

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tanja STRUNA

**FRAKCIONACIJA SVINCA IN CINKA TER
VSEBNOST GLOMALINA V TLEH IZ ŽERJAVA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tanja STRUNA

**FRAKCIONACIJA SVINCA IN CINKA TER VSEBNOST
GLOMALINA V TLEH IZ ŽERJAVA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**LEAD AND ZINC FRACTIONATION AND GLOMALIN CONTENT
IN SOILS OF ŽERJAV**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni delo smo opravili na Centru za pedologijo in varstvo okolja in Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 17. 01. 2008 za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Heleno Grčman in za somentorja prof. dr. Dominika Vodnika.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Helena GRČMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Domen LEŠTAN
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.

Tanja Struna

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 631.417.2: 631.466.12: 549.25 (043.2)
KG frakcionacija/težke kovine/svinec/Pb/cink/Zn/sekvenčna ekstrakcija/
glomalin/GRSP/arbuskularna mikoriza/sekvestracija/Žerjav
KK AGRIS P30/P33/T01
AV STRUNA, Tanja
SA GRČMAN, Helena (mentor)/ VODNIK, Dominik (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2008
IN FRAKCIONACIJA SVINCA IN CINKA TER VSEBNOST GLOMALINA V
TLEH IZ ŽERJAVA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 34 str., 9 pregl., 12 sl., 31 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V nalogi smo ugotavljali frakcionacijo Pb in Zn v onesnaženih tleh Mežiške doline (Slovenija), vsebnost skupnega glomalina (TG) in lahko izločljivega glomalina (EEG) ter sekvestracijo Pb in Zn na TG. Izbrali smo 21 talnih vzorcev iz okolice talilnice Pb, s skupno vsebnostjo Pb od 270 do 18400 mg kg⁻¹ in Zn od 62 do 1450 mg kg⁻¹. Frakcionacijo Pb in Zn smo ugotavljali z modificirano šeststopenjsko Tessierjevo sekvenčno ekstrakcijo, količino skupnega glomalina v tleh po ekstrakciji s citratom, sekvestracijo Pb in Zn na TG pa v izločenem glomalinu po razkroju z zlatotopko. Analize so pokazale, da je bil največji delež Pb vezanega na organsko snov (4,4-76 %), na karbonate (18,1-73,0 %) ali pa se izločil v zadnji frakciji kot ostanek (3,8-65,5 %). Dostopnih oblik Pb je bilo od 0-4,5 %, zelo majhen delež Pb je bil vezan na Fe in Mn okside (po 0,4 %). Tudi pri Zn smo izmerili velik delež vezanega na organsko snov in karbonate, izmerili pa smo več dostopnih oblik (0,5 % do 27,4 %). Ugotovili smo, da je v tleh od 3,3 do 67,1 mg g⁻¹ tal TG, kar pomeni od 5 do 21 % organske snovi in od 1,18 do 4,72 mg g⁻¹ tal EEG. Statistično značilne korelacije smo ugotovili med TG in količino organske snovi v tleh ter med TG in skupnimi vsebnostmi Pb in Zn v tleh. Gram TG je vazal od 0,69 do 23,4 mg Pb in od 0,42 in 3,71 mg g⁻¹ Zn. Med svincem vezanim na TG in svincem na organski snovi smo ugotovili statistično značilno korelacijo, med cinkom na TG in cinkom vezanim na organski snovi korelacije ni bilo. Med rezultati vezave Pb in Zn na organsko snov, ki jih daje sekvenčna ekstrakcija, in meritvami Pb in Zn na TG smo ugotovili odstopanja, ki so verjetno posledica različnih analitskih postopkov, ki omejujejo možnost natančne ocene pomena glomalina pri sekvestraciji Pb in Zn.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 631.417.2: 631.466.12: 549.25 (043.2)
CX soil fractionation/heavy metal/lead/Pb/ zinc/Zn/sequential extraction/glomalin related soil protein/GRSP/arbuscular mycorrhiza/sequestration/Žerjav
CC AGRIS P30/P33/T01
AU STRUNA, Tanja
AA GRČMAN, Helena (supervisor)/VODNIK, Dominik (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2008
TI FRACTIONATION OF LEAD AND ZINC AND GLOMALIN CONTENT IN SOILS OF ŽERJAV
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 34 p., 9 tab., 12 fig., 31 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We investigated soil Pb and Zn fractionation, the content of total glomalin (TG) and easily extractable glomalin (EEG) and sequestration of Pb and Zn on TG in 21 soil samples from Mežica valley, sampled in the vicinity of lead smelter, with total concentrations of Pb from 270 to 18400 mg kg⁻¹ and Zn from 62 to 1450 mg kg⁻¹. To determine the heavy metal distribution between soil fractions a modified sequential extraction procedure according to Tessier was used. The analysis of soil samples showed that the majority of Pb was bound to soil organic fraction (4.4-76 %), carbonates (18.1-73.0 %) and in the residual fraction (3.8-65.5 %), small share of Pb was bound in a form that is soluble in soil solution and exchangeable from the soil colloids (0-4.5 %) and bound to Fe and Mn oxides (up to 0,4 %). Zn fractionation was similar to Pb, with higher amount of phyto-available fraction (0.5 % - 27.4 %). The content of glomalin in soils varied from 3.3-67.1 mg g⁻¹ for TG and EEG from 1.18-4.72 mg g⁻¹ respectively. A correlation was found between TG and organic matter content and between TG and the total concentrations of Pb and Zn in soil. Gram of TG bound from 0.69-23.4 mg Pb and from 0.42-3.71 mg of Zn. The correlation was found between Pb bound to glomalin and Pb bound to organic matter content, but there was no correlation found for Zn on glomalin and Zn bound to organic matter. Differences between Pb and Zn bound to organic matter and Pb and Zn bound to TG, are probably results of different fractionation procedures. To estimate what is the exact contribution of glomalin in heavy metal sequestration, more analysis should be made.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	II
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Okrajšave in simboli	IX
	Slovarček	X
1	UVOD	1
1.1	POVOD ZA IZDELAVO NALOGE	1
1.2	NAMEN NALOGE	1
1.3	DELOVNA HIPOTEZA	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	SVINEC IN CINK	3
2.1.1	Toksičnost svinca in cinka	3
2.1.2	Viri svinca in cinka v tleh	3
2.1.3	Vezava in biodostopnost svinca in cinka v tleh	4
2.3	UGOTAVLJANJE KOLIČINE KOVIN V TLEH	5
2.3.1	Metoda sekvenčnih ekstrakcij	5
2.4	VEZAVA TEŽKIH KOVIN NA ORGANSKO SNOV	6
2.4.1	Organska snov v tleh	6
2.4.2	Pomen organske snovi za vezavo TK v tleh	7
2.4.3	Arbuskularne mikorizne glive in glomalin, komponenta org. snovi	7
2.4.4	Struktura glomalina in njegova količina v tleh	8
2.4.5	Vezava težkih kovin na GRSP	9
3	MATERIAL IN METODE	10
3.1	OPIS VZORČNEGA MESTA IN VZORČENJE TAL	10
3.2	ANALITSKE METODE	11
3.2.1	Meritve osnovnih talnih lastnosti	12
3.2.2	Meritev frakcionacije Pb in Zn v tleh – metoda sekvenčnih ekstrakcij	12
3.2.3	Analiza glomalina	14
3.2.4	Vsebnost težkih kovin v glomalinu	15
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	15
4	REZULTATI	16
4.1	TALNE LASTNOSTI	16
4.1.1	Osnovne talne lastnosti vzorcev	16
4.1.2	Skupna vsebnost Pb in Zn	17
4.1.3	Vsebnost glomalina	17
4.1.4	Vpliv talnih lastnosti na vsebnost glomalina v tleh	17
4.2	FRAKCIONACIJA SVINCA IN CINKA	19
4.2.1	Frakcionacija Pb	19
4.2.2	Frakcionacija Zn	20

