkin Elmer Analyst 100). Za umeritev smo uporabili komercialne standardne raztopine (Merck). Kontrolna skupina je obsegala 15 živali, ki so bile izpostavljene neonesnaženim tlem (139,6±3,4 mg kg⁻¹ Pb; 464,1±mg kg⁻¹ Zn; 2,84±0,08mg kg⁻¹ Cd, določeno z zlatotopko) in so bile obravnavane enako po zgoraj opisanem postopku.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA

Statistične razlike med koncentracijami Pb, Zn in Cd v rakah enakonožcih, ki so bili izpostavljeni onesnaženim tlom in tlom remediranimi s spiranjem z različnimi koncentracijami EDTA, smo določili z Duncanovim testom pri 95% intervalu zaupanja (P<0,05). Prav tako smo uporabili ta test za statistično analizo BAF. Uporabili smo program Stathgraphics plus za Windows 4.0.

Za ugotavljanje korelacije med koncentracijami kovin v telesu *P. scaber*, kovin v tleh ter z ekstrakcijskimi testi določene mobilnosti in biodosegljivosti kovin smo uporabili metodo linearne regresije (Microsoft Office Excel 2003).

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 z EDTA je zmanjšala vsebnost Pb, Zn in Cd v analiziranih tleh. Izpiranje tal z štirimi različnimi koncentracijami EDTA (2,5, 10, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA) je pričakovano zmanjšalo vsebnost Pb, Zn in Cd v tleh. Z remediacijo smo odstranili 6, 41, 54 in 73 % začetnega Pb; 3, 13, 20 in 23 % začetnega Zn in 17, 54, 66 in 74 % začetnega Cd v posameznih obravnavanjih.

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 razmer je	* Tekstu rni razred	CEC (mmol C ⁺ 100 g ⁻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

Pokazalo se je, da je bila ta metoda remediacije uspešna pri odstranjevanju Pb in Cd, manj uspešna pa je bila pri odstranjevanju Zn iz tal.

Po remediaciji se je pH tal zvišal, vsebnost organske snovi pa se je zmanjšala. Primerjava pH in vsebnosti organske snovi po remediaciji z različnimi koncentracijami EDTA ni pokazala sprememb.

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 (29,2%) in na organsko snov (63,5%). Spiranje z EDTA je odstranilo velik del Pb, ki je bil vezan na karbonate in na organsko snov. Spiranje z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA je odstranilo 85% Pb vezanega na karbonate in 75,4 % Pb vezanega na organsko snov. Pred remediacijo je bil večji del Zn vezan na organsko snov (30,8%) in na frakcijo preostanka (45,1%). Le manjši del Zn je bil vezan na najbolj dostopni frakciji, na frakcijo v talni raztopini (0,1%) in v izmenljivi frakciji (2%), kar do neke mere pojasni slabšo učinkovitost EDTA pri odstranjevanju Zn iz tal. Pri spiranju z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA se je odstranilo 87,9% Zn vezanega na karbonate in 87,2% Zn vezanega na Fe in Mn-

okside. Pred remediacijo je bil največji delež Cd vezan na karbonate (48%) in na organsko snov (30,4%). Po spiranju s 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA je bilo odstranjenih 88% Cd vezanega na karbonate in 47,5% Cd vezanega na organsko snov. Cd je bil uspešno odstranjen iz vseh 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, pri čemer ponovitve predstavljajo trije vzorci iz ene kolone. LOQ, pod mejo določanja.

	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
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
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 OCENA MOBILNOSTI Pb, Zn in Cd (rezultati TCLP testa)

Rezultati TCLP ekstrakcije Pb, Zn in Cd v tleh pred in po remediaciji so podani v Preglednici 3.

Z remediacijo smo uspešno zmanjšali mobilnost analiziranih kovin. Po izpiranju z 2,5 mmol kg⁻¹ EDTA se je mobilnost Pb zmanjšala za 14,4%, Zn za 26,9% in Cd za 26,6%. Mobilnost Pb se je po izpiranju z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA zmanjšala za 87,8%, mobilnost Cd pa za 71,7%. Mobilnost Zn pa se je po izpiranju z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA zmanjšala za 88,4% v primerjavi z mobilnostjo pred remediacijo tal.

Preglednica 3: Koncentracije Pb, Zn in Cd v TCLP ekstraktu v onesnaženih in remediiranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom, pri čemer ponovitve predstavljajo trije vzorci iz ene kolone.

TLA	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
Onesnažena tla	22,20±0,72	42,36±2,29	1,73±2,29
2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	19,00±0,20	30,95±0,72	1,27±0,08
10 mmol kg ⁻¹ EDTA	13,20±0,53	20,72±1,34	0,68±0,02
40 mmol kg ⁻¹ EDTA	7,67±0,61	8,39±0,17	0,35±0,12
4X40 mmol kg ⁻¹ EDTA	2,73±0,95	4,92±0,64	0,49±0,06

4.4 OCENA ORALNE BIODOSEGLJIVOSTI (rezultati PBET testa)

Rezultati PBET za Pb, Zn in Cd v onesnaženih in remediiranih tleh so podani v Preglednici 4.

Z remediacijo se je zmanjšala oralna-biodosegljivost Pb v želodčni fazi. Pri remediaciji z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA se je oralna-biodosegljivost Pb zmanjšala za 87,6%. Oralna-biodosegljivost Zn v želodčni fazi se je s spiranjem z najvišjo koncentracijo EDTA zmanjšala za 68%. Koncentracija Cd se je že s spiranjem z 10 mmol kg⁻¹ EDTA zmanjšala pod mejo določanja.

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 Pb zmanjšala za 83,6 %, pri Zn za 70,2% od začetne biodosegljivosti. Koncentracija Cd je bila pod mejo detekcije že v onesnaženih tleh.

Preglednica 4: Oralna biodosegljivost Pb, Zn in Cd v želodčni in črevesni frakciji v onesnaženih in remediiranih tleh, določena s fiziološko osnovanim ekstrakcijskim testom (PBET). Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom, pri čemer ponovitve predstavljajo trije vzorci iz ene kolone.

TLA	ŽELODČNA FAZA			ČREVESNA FAZA		
	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
Onesnažena tla	518,67±71,84	249,25±30,87	4,07±1,17	264±52,12	146,11±27,22	0,00
2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	514,67±56,90	208,06±21,57	1,60±0,28	246,67±36,90	129,16±15,59	0,00
10 mmol kg ⁻¹ EDTA	336,00±166,43	146,24±55,19	0,00	160,67±21,39	87,95±11,91	0,00
40 mmol kg ⁻¹ EDTA	136,00±8,72	93,37±3,396	0,00	62,00±17,78	48,36±6,27	0,00
4x40 mmol kg ⁻¹ EDTA	63,33±21,20	80,00±13,08	0,00	19,33±3,06	43,59±2,56	0,00

4.5 OCENA BIODOSEGLJIVOSTI ONESNŽAIL RASTLINAM (rezultati DTPA testa)

Rezultati DTPA ekstrakcije za onesnažena in remediirana tla podani v preglednici 5.

Z remediacijo z EDTA se je uspešno zmanjšala rastlinam dostopna koncentracija kovin v tleh. S spiranjem z 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA smo zmanjšali dostopnost Pb za rastline za 94,3%, Zn za 90,5% in Cd za 95,1%.

Preglednica 5: Rastlinam dostopne koncentracije Pb, Zn in Cd določene z DTPA ekstrakcijskim testom v onesnaženih in remediiranih tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev s standardnim odklonom, pri čemer ponovitve predstavljajo trije vzorci iz ene kolone.

TLA	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
Onesnažena tla	952,00±2,8	229,70±15,8	12,2±1,2
2,5 mmol kg ⁻¹ EDTA	986,380±5,3	189,3±4,0	9,3±0,1
10 mmol kg ⁻¹ EDTA	645,7±45,6	108,4±6,7	3,8±0,3
40 mmol kg ⁻¹ EDTA	212,3±1,0	40,6±2,0	1,3±0,0
4x40 mmol kg ⁻¹ EDTA	78,1±4,9	21,9±2,1	0,6±0,0

4.6 AKUMULACIJA KOVIN V RAKIH ENAKONOŽCIH (*Porcellio scaber*)

Primerjali smo akumulacijo Pb, Zn in Cd v telesu testne živali *P. scaber* po 14 dnevni izpostavitvi v onesnaženih in remediranih tleh. Povprečno vrednost koncentracije kovin v telesu kontrolne skupine smo odšteli od vsake izmerjene vrednosti za posamezno žival.

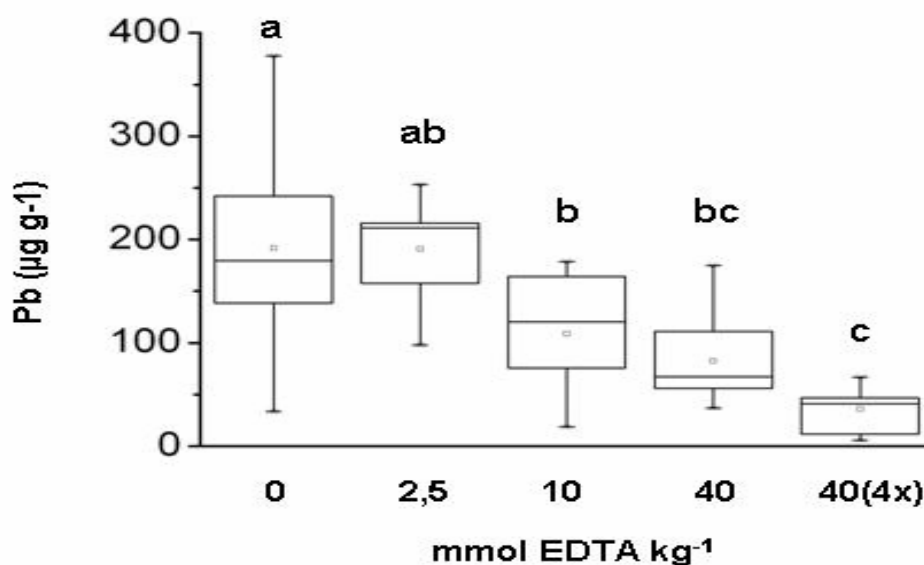
Izračunali smo tudi bioakumulacijske faktorje (BAF) za vsako žival glede na celokupno koncentracijo kovin v tleh, ter BAF za vsako žival glede na koncentracijo kovin v posamezni talni frakciji.

BAF smo izračunali po formuli:

$$\text{BAF} = \frac{a}{b} \quad \dots (1)$$

kjer je: a = koncentracija akumulirane kovine v telesu vrste *P. scaber*
 b = celokupna koncentracija kovin v tleh oz. koncentracija kovin v posamezni frakciji, določena s kemijskimi ekstrakcijami