4.2.3	Primerjava frakcionacije Pb in Zn s skupno količino Pb in Zn v vzorcih	21
4.3	SEKVESTRACIJA Pb IN Zn NA GLOMALINU	23
4.3.1	Primerjava med frakcionacijo Pb in Zn na GRSP in vezavo Pb in Zn na frakcijo organske snovi v tleh	24
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1	RAZPRAVA	25
5.2	SKLEPI	28
6	POVZETEK	30
7	VIRI	32
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Štiri osnovne sheme sekvenčnih ekstrakcij za ugotavljanje frakcionacije TK v tleh (Ross, 1994)	6
Pregl. 2:	Pregled reagentov v postopku sekvenčnih ekstrakcij, modificirana metoda (Tessier in sod., 1979)	13
Pregl. 3:	Lastnosti talnih vzorcev	16
Pregl. 4:	Delež svinca v posameznih frakcijah (%)	19
Pregl. 5:	Delež cinka v posameznih frakcijah (%)	21
Pregl. 6:	Vsebnost Pb in Zn v internem referenčnem vzorcu z oznako MOL 10282	22
Pregl. 7:	Vsebnost Pb in Zn v Referenčnem vzorcu BCR 701	22
Pregl. 8:	Sekvestracija svinca in cinka na GRSP	23
Pregl. 9:	Delež GRSP od organske snovi v tleh in deleži Pb in Zn na GRSP od Pb in Zn na organski snovi ter delež Pb in Zn na GRSP od Pb in Zn, ki je vezan v prvih štirih frakcijah tal	28

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Mesto vzorčenja (Vodnik, 2005)	10
Sl. 2:	Zračni posnetek Žerjava. Označena je vzorčna lokacija (Vodnik, 2005)	11
Sl. 3:	Pisana vilovina- <i>Sesleria varia</i> subsp <i>calcaris</i> (Vodnik, 2005)	11
Sl. 4:	Ekstrakcija in kvantitativna analiza GRSP (Vodnik, 2005)	14
Sl. 5:	Meritev količine kovin na GRSP (Vodnik, 2005)	15
Sl. 6:	Povezava med organsko snovjo v tleh (mg kg^{-1}) in GRSP (mg g^{-1})	17
Sl. 7:	Povezava med skupnim Pb (mg kg^{-1}) v tleh in količino GRSP (mg g^{-1})	18
Sl. 8:	Povezava med skupnim Zn (mg kg^{-1}) in GRSP (mg g^{-1}) v tleh	18
Sl. 9:	Frakcionacija Pb (mg kg^{-1})	20
Sl. 10:	Frakcionacija Zn (mg kg^{-1})	20
Sl. 11:	Povezava med Pb na GRSP (mg/g TG) in Pb na organski snovi (mg/kg tal)	24
Sl. 12:	Povezava med Zn na GRSP (mg/g TG) in Zn na organski snovi (mg/kg tal)	24

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma – masna spektrometrija
Al	aluminij
Cd	kadmij
Cu	baker
Fe	železo
Mn	mangan
Na	natrij
Pb	svinec
Zn	cink
CaCl ₂	kalcijev klorid
Ca(NO ₃) ₂	kalcijev nitrat
H ₂ O	voda
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HCl	klorovodikova kislina
HF	fluorovodikova kislina
HClO ₄	perklorna kislina
HNO ₃	dušikova (V) kislina
HOAc	ocetna kislina
KNO ₃	kalijev nitrat
K ₄ P ₂ O ₇	kalijev difosfat
MgCl ₂	magnezijev klorid
Mg(NO ₃) ₂ ×6H ₂ O	magnezijev nitrat heksahidrat
NH ₄ C ₂ O ₄	amonijev oksalat
NH ₂ OH×HCl	hidroksilamin hidroklorid
NH ₄ Oac	amonacetat
NaOAc	natrijev acetat
Na ₂ -EDTA	natrijeva sol etilendiaminoocetne kisline
NaOH	natrijev hidroksid
Pb(OH)	svinčev hidroksid
PbCl	svinčev klorid
Pb(NO ₃) ₂	svinčev nitrat
Zlatotopka	zmes koncentrirane HCl in koncentrirane HNO ₃ v razmerju 3:1

SLOVARČEK

Frakcionacija težkih kovin

Porazdelitev težkih kovin v tleh med različne talne faze ali frakcije.

Sekvestracija

Oddelitev težkih kovin z vezavo na glomalinu.

Arbuskularna mikoriza

Simbiotski odnos med arbuskularnimi mikoriznimi glivami in rastlinami. Glive v koreninah rastlin tvorijo arbuskule, kjer poteka izmenjava sladkorjev, ki so za glivo vir ogljika in jih pri procesu fotosinteze proizvajajo rastline ter mineralov, slednje gliva posreduje rastlini.

1 UVOD

Težke kovine (TK) so vezane na različne talne komponente in se v tleh zadržujejo kot izmenljive na glinenih mineralih, vezane na Fe in Mn okside, adsorbirane na organsko snov in vezane na karbonate. Vezavo na različne komponente imenujemo tudi frakcionacija, uravnavana je s talnimi lastnostmi: teksturo tal, vsebnostjo organske snovi, glinenih mineralov, Al, Fe in Mn oksidi ter saturacijo, pH, zračnostjo in redoks potencialom tal. Ugotavljamo jo s postopki zaporednih (sekvenčnih) ekstrakcij, pri katerih uporabljamo serijo različno močnih ekstrakcijskih raztopin.

Največji vpliv na vezavo težkih kovin v tleh imata pH in organska snov (Leštan in Grčman, 2001). Sestava organske snovi je zelo kompleksna, tako da z ekstrakcijskimi postopki običajno ne moremo natančno ugotoviti porazdelitve TK med posameznimi organskimi frakcijami (Tessier in sod., 1979). TK se vežejo na huminske kisline (Boruvka in Drabek, 2004) ter tudi na v vodi netopne komponente humina (Hayes in Clapp, 2001).

Ena od snovi, ki sestavljajo humin, je glomalin, glikoprotein, ki naj bi ga proizvajale arbuskularne mikorizne glive (Wright in Upadhyaya, 1996, cit. po Vodnik in sod., 2008; Nichols, 2003, cit. po Vodnik in sod. 2008). Zaradi nepoznane kemijske zgradbe to snov imenujemo glomalinu soroden talni protein (GRSP) (Rillig, 2004), saj naj bi bilo ime glomalin rezervirano za protein z znano strukturo. Nedavne raziskave so pokazale veliko afiniteto glomalina za vezavo nekaterih težkih kovin (Cd, Cu in Pb), kar bi posledično pomenilo, da je ta sekvestracija lahko pomembna za biostabilizacijo težkih kovin v onesnaženih tleh (González-Chávez in sod., 2004).

V okviru diplomske naloge smo želeli z metodo sekvenčnih ekstrakcij ugotoviti frakcionacijo Pb in Zn na talne komponente in jih primerjati z vezavo na glomalin. Uporabili smo naravno onesnažena tla Mežiške doline, ki je s svincem najbolj onesnaženo območje v Sloveniji.

1.1 POVOD ZA IZDELAVO NALOGE

Predhodne raziskave vzorcev tal iz Mežiške doline so potrdile prisotnost glomalina v tleh z najbolj onesnaženih predelov, kjer bi lahko glomalin predstavljal pomemben dejavnik sekvestracije težkih kovin (Vodnik, 2007). Ker lahko ekstrakcija glomalina posega tudi na ekstrakcijo kovin iz tal, smo želeli primerjati rezultate, ki jih daje analiza vsebnosti Pb in Zn na ekstrahiranem glomalinu s frakcionacijo Pb in Zn na organski snovi, ki jo ugotavljamo z neodvisno metodo sekvenčnih ekstrakcij.

1.2 NAMEN NALOGE

Cilj raziskave je bil:

1. ugotoviti frakcionacijo Pb in Zn v tleh Mežiške doline
2. ugotoviti vsebnost GRSP v tleh
3. ugotoviti vezavo Pb in Zn na GRSP

4. primerjati sekvestracijo Pb in Zn na glomalinu z vezavo Pb in Zn na frakcijo organske snovi v tleh.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo s sekvenčnimi ekstrakcijami lahko potrdili:

- da je pomemben delež Pb in Zn v tleh Mežiške doline vezan na organsko snov,
- da je v tleh Mežiške doline prisoten glomalin, ter
- da ločeni metodi sekvenčne ekstrakcije in sekvestracije glomalina kažeta ujemanje pri ugotavljanju vezave Pb in Zn na glomalin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SVINEC IN CINK

Svinec in cink sta elementa v sledovih. To so elementi, ki se nahajajo v naravi v majhnih količinah in so v večjih količinah toksični za žive organizme (Adriano, 1986).

Adriano (1986) s terminom težke kovine označuje elemente, ki imajo gostoto večjo od 5 g cm^{-3} . Poleg terminov težke kovine, toksične kovine in elementi v sledovih, je v znanstveni literaturi in okoljskih študijah v uporabi tudi izraz potencialno toksični elementi (PTE) (Gadd, 1993, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Alloway, 1995, cit. po González-Chávez in sod., 2004). Težke kovine so kot prvine stabilni in obstojni onesnaževalci okolja, saj se v tleh ne razgrajujejo ampak ostajajo in se kopičijo. Njihovi toksični vplivi na žive organizme se kažejo v karcinogenosti, mutagenosti, izmenjavi koristnih ionov z uporabnimi in v blokiranju encimskih aktivnosti. Tudi v organizmih se večinoma kopičijo.

2.1.1 Toksičnost svinca in cinka

Pb je zelo razširjena potencialno nevarna snov in tudi eden najnevarnejših povzročiteljev bolezenskih stanj pri ljudeh, še posebno je nevaren dolgotrajen vnos v organizem, v količinah, ki sicer ne presegajo akutne meje toksičnosti. Pb povzroča nepravilnosti pri razmnoževanju. Povzroča tudi metabolne nepravilnosti in nevrofiziološke okvare pri otrocih, prizadene krvni in živčni sistem (Oliver, 1997, cit. po Leštan in Grčman, 2001). Pb pride v telo z zaužitjem rastlin, ki so rastle na tleh onesnaženih s Pb, z zaužitjem zemlje ali z vdihovanjem prašnih delcev.