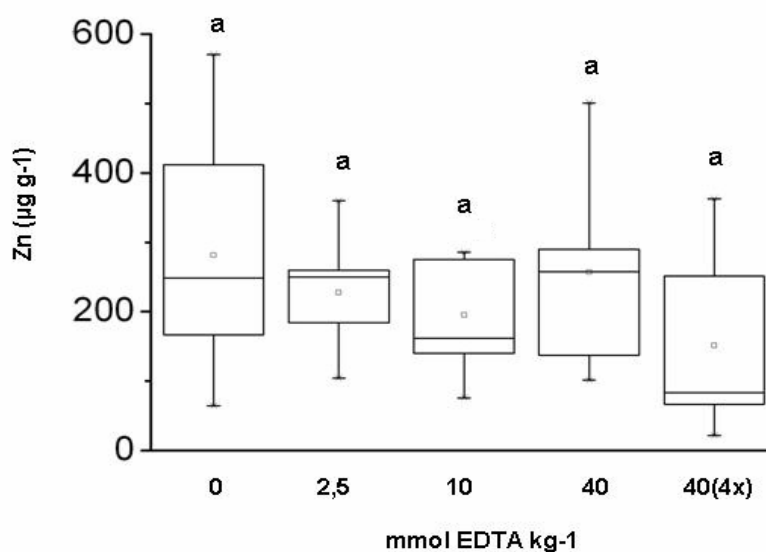
Rezultati kažejo, da so živali, ki so bile izpostavljene tlem, ki so bila sprana z višjo koncentracijo EDTA, akumulirale manjšo količino kovin, kot tiste, ki so bile izpostavljene tlem spranim z nižjo koncentracijo EDTA oziroma onesnaženim tlem.



Slika 2: Koncentracije Pb v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (•), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Pb v telesu vrste *P. scaber*. (a,b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).

Pri akumulaciji Pb se kažejo statistično značilne razlike ($P < 0,05$) med akumulacijo v telesu živali, ki so bile izpostavljene onesnaženim tlem, tlem spranim z 10 mmol kg^{-1} EDTA ter tlem spranim z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA.

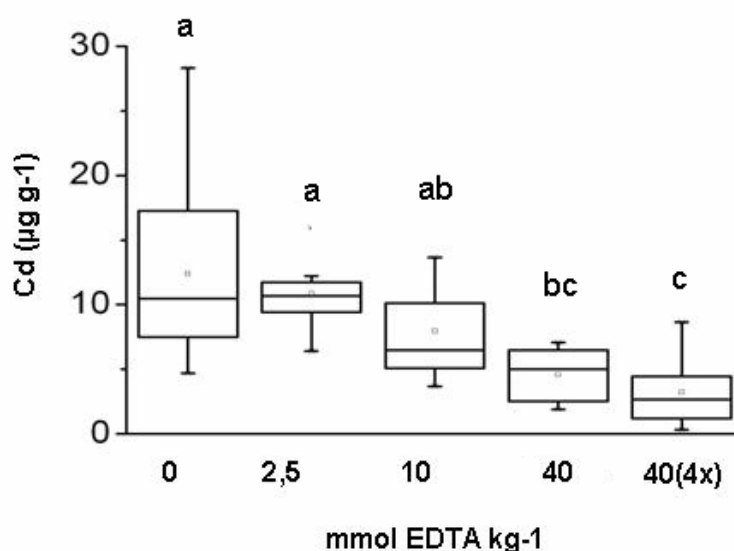
Živali izpostavljene tlem spranim z $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA so akumulirale statistično značilno manj Pb kot živali v onesnaženih tleh ($P < 0,05$). Na grafu opazimo trend upadanja akumulacije Pb v telesih testnih živali, ki so bile izpostavljene tlem spranim z višjimi koncentracijami EDTA, kar kaže, na to, da je v primeru manjše koncentracije kovin v tleh, manjša tudi vsebnost v živalih.



Slika 3: Koncentracije Zn v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (°), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Zn v telesu vrste *P. scaber*. (a) označuje statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).

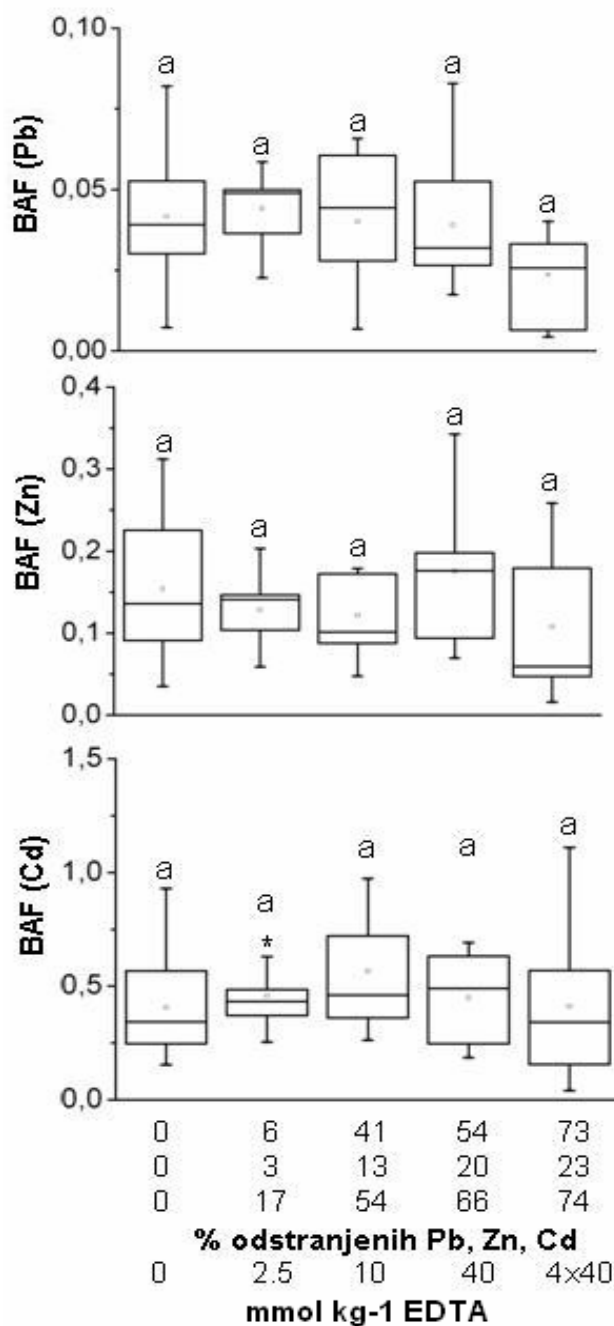
Pri akumulaciji Zn (Slika 3) ne obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med posameznimi skupinami.