Cink je za organizme esencialen element, saj ima pomembno vlogo v metabolnih procesih sinteze in razgradnje ogljikovih hidratov, proteinov in nukleinskih kislin kot aktivator nekaterih encimov. Je esencialno mikrohranilo tudi za človeka, saj ima pomembno vlogo v encimatskih procesih. Pomanjkanje Zn lahko povzroči anemijo, zaustavitev rasti, oslabelost imunskega sistema. Količine, večje kot 150 mg dan^{-1} , prav tako povzročijo oslabeitev imunskega sistema in pomanjkanje Cu v telesu (Zn je biloški antagonist Cu), količine Zn, večje od 440 mg dan^{-1} , lahko povzročijo želodčne razjede. Potrebna dnevna zaužita količina Zn za odraslega človeka je 15 do 22 mg. Maksimalna sprejemljiva količina vnosa Zn v organizem je 1 mg kg^{-1} telesne teže dan^{-1} (WHO, 1996).

2.1.2 Viri svinca in cinka v tleh

Izvore težkih kovin v tleh delimo na naravne in antropogene. Magmatske in metamorfne kamnine, ki predstavljajo 95 % zemeljske skorje, so najbolj pogost naravni vir TK v tleh. Sedimentne kamnine, ki predstavljajo preostalih 5 % Zemljine skorje, vsebujejo v povprečju manjše koncentracije težkih kovin, vendar so pomembnejše kamnine pri nastanku tal, saj se jih večina nahaja nad vulkanskimi (Ross, 1994).

Antropogeni viri težkih kovin so zelo pomembni, saj v primerjavi z naravnimi viri prispevajo 100 krat več svinca in 21 krat več cinka v tla (Ross, 1994). Najpomembnejši viri onesnaženja so sežiganje fosilnih goriv, rudarjenje in taljenje v plavžih, gnojila,

fitofarmaceutvska sredstva, komunalne odplake in blata čistilnih naprav, promet (osvinčeni bencin), kemične in druge industrijske aktivnosti (baterije, barve, akumulatorji in drugo) (Leštan in Grčman, 2001).

2.1.3 Vezava in biodostopnost svinca in cinka v tleh

Biodostopnost težkih kovin, toksičnost in njihov transport v okolje so odvisni od njihove kemijske oblike in vezave v tleh. Težke kovine so vezane na različne talne komponente, predvsem izmenljivo vezane na glinenih mineralih, na Fe in Mn oksidih, adsorbirane na organsko snov in vezane na karbonate. Tej vezavi rečemo tudi speciacija. Speciacijo kovin v tleh in izmenjavo v talno raztopino povzročajo številni procesi v tleh, ki so odvisni od talnih lastnosti.

Na premeščanje kovin iz trdne v tekočo fazo tal vplivajo številni procesi v tleh (Rieuwerts in sod., 1998) :

- kationska izmenjava, odvisna je od gostote negativnega naboja na površini talnih koloidov in naboja kovine v talni raztopini (Evans, 1989, cit. po Rieuwerts in sod., 1998)
- specifična sorpcija je tvorba kovalentnih vezi med kovinskimi kationi in ligandi na površini (Alloway, 1995, cit. po Rieuwerts in sod., 1998)
- obarjanje; kovine lahko zapustijo talno raztopino tudi z obarjanjem z anioni, kot so fosfati, karbonati ali sulfati
- tvorjenje koordinacijskih spojin: kovinsko spojino sestavljajo centralni kovinski ion in organski ali anorganski ligandi (Hill in Holman, 1983, cit. po Rieuwerts in sod., 1998).

Dejavniki, ki vplivajo na delež kovin v tleh in talni raztopini (Rieuwerts in sod., 1998):

- pH, je glavni dejavnik in določa koncentracijo topnih in rastlinam dostopnih kovin (Brallier in sod., 1996, cit. po Rieuwerts in sod., 1998)
- topnost je večja pri nižjem pH in se zmanjšuje pri višjih pH vrednostih (Tills in Alloway, 1983, cit. po Rieuwerts in sod., 1998)
- redoks potencial, težke kovine in druge anorganske komponente tal so bolj topne v tleh nasičenih z vodo, z nizkimi vrednostmi redoks potenciala
- tekstura tal, kovine se vežejo prednostno na glino > melj > pesek
- delež glin v tleh
- delež organske snovi v tleh, načini vezave kovin na organsko snov vključujejo specifično sorpcijo, tvorbo koordinacijskih spojin in ionsko izmenjavo
- Fe in Mn oksidi in hidrosidi, lahko zmanjšajo koncentracijo kovin v talni raztopini z obarjanjem in s specifično sorpcijo
- prisotnost ostalih kationov in anionov
- mešani dejavniki.

Pb je v talni raztopini v manjšem delu prisoten v ionski obliki Pb^{2+} , mnogo pogosteje je prisoten v obliki koordinacijskih spojin $Pb(OH)^+$ in $PbCl^+$. Velik vpliv na topnost in dostopnost ima pH tal. V talni raztopini je koncentracija Pb majhna, nekoliko večja je v

kislih tleh, kjer je tudi večja dosegljivost Pb za rastline. Z apnenjem se topnost in biodostopnost Pb močno zniža (Kabata-Pendias in Pendias, 1984).

Najbolj pogosta in mobilna oblika Zn so Zn^{2+} ioni. Mobilnost Zn ionov je odvisna od pH tal. Dosegljivost Zn je večja pri manjšem pH, medtem ko glina, organska snov tal in seskvioksidi vežejo Zn v trdno fazo tal. Najbolj je mobilna v rahlo kislih mineralnih tleh. Topni Zn organski kompleksi, ki se pojavljajo v blatih komunalnih čistilnih naprav, so v tleh mobilni in rastlinam zelo dostopni (Kabata-Pendias in Pendias, 1992). Topnost in dostopnost je v negativni korelaciji z nasičenostjo tal s kalcijevimi in fosforjevimi spojinami (Kabata-Pendias in Pendias, 1992).