Spiranje tal z 2,5 mmol kg⁻¹ EDTA za odstranjevanje Zn iz tal je bilo manj učinkovito kot spiranje Pb. Zaradi tega so živali akumulirale skoraj enako Zn kot v onesnaženih tleh. Pri spiranju s 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA smo namreč odstranili samo 23% Zn iz tal.



Slika 4: Koncentracije Cd v telesu testnih živalih vrste *P. scaber*. Okvir z ročaji prikazuje minimum, prvi kvartil, povprečno vrednost (°), mediano, tretji kvartil in maksimum vrednosti akumuliranega Cd v telesu vrste *P. scaber*. (a,b,c) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test, $p < 0,05$).

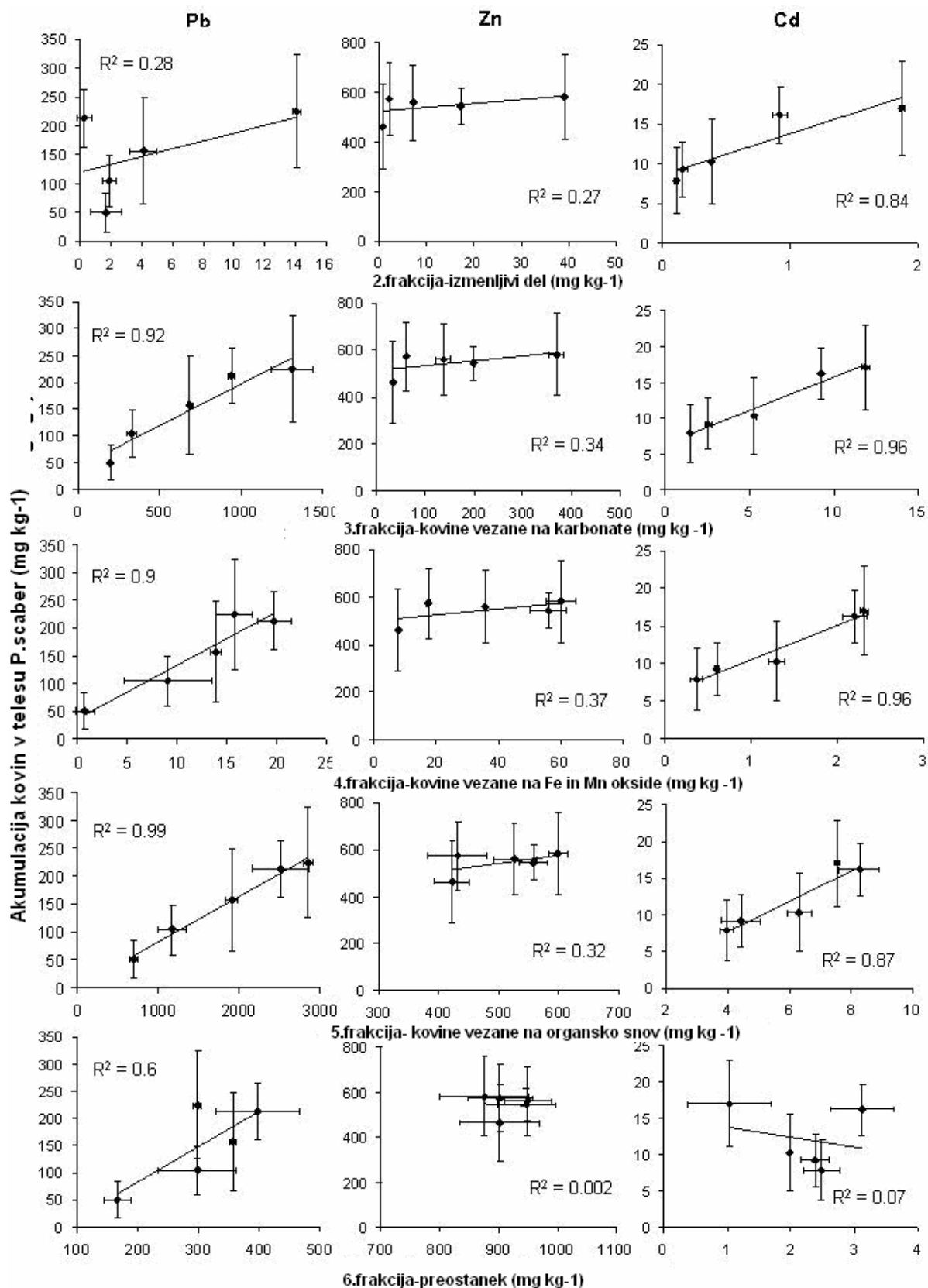
Kadmij smo uspešno odstranili iz tal (Preglednica 2). Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) se kažejo med akumulacijo Cd v živalih izpostavljenim onesnaženim tlem, tlem spranim z 10, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA. Med akumulacijo Cd v živalih izpostavljenim onesnaženim tlem ter tlem spranim z 2,5 mmol kg⁻¹ EDTA ni statistično značilnih razlik. Tudi pri Cd vidimo trend upadanja količine tega elementa v živalih izpostavljenim tlem spranim z višjimi koncentracijami EDTA.



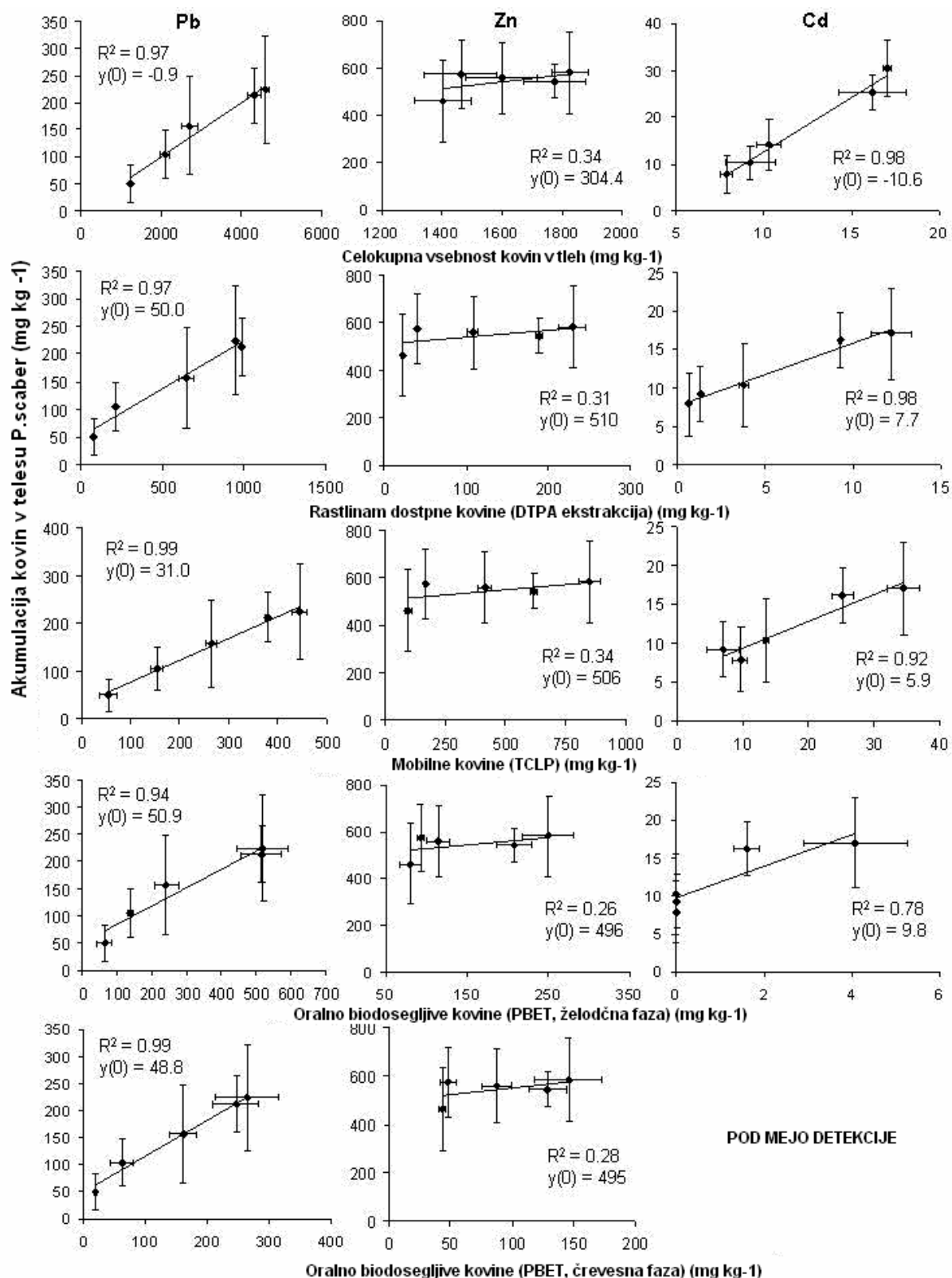
Slika 5: Bioakumulacijski faktorji za Pb, Zn in Cd.

Pri BAF za Pb se ne kažejo statistično značilne razlike med onesnaženimi tlemi ter tlemi tretiranimi z EDTA. BAF se v različno spranih tleh ne spreminjajo, oziroma se ne zmanjšujejo, kot smo pričakovali (Slika 5).

Pri BAF za Zn ni statistično značilnih razlik med onesnaženimi tlemi ter tlemi spranimi z 2,5, 10, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA (Slika 5). Tudi med BAF za Cd ni statistično značilnih razlik (Slika 5).



Slika 6: Koncentracije akumuliranega Pb, Zn in Cd v telesu vrste *P. scaber* kot funkcija teh kovin prisotnih v različnih talnih frakcijah določenih s šest-stopenjsko sekvenčno ekstrakcijo.



Slika 7: Koncentracije akumuliranega Pb, Zn in Cd v telesu vrste *P. scaber* kot funkcija teh kovin glede na celokupno koncentracijo (ekstrakcija z zlatotopko), dostopnost rastlinam (DTPA ekstrakcija), mobilnost (TCLP ekstrakcija) ter oralno biodosegljivost (PBET test).

Primerjali smo tudi koncentracije akumuliranih kovin v telesu izopodov in njihovo koncentracijo v posameznih talnih frakcijah določenih s selektivnimi kemijskimi ekstrakcijskimi testi.

Linearno korelacijo z $R^2 > 0,5$ smo potrdili med koncentracijami akumuliranega Pb v telesu vrste *P. scaber* in Pb v frakciji vezani na karbonate, na Fe in Mn okside, organsko snov in frakcijo preostanka (Slika 6). Največji delež Pb je bil vezan na organsko snov, iz katere smo ga z remediacijo uspešno odstranili (Preglednica 2). Z višjo stopnjo remediacije je tako ostalo na voljo manj biodosegljivega Pb za akumulacijo.

Linearna korelacija ($R^2 > 0,5$) obstaja med koncentracijami akumuliranega Cd v telesu vrste *P. scaber* in koncentracijami Cd vezanega na izmenljivo in karbonatno frakcijo ter v organski snovi (Slika 6).