2.3 UGOTAVLJANJE KOLIČINE KOVIN V TLEH

Razlikujemo metode za ugotavljanje skupne (totalne) količine kovin v tleh in metode za ugotavljanje izmenljivih oblik. Metode za ugotavljanje skupne količine kovine v tleh uporabljajo močne kisline. Največkrat se v okoljskih raziskavah uporablja zlatotopka. To je mešanica klorovodikove in dušikove kisline. Ta metoda je standardizirana (SIST ISO 11466/SIST ISO 11047) in osnova za zakonodajne vrednosti težkih kovin v tleh (Uredba..., 1996). V geoloških študijah se največkrat uporablja še močnejša fluorovodikova kislina (Pirc in Šajn, 1997). S totalnimi analizami dobimo informacijo o celotni količini težkih kovin v tleh, kar pa nam ne pove, kakšen je njihov ekološki vpliv. Več informacij o biodosegljivosti kovin dobimo z merjenjem njihovih dostopnih oblik, za kar se največkrat uporabljajo različne raztopine soli, kot so amon acetat, kalcijev nitrat, magnezijev klorid. Posebna skupina metod pa so sekvenčne ekstrakcije, s katerimi ugotavljamo vezavo kovin na posamezne talne komponente (frakcionacijo kovin).

2.3.1 Metode sekvenčnih ekstraktij

Za ugotavljanje frakcionacije kovin v tleh obstajajo različne metode. Največkrat gre za zaporedje ekstraktij s kemičnimi reagenti z različnimi lastnostmi (Leštan in Grčman, 2001). Z njimi lahko ustvarimo rahlo kisle razmere, spreminjamo redoks potencial, oksidiramo organsko snov, z reagenti izločimo frakcijo težke kovine vezano v specifični obliki. Razvitih je bilo veliko metod sekvenčnih ekstraktij za ugotavljanje oblik kovin, ki se nahajajo v tleh (Tessier in sod., 1979; Miller in sod., 1986, cit. po Ross, 1994; Sposito in sod., 1982, cit. po Ross, 1994; McLaren in Crawford, 1973, cit. po Ross, 1994). Najpogosteje uporabljane metode sekvenčnih ekstraktij temeljijo na osnovi sheme, ki jo je razvil Tessier s sodelavci leta 1979 in je bila prvotno razvita za ekstrakcijo težkih kovin iz onesnaženih rečnih sedimentov (Ross, 1994). V preglednici 1 so navedene štiri najpogosteje uporabljane sheme sekvenčnih ekstraktij, talne frakcije, v katere reagenti posegajo, in pripadajoče lastnosti reagentov.

Pri uporabi sekvenčnih ekstraktij lahko nastanejo tudi določene težave. Mnogo je dejavnikov, ki lahko vplivajo na rezultate. Pri pripravi vzorcev je na primer pomemben način in čas sušenja (sušenje v peči s prisilnim prezračevanjem ali ne), čas ekstrakcije in izbrani reagent, razmerje med maso tal in volumnom ekstrakcijske raztopine (previsok delež vzorca tal s povečano pufersko kapaciteto lahko preobremeni ekstrakcijo zaradi

spremembe pH), volumen ekstrakcijske posode, metoda in intenzivnost stresanja ekstrakcijskih raztopin in ekstrakcijska temperatura (Förstner, 1992).

Glavni problem pa je, da ekstrakcijski postopki le grobo razlikujejo med različnimi oblikami kovin v tleh in se zato pojavljajo prekrivanja pri ekstrakcijah (selektivnost reagentov). Lahko se zgodi, da določen reagent, ki posega v talno komponento, vpliva tudi na razgradnjo kovinskih kompleksov. Na primer: uporaba vodikovega peroksida za ugotavljanje kovin, vezanih na organsko snov, je pokazala, da razgradnja organske snovi s tem reagentom ni čisto popolna, uporaba bolj učinkovitih reagentov za razgradnjo organske snovi pa bi povzročila tudi razpad kristalne mreže v silikatih (Tessier in sod., 1979).

Preglednica 1 : Štiri osnovne sheme sekvenčnih ekstrakcij za ugotavljanje frakcionacije TK v tleh. Številke se nanašajo na vrstni red sekvenc v ekstrakcijskih shemah (Ross, 1994)

Frakcija	Tessier in sod. (1979)	Miller in sod. (1986)	Sposito in sod. (1982)	McLaren in Crawford (1973)
TOPNA V VODI		¹ H ₂ O		
IZMENLJIVA	¹ 1M MgCl ₂	² 0,5 M Ca(NO ₃) ₂	¹ 0.5 M KNO ₃	¹ 0.05 M CaCl
TOPNA V KISLINAH		⁴ OHAc		
ADSORBIRANA		0,1M Ca(NO ₃) ₂		
ORGANSKA	⁴ 0,02 M HNO ₃	³ Pb(NO ₃) ₂	² H ₂ O	² 2,5 % HOAc
Fe IN Mn	³ 0,04 M NH ₂ OH ×	⁵ 0,1 M K ₄ P ₂ O ₇	³ 0,5 M NaOH	³ 1 M K ₄ P ₂ O ₇
OKSIDI	HCl v 25 % HOAc			
Mn OKSIDI		⁶ 0,01 M NH ₂ OH ×		
Fe OKSIDI		HCl + 0,1 M HNO ₃		
KARBONATI	² 1 M NaOAc	⁷ NH ₄ C ₂ O ₄	⁴ 0,05M Na ₂ -EDTA	⁴ NH ₄ C ₂ O ₄
OSTANEK	⁵ 2 × 70 % HNO ₃ 40% HF/ 72 % HClO ₄	⁸ HNO ₃ + HF	⁵ 4 M HNO ₃	⁵ koncentrirana HF