Linearna korelacija med koncentracijami akumuliranega Zn in Zn vezanega na posamične talne frakcije, kot tudi celokupne koncentracije Zn v tleh je manj izrazita ($R^2 > 0,4$) (Sliki 6 in 7).

Na Sliki 7 je natančneje prikazana linearna korelacija med akumulacijo kovin v telesu vrste *P. scaber* in koncentracijami kovin pridobljenimi z različnimi ekstrakcijskimi testi (PBET, DTPA in TCLP).

Linearna korelacija obstaja med koncentracijami akumuliranega Pb v telesu živali in koncentracijami Pb v vseh treh testih ($R^2 > 0,5$).

Linearna korelacija obstaja med koncentracijami akumuliranega Cd v telesu živali in koncentracijami Cd v DTPA in TCLP testu ($R^2 > 0,5$). V črevesni fazi pri testu PBET so bile koncentracije Cd pod mejo detekcije.

Linearne korelacije za Pb in Cd kažejo, da se koncentracije dosegljivih kovin znižujejo z višjo stopnjo remediacije z EDTA. To se kaže tako z rezultati ekstrakcijskih testov kot tudi z akumulacijo v telesu vrste *P. scaber*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Remediacija tal

Za poskus smo izbrali tla iz Mežiške doline, ki so močno onesnažena s potencialno strupenimi kovinami, kar je posledica večstoletnega delovanja rudnika in metalurške aktivnosti. Da bi zmanjšali onesnaženost smo tla remedirali z metodo spiranja tal z EDTA.

Celokupne koncentracije Pb, Zn in Cd v tleh pred remediacijo presegajo kritične imisijske vrednosti nevarnih snovi v tleh določene z Uredbo o mejnih in ... (Ur.L. 68/96)

Pričakovali smo, da bodo višje koncentracije EDTA iz tal sprale več kovin kot nižje koncentracije. Glede na vrednosti celokupnih koncentracij Pb, Zn in Cd v tleh po opravljeni remediaciji lahko to potrdimo.

Remediacija tal s spiranjem z EDTA je bila uspešna. Iz tal smo uspešno odstranili Pb in Cd, in sicer 73% vsega Pb in 74% vsega Cd. Čeprav smo iz tal sprali velik del Pb, so koncentracije Pb ostale nad kritično mejo. Razlog zato je močna onesnaženost tal s Pb in velik delež Pb, ki je močno vezan na organsko snov in je zato ligandu nedosegljiv. Spiranje tal s $4 \times 40 \text{ mmol kg}^{-1}$ EDTA je znižalo koncentracijo celokupnega Cd pod kritično mejo. Remediacija je bila malo manj uspešna pri spiranju Zn, kar pa smo pričakovali. Iz tal smo odstranili samo 23% skupnega Zn. EDTA ni tako učinkovita pri izpiranju Zn iz tal kot pri izpiranju drugih elementov. Velik del Zn je namreč vezan na frakcijo preostanka, kar pomeni, da je vključen v kristalno strukturo alumosilikatnih glinenih mineralov. To je tudi razlog za manjšo učinkovitost pri spiranju. Spiranje kovin iz tal z EDTA je namreč uspešnejše pri vodotopnih, izmenljivih in na karbonate vezanih kovinah (Peters, 1999).

Učinkovitost remediacije preverjamo z določanjem biodosegljivosti kovin, ki so ostale v tleh. To naredimo z različnimi ekstrakcijskimi testi ali z uporabo testnih organizmov, ki imajo sposobnost akumuliranja kovin v telesu.

S šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo ocenjujemo delež kovin, vezanih na biološko dostopne in biološko nedostopne talne frakcije. Iz rezultatov vidimo, da je največji delež Pb v onesnaženih in remediranih tleh vezan na organsko snov. Znano je, da se Pb močno veže na organsko snov, v kateri so pogosto ugotovljene najvišje koncentracije Pb (Kabata-Pendias in Pendias, 1984 cit. po Bačac 2005).

Z ekstrakcijskim testom TCLP smo določali mobilnost kovin v tleh pred in po remediaciji. Mobilnost kovin in drugih onesnažil je pokazatelj njihovega potencialnega izpiranja v bližnja vodna telesa, kar predstavlja nadaljnje onesnaževanje ter večje tveganje za vnos v prehransko verigo. Z remediacijo smo uspešno zmanjšali mobilnost vseh treh kovin. Koncentracije Pb, Zn in Cd so bile že pred remediacijo pod mejnimi vrednostmi, ki jih določa US EPA (5 mg L^{-1} za Pb, 250 mg L^{-1} za Zn in 1 mg L^{-1} za Cd), po remediaciji pa se je mobilnost še zmanjšala.

Po remediaciji se je biodosegljivost Pb, Zn in Cd v želodčnem ekstraktu zmanjšala. S spiranjem s 4×40 mmol kg^{-1} EDTA smo zmanjšali koncentracijo Cd pod mejo detekcije. Ocena oralne dosegljivosti, ki smo jo naredili s PBET testom, je pokazala, da uporaba kelatov močno zmanjša biološko dosegljivost.

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

Učinkovitost remediacije smo preverili tudi z *in vivo* testom. Uporabili smo vrsto izopodnih rakov, *Porcellio scaber*, ki je sposobna kopičenja kovin v svojem telesu, natančneje v prebavni žlezi oz. hepatopankreasu. Živali so bile 14 dni izpostavljene onesnaženim in remediiranim tlem.

Pričakovali smo, da bodo živali izpostavljene tlem spranim z višjo koncentracijo EDTA akumulirale manjšo količino kovin, kar se je tudi pokazalo (Slika 1 in Slika 3). Tudi v literaturi navajajo, da koncentracije kovin v izopodih naraščajo z večjimi koncentracijami kovin v okolju (Paoletti in Hassal, 1999; Heikens in sod., 2001; Gál in sod., 2008).