2.4 VEZAVA TEŽKIH KOVIN NA ORGANSKO SNOV

2.4.1 Organska snov v tleh

Organsko snov tal delimo na razgradljivo in težje razgradljivo komponento, ki jo imenujemo tudi humus. Humus sestavljajo visoko molekularne organske substance, ki so ostale po razkroju odmrla organske mase v tleh in so večinoma odporne na nadaljnje spremembe (Forth, 1978, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Humus je koloidni polimer, ki ga sestavljajo aromatski in aaminski monomeri (Leštan, 2002). Humusne snovi delimo na huminske in fulvo kisline ter humin. Razlika med fulvo in huminskimi kislinami je v molekularni masi. Fulvo kisline imajo nižjo molekularsko maso, imajo večji delež kisika in manjši ogljika in so lahko topne v primerjavi s huminskimi kislinami, ki imajo večjo molekularsko maso in jih iz raztopine odstranimo z obarjanjem s kislinami in polivalentnimi ioni (Bohn in sod., 1985, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Termin humin zajema

dolgoverižne ogljikovodike, estre, kisline in relativno polarne strukture, ki jih proizvajajo mikroorganizmi (Hayes in Clapp, 2001). Večina organskega materiala v tleh je združena z anorganskimi koloidi in adsorbirana na glinene minerale, zato govorimo o organomineralnem delu tal (Zimdahl in Skogerboe, 1997, cit. po Rieuwerts in sod., 1998).

2.4.2 Pomen organske snovi za vezavo TK v tleh

Organska snov se kopiči na površini tal in čeprav je njen delež v tleh v primerjavi z mineralnim delom majhen, ima pomembno vlogo pri vezavi težkih kovin (Zimdahl in Skogerboe, 1977, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Mehanizmi vezave težkih kovin z organsko snovjo so tvorba koordinacijskih spojin, adsorpcija in ionska izmenjava (Evans, 1989, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Aktivne komponente pri vezavi TK na org. snov so negativno nabite funkcionalne skupine (fenolne, karboksilne in amino skupine) (van Dijk, 1971, cit. po Rieuwerts in sod., 1998; Foth, 1978, cit. po Rieuwerts in sod. 1998; Elliot in sod., 1986a, cit. po Rieuwerts in sod., 1998; Eriksson, 1989, cit. po Rieuwerts in sod., 1998).

Število funkcionalnih skupin se povečuje s humifikacijo organske snovi (Foth, 1978, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Njihova ionska oblika, ki nastane po disociaciji vodikovega iona, je odvisna od pH raztopine in se povečuje z večanjem pH vrednosti. Pri višjih pH vrednostih (v bazičnem okolju) so zato organo-mineralni kompleksi bolj stabilni (Zimdahl in Skogerboe, 1977, cit. po Rieuwerts in sod., 1998). Težke kovine lahko tvorijo koordinacijske spojine s fulvo kislinami, kot tudi s trdno fazo org. snovi in z ligandi, ki pa imajo različno afiniteto za adsorpcijo na površino talnih delcev (Rieuwerts in sod., 1998).

Nekatere študije pravijo, da se kovine prednostno vežejo na fulvo kisline do določene stopnje onesnaženosti tal, ko se zapolnijo mesta za vezavo. Pri huminskih kislinah je vezava TK manj izrazita, ker imajo domnevno omejeno količino sorpcijskih mest za kovine (Boruvka in Drabek, 2004). Huminske kisline pa niso edina frakcija organske snovi, ki imajo sposobnost vezave TK. V mešanici organskega materiala netopnega v vodi, humina, je še mnogo komponent, ki imajo veliko vlogo pri vezavi kovin (Hayes in Clapp, 2001). Domneva se, da je ena izmed teh komponent glomalin, glikoprotein, ki ga domnevno proizvajajo arbuskularne mikorizne glive (Wright in Upadhyaya, 1996, cit. po Vodnik in sod., 2008; Nichols, 2003, cit. po Vodnik in sod., 2008). Prvo poročilo o ekstrakciji nenavadnega glikoproteina in njegovi povezavi z arbuskularnimi mikoriznimi glivami se je v strokovni literaturi pojavilo pred dobrim desetletjem.

2.4.3 Arbuskularne mikorizne glive in glomalin, komponenta org. snovi

Arbuskularne mikorizne glive uvrščamo po sistemu v kraljestvo *Eucarya*-Eukarionti, deblo *Eumycota*-prave glive, razred *Zygomycetes*-jarmaste glive, red *Glomales* (*Endogonales*) (Maček in Vodnik, 2005). Gliva tvori v koreninski skorji ali korteksu enega ali več rastlinskih partnerjev značilne morfološke strukture arbuskule in (ali) vezikle, po katerih so omenjene glive tudi poimenovali (Maček in Vodnik, 2005). Simbiotski odnos je za glivo obvezen, živi lahko izključno ob pomoči rastlinskega partnerja. Pri procesu fotosinteze rastline proizvajajo sladkorje, ki so za glivo praviloma edini možni energetski vir organskega ogljika. Ker so te strukture v celicah, medtem ko na površini korenin ni obsežnejših glivnih struktur, sodi arbuskularna mikoriza v endotrofni tip simbioze, tako da

jo lahko imenujemo tudi endotrofna mikoriza. Arbuskuli so drobne, drevesasto razvejane hife v celicah koreninske skorje. Tu poteka izmenjava sladkorjev in mineralov, zadnje gliva v zameno za ogljikove spojine posreduje rastlini (Maček in Vodnik, 2005). Hife so povezane tudi z delom glive, ki se nahaja v okolici korenin in ga imenujemo zunajkoreninski (ekstraradikalni) glivni micelij. Velikost micelija običajno močno preseže meje rizosfere in tako koreninam močno razširi območje sprejemanja mineralnih hranil, predvsem fosforja, ki ga v dostopni topni obliki v tleh pogosto primanjkuje (Maček in Vodnik, 2005). Mikoriza lahko zato poleg že omenjene preskrbe rastlin s hranili izboljša tudi njihovo preskrbo z vodo. Prav tako arbuskularne mikorizne glive varujejo rastlino pred vdori patogenih organizmov in negativnimi vplivi nekaterih onesnažil, npr. težkih kovin (Maček in Vodnik, 2005). Arbuskularne mikorizne glive najdemo v koreninah velike večine rastlin (mahov, praprotnic in semenk, pri več kot 80 % vseh vrst) in v skoraj vseh življenjskih prostorih na našem planetu (Maček in Vodnik, 2005).