Živali izpostavljene tlem spranim s 4×40 mmol kg^{-1} EDTA so akumulirale manj Pb in Cd, kot tiste izpostavljene onesnaženim tlem. Manjše razlike v akumulaciji se kažejo pri Zn, saj so živali izpostavljene različno spranim tlem akumulirale približno enako koncentracijo Zn, čeprav smo tudi pri akumulaciji Zn pričakovali razlike. Vzrok temu lahko izvira iz manjše učinkovitosti EDTA za odstranjevanje Zn iz tal. Ekstrakcijski testi kažejo, da smo z remediacijo znižali biološko dosegljivost in mobilnost Zn (Preglednica 2, 3, 4, in 5), vendar rezultati o akumulaciji Zn v telesu tega ne potrdijo (Slika 3).

Zn ima antagonističen učinek na akumulacijo Cd. Z Zn bolj bogata hrana zmanjša akumulacijo Cd (Odendaal in Reinecke, 2004). V našem primeru to lahko pomeni, da v onesnaženih tleh Zn ovira akumulacijo Cd, v remediiranih tleh, pa se zaradi manjše količine Zn akumulira več Cd.

Predvidevamo, da razlike v akumulaciji Pb, Zn in Cd izvirajo iz razlik v vnosu, skladiščenju in kinetiki, ki je različna za vsako kovino ter iz različnih koncentracij teh kovin v okolju.

BAF smo izračunali za primerjavo bioakumulacije kovin po njihovem sprejemu iz onesnaženih in remediiranih tal. Pričakovali smo, da bodo BAF v tleh spranih z višjo koncentracijo EDTA manjši.

BAF se glede na zmanjšanje celokupnih koncentracij kovin v tleh niso spremenili oz. zmanjšali. Ni opaženega trenda povečanja ali zmanjšanja BAF (Slika 5) ali statistično značilnih razlik med BAF za Zn, Pb ali Cd v onesnaženih ter remediiranih tleh. To kaže na precej stalno razmerje med biološko dostopnimi in biološko nedostopnimi oblikami Pb, Zn in Cd v onesnaženih in remediiranih tleh. Rezultati nakazujejo, da v tleh spranih z najvišjo koncentracijo EDTA ostane del biodostopne frakcije, ki jo organizem lahko privzame. Če bi biodostopne frakcije popolnoma odstranili, bi bili v onesnaženih tleh BAF višji kot v spranih tleh. Čeprav smo z ekstrakcijskimi testi dobili podatke o zmanjšanju koncentracij biodosegljivih kovin v tleh z remediacijo, so živali vseeno akumulirale kovine. To kaže, da je vrsta *P. scaber* sposobna pridobiti kovine iz večjih frakcij, ne samo iz vodotopnih in lahko

izmenljivih, kot smo predvidevali. Sposoben pa je pridobiti tudi tiste oblike kovin, ki sicer niso dostopne ekstraktantom.

Ugotovili smo linearno povezavo med akumulacijo kovin v telesu testnih živali in koncentracijo kovin v posameznih talnih frakcijah (Slika 6) v onesnaženih in remediiranih tleh, ter tudi med posameznimi ekstrakcijskimi testi (Slika 7). Vrednosti na grafu nakazujejo, da lahko vrsta *P. scaber* privzame kovine tudi iz frakcij, kjer ekstrakcijski test pokaže, da ni biodosegljivih kovin. Živali niso akumulirale samo mobilnega Pb, ker je koncentracija Pb izmerjena z TCLP testom prenizka. Živali so akumulirale Pb tudi iz drugih frakcij. Verjetno je bil velik del Pb akumuliran iz oralno-biodostopne frakcije. Kovine, ki naj bi bile biodostopne glede na rezultate ekstrakcijskih testov (presečišča regresijskih premic z ordinato, Sliki 6 in 7), so bile za živali dostopne.

Zgolj z uporabo *in vitro* testov očitno ne dobimo prave ocene o dejanski biodosegljivosti kovin. Kot dodatek za vrednotenje biodosegljivosti je torej priporočljivo uporabiti tudi *in vivo* teste akumulacije, saj ti zajemajo tudi kompleksnost organizma ter interakcije med organizmom in okoljem.

5.2 SKLEPI

Remediacija tal z izpiranjem z EDTA je učinkovito zmanjšala koncentracije Pb, Zn in Cd v tleh. Spiranje tal z višjimi koncentracijami EDTA je odstranilo statistično značilno več Pb, Zn in Cd iz tal kot spiranje z nižjimi koncentracijami.

Testne živali *P. scaber*, ki so bile izpostavljene tlom spranim z višjimi koncentracijami EDTA, so po 14 dnevni izpostavitvi akumulirale manj Pb, Zn in Cd kot tiste izpostavljene neremediranim tlom oz. tlom remediranim z nižjimi koncentracijami EDTA. To tudi potrди našo hipotezo, da je akumulacija v vrsti *P. scaber* primeren pokazatelj celokupne koncentracije kovin v tleh.

Vrsta *P. scaber* lahko pridobi kovine iz večih frakcij in ne samo iz vodotopnih in lahko izmenljivih.

Akumulacijski test z izopodi vrste *P. scaber* se lahko uporabi kot dodatek k ekstrakcijskim testom za ocenjevanje učinkovitosti remediacije tal in biodosegljivosti kovin za talno favno.