Trenutno je glomalin v tleh definiran kot glomalinu soroden talni protein (GRSP), v kislinah topen talni protein, ki je povezan z arbuskularnimi mikoriznimi glivami (Rillig, 2004).

Glomalin je bil najden v velikih količinah v številnih tleh (Wright in Upadhyaya, 1998, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Nichols, 2003, cit. po González-Chávez in sod., 2004). Protein so dokazali z imunološkimi markerji (protitelesi, ki se vežejo na posebna mesta na njegovi molekuli) na površini hif, spor in koloniziranih korenin pri skoraj vseh znanih rodovih arbuskularnih mikoriznih gliv (*Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora* in *Entrophospora*) (Maček in Vodnik, 2005).

Glede na ekstrakcijske pogoje GRSP razlikujemo lahko izločljivo frakcijo glomalina (EEG) ter skupno frakcijo (TG) (Rillig, 2004). Količina GRSP se določa z Bradfordovim testom po ekstrakciji z avtoklaviranjem ali s testom ELISA z uporabo monoklonega protitelesa MAb32B11, ki je narejen proti zmečkanim sporam arbuskularnih mikoriznih gliv *Glomus intraradices* (Driver in sod., 2005).

2.4.3 Struktura glomalina in njegova količina v tleh

Struktura glomalina še ni dokončno definirana. Molekula je kompleks ponavljajočih se monomernih struktur, ki jih povezujejo hidrofobne interakcije (Nichols, 2003, cit. po González-Chávez in sod., 2004), ki se prilepijo na tla in na ta način stabilizirajo strukturne agregate (González-Chávez in sod., 2004). Molekula vsebuje trdno vezano železo (od 0,04 do 8,8 %) (Rillig in sod., 2001, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Nichols, 2003, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Wright in Upadhyaya, 1998, cit. po González-Chávez in sod., 2004) in ne vsebuje fenolnih komponent, kot so npr. tanini (Rillig in sod., 2001, cit. po González-Chávez in sod., 2004).

Količine glomalina, (TG), ki so jih ekstrahirali iz različnih tal po svetu, so med 2-14 mg/g v večini tal (Wright in Upadhyaya, 1998, cit. po Nichols in Wright, 2004). Velike količine glomalina so našli v neobdelanih vulkanskih tleh na Japonskem in na Havajih (19 mg/g tal in >60 mg/g tal), (Rillig in sod., 2001b, cit., po Nichols in Wright, 2004) ter v tleh hrastovega gozda na Irskem (69 mg/g tal) (Nichols in Wright, 2004).

2.4.4 Vezava težkih kovin na GRSP

Znano je, da komponente celičnih sten pri glivah, ki vsebujejo proste amino, hidroksilne, karboksilne in druge skupine, vežejo Cu^{2+} ione (Zhou, 1999, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Kappor in Virarghavan, 1995, cit. po González-Chávez in sod., 2004). Proteini predstavljajo zaradi interakcije z Cu^{2+} in drugimi kovinami eno izmed potencialno glavnih celičnih komponent pri vezavi elementov zunaj celične stene (Ross, 1994, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Gardea-Torresdey in sod., 1997, cit. po González-Chávez in sod., 2004). Znano je, da so nekatere glive sposobne vezave Cu in se jih uporablja kot komercialne biosorbante potencialno toksičnih elementov (Morley in Gadd, 1995, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Kapoor in Virarghavan, 1995, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Mullen in sod., 1992, cit. po González-Chávez in sod., 2004).

Nedavne raziskave González-Chávez in sod. (2004) so pokazale, da naj bi GRSP stabiliziral potencialno toksične elemente, zmanjševal njihovo dostopnost in tako zmanjševal toksičen vpliv na organizme, ki se nahajajo na onesnaženih območjih. GRSP sekvestrira PTE z reakcijami, ki so reverzibilne in s tvorbo močnih kompleksov. GRSP v tleh lahko sekvestrira PTE s tem, da kolonizira korenine rastlin, skozi hife arbuskularnih mikoriznih gliv ter kot odložen v tleh (González-Chávez in sod., 2004). Tudi Chern in sod. (2007), so v svoji raziskavi, v kateri so analizirali vzorce tal iz rečnih nasipov, ugotovili, da so analizirani vzorci vsebovali GRSP, ki je sekvestriral znatno količino Cd, Fe, Pb in Mn.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OPIS VZORČNEGA MESTA IN VZORČENJE TAL

V Sloveniji je eno izmed največjih žarišč onesnaženja s Pb, Zn in Cd Mežiška dolina. Koncentracije omenjenih kovin v tleh so povečane zaradi rudniške in topilniške dejavnosti, ki po ohranjenih dokumentih iz tega območja sega že v leto 1665. Manjši rudniki so bili raztreseni po vsej dolini in okolici, bogato galenitno rudo pa so topili kar tam, kjer so jo pridobivali. Od leta 1746 je največja topilnica delala v Žerjavu, in sicer tam, kjer stoji še danes. Metalurška dejavnost se je v Žerjavu dokončno osredotočila po letu 1896, zadnja topilnica zunaj Žerjava (na Poleni) pa je prenehala delovati leta 1906 (Souvent, 1994).