6 POVZETEK

Za poskus smo uporabili tla iz Mežiške doline, ki so močno onesnažena. Tla smo remediirali po metodi spiranja z EDTA. Tla smo spirali z različnimi koncentracijami EDTA in sicer 2,5, 10, 40 in 4x40 mmol kg⁻¹ EDTA. Učinkovitost remediacije smo ugotavljali z ekstrakcijskimi testi: s šest stopenjsko sekvenčno ekstrakcijo določamo frakcionacijo kovin, s testom TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) mobilnost onesnažil, s testom PBET (Physiologically Based Extraction Test) določamo oralno biodosegljivost kovin in testom DTPA, s katerim določamo fitodostopnost kovin. Dodatno pa smo preverili učinkovitost remediacije in biodosegljivosti kovin po remediaciji z merjenjem akumulacije kovin v telesu testnega organizma. Kot testni organizem smo uporabili vrsto *P. scaber* (Isopoda, Crustacea), ki je sposobna akumulirati kovine v telesu, večji del kovin se akumulira v hepatopankreasu.

Remediacija tal je bila uspešna, odstranili smo 73% vsega Pb in 74% vsega Cd. Malo manj je bila uspešna pri odstranjevanju Zn, odstranili smo ga le 23%. Tudi ekstrakcijski testi so pokazali, da smo Pb, Zn in Cd uspešno odstranili iz tal. Živali, ki so bile izpostavljene tlem spranim z višjimi koncentracijami EDTA so akumulirale manj kovin, kar potrjuje uspešnost remediacije.

Natančnejša primerjava koncentracije kovin v telesu organizma in koncentracije določene s testi je pokazala linearno povezavo med koncentracijo kovin v posamezni talni frakciji in koncentracijo kovin v telesu vrste *P. scaber*. Dobljeni podatki nakazujejo, da je vrsta *P. scaber* sposobna privzeti kovine tudi iz težje dostopnih frakcij in ne samo iz vodotopnih in lahko izmenljivih.

7 VIRI

- Arndt U., Nobel W., Schweizer B. 1987. Bioindikatoren: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer: 388 str.
- Bačac 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.
- Connel D., Lam P., Richardson B., Wu R. 1999. Introduction to Ecotoxicology. Great Britain, Blackwell Science: 170 str.
- 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: 115-134
- 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
- Drobne D. 1997. Terrestrial isopods-a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1159-1164
- Drobne D. 1996. Zinc toxicity to terrestrial isopods (*Isopoda*, *Crustacea*). Dissertation thesis. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 114 str.
- Finžgar N., Leštan D. 2006. Heap leaching of Pb and Zn contaminated soil using ozone/UV treatment of EDTA extractants. *Chemosphere*, 63: 1736-1743
- Finžgar N., Leštan D. 2007. Multi-step leaching of Pb and Zn contaminated soils with EDTA. *Chemosphere*, 66: 824-832
- Gál J., Markiewicz-Patkowska J., Hursthouse A., Tatner P. 2008. Metal uptake by woodlice in urban soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69:139-149
- 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
- Heikens A., Peijnenburg W.J.G.M., Hendriks A.J. 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, 113: 385-393
- Hopkin S.P., Jones D.T., Dietrich D., 1993. The isopod *Porcellio scaber* as a monitor of the bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: towards a global »woodlouse watch« scheme. *The Science of the Total Environment*, 134: 357-365

- Hopkin S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. London, New York, Elsevier applied science: 366 str.
- SIST ISO 14235. Kakovost tal – Določanje organskega ogljika z oksidacijo v kromžvepleni kislini. 1995: 5str.
- Kabala C., Singh B.R. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead and zinc in soil profiles in the vicinity of copper smelter. *Journal of Environmental Quality*, 30: 485-492
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1992. Trace elements in soil and plants. 3. izdaja. Pulawy, Poland, Institute of Soil Science: 432 str.
- Kononenko L. 2006. Standardizacija testov strupenosti kemikalij v kopenskem okolju. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 87 str.
- Lazarini F., Brenčič J. 2004. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, Stanislav Kupelj, s.p.: 557 str.
- 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 Pb and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination*, 12(4): 507-522
- Leštan D., Chun-Lio L., Xiang-Dong L., 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 DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428
- 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
- Odendaal J.P., Reinecke A.J. 2004. Evidence of metal interaction in the bioaccumulation of cadmium and zinc in *Porcellio laevis* (Isopoda) after exposure to individual and mixed metals. *Water Air and Soil Pollution*, 156: 1-4
- Paoletti M.G., Hassall M. 1999. Woodlice (*Isopoda*, *Oniscidea*): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 74: 157-165

- Peters R.W. 1999. Chelant extraction of heavy metals from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 66: 151-210
- 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
- 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
- Rivero V.C., Masedo M.D. De le Villa R.V. 2000. Effect of soil properties on zinc retention on agricultural soils. *Agrochimica*, 43: 46-54
- 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., Leštan D. 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after soil remediation. *Environmental Pollution*, 148: 663-668
- Udovič M., Leštan D. 2008. Remediacija zemljine z območja stare cinkarne v Celju z metodo stabilizacije s cementom. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91: 283-295
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih emisijskih vrednostih 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.
- Zidar P., Božič J., Štrus J. 2005. Behavioural response in the Terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) Offered a Choice of Uncontaminated and Cadmium-Contaminated Food. *Ecotoxicology*, 14: 493-502
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana, Agencija RS za okolje: 63 str.
- Slika *Porcellio scaber*.
<http://www.biolib.cz/en/image/id16638/> (20.12.2009)

ZAHVALA

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

Hvala somentorici prof. dr. Damjani Drobne za pomoč pri postavitvi poskusa z živimi organizmi, vodenje in vzpodbudo.

Posebej bi se zahvalila tudi asist. dr. Metki Udovič za pomoč pri delu v laboratoriju, za vse razlage in nasvete, ter pomoč pri izdelavi te naloge.

Hvala staršem in sestri za podpiranje v času študija.

Hvala Marku za razumevanje in podporo.