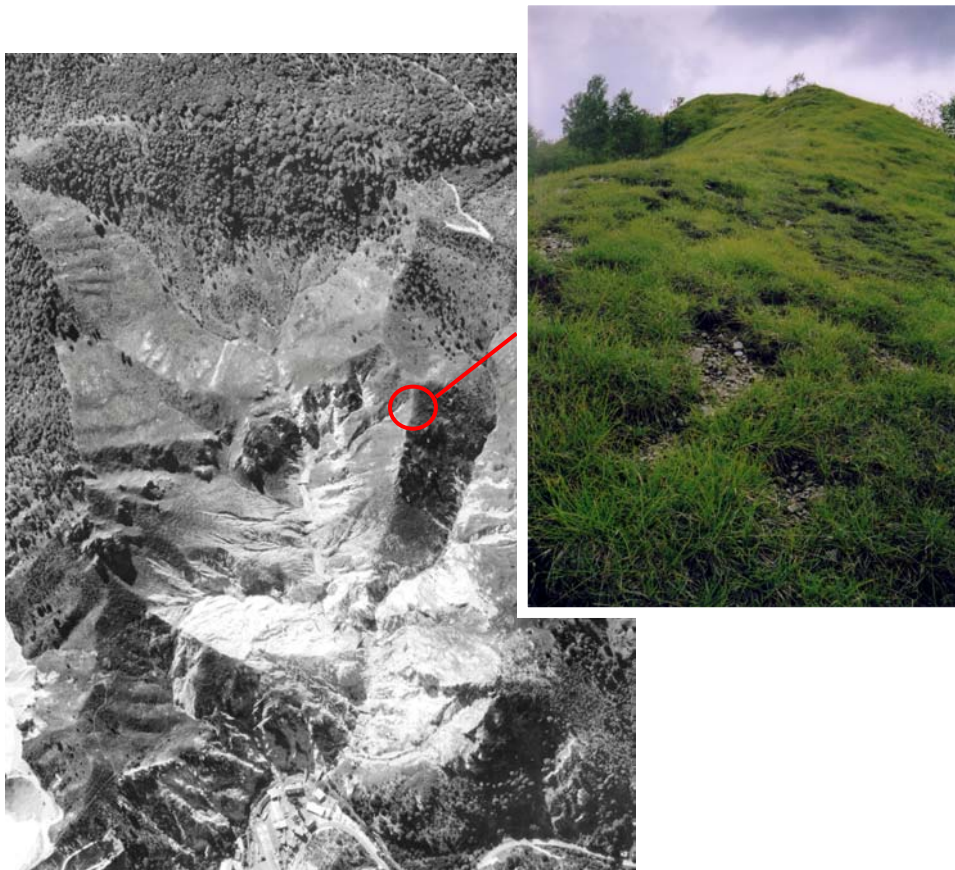
Skladno z razvojem tehnologije so v Žerjavu ves čas spreminjali tehniko in tehnologijo pridobivanja svinca in tudi razvijali načine za zmanjševanje emisij svinca in žveplovega dioksida v okolje. Kljub temu je danes območje Mežiške doline zelo onesnaženo s Pb, pa tudi s Zn in Cd. Leta 1989 so opustili predelavo svinčevih primarnih surovin in postali topilnica sekundarnih surovin (izrabljenih avtomobilskih akumulatorjev). Pri vseh metalurških procesih, pripravi surovin in ravnanju z njimi, nastane, zaradi fizikalnih in kemičnih lastnosti ter tehnologije predelave, prah. Pri praženju je do leta 1989 nastajal še žveplov dioksid (sestavina rude, goriv in reducentov). V bistveno manjših količinah se žveplov dioksid razvije tudi pri predelavi izrabljenih svinčevih akumulatorjev. Ta prah, ki lahko vsebuje tudi do 50 % svinca in drugih kovin v kovinski, sulfidni, oksidni ali sulfatni obliki in žveplov dioksid sta glavni komponenti onesnaževanja zraka in posledično tal tega območja (Souvent, 1994). Emisije SO₂ so povzročile sušenje gozdne vegetacije v okolici Žerjava, velik del pa jo je nato uničil požar. Zaradi vetrne in vodne erozije je območje postalo golo in dobilo ime Dolina smrti.



Slika 1: Mesto vzorčenja (Vodnik, 2005)

Vzorčno mesto je bilo v bližini talilnice svinca v Žerjavu. Vzorci so bili vzeti na 21-ih lokacijah vzdolž grebena nad Dolino smrti (Slika 1). Mesta vzorčenja so od dimnikov talilnice oddaljena od 100 do 250 m (nadmorska višina od 800 do 850 m). S sukcesijo organizmov se je začel ponovno nabirati talni material, predvsem organska snov. Danes so

tla plitva (do 15 cm), organska snov takoj preide v zdrobljeno dolomitno osnovo. Tla so na vseh lokacijah klasificirana kot rendzina na apnencu in dolomitu. Mesta vzorčenja so bila poraščena z rastlino *Sesleria varia* subsp. *calcaris* (Opiz) Čelak. ex Hegi (Slika 3). Vzorčenje je potekalo junija 2004. Vzorčili smo s sondo od 0 do 10 cm in zajeli mešan talni material (z organsko snovjo bogato zgornjo plast in deloma tudi dolomitno preperino).



Slika 2: Zračni posnetek Žerjava. Označena je vzorčna lokacija (Vodnik, 2005)

Slika 3: Pisana vilovina-*Sesleria varia* subsp. *calcaris* (Vodnik, 2005)

3.2 ANALITSKE METODE

Analize osnovnih talnih lastnosti vzorcev ter meritve skupne vsebnosti in frakcionacije Pb in Zn so potekale v laboratoriju Centra za pedologijo in varstvo okolja. Analize glomalina so potekale v laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo in fiziologijo rastlin. Meritev Pb in Zn na glomalinu je potekala na Kemijskem inštitutu.

Vzorci tal so bili zračno suhi, homogenizirani, zmleti v keramičnem mlinu in presejani skozi 2 mm sito. Za določanje skupne vsebnosti težkih kovin v tleh in za sekvenčno ekstrakcijo so bili 2 mm vzorci tal še naknadno zmleti z ahatnim mlinom in presejani skozi 150 μm sito.

3.2.1 Meritve osnovnih talnih lastnosti

pH tal

pH tal je bil merjen s suspenzijo 0,01 M CaCl (SIST ISO 10390).

Organska snov tal

Organska snov tal je bila determinirana po metodi Walkley-Black, ki temelji na spontani oksidaciji organske snovi v raztopini kromove in žveplove kisline (SIST ISO 14235).

Vsebnost N

Vsebnost N je bila merjena po Kjeldahlovemu postopku (SIST ISO 11261).

Vsebnost karbonatov

Vsebnost karbonatov je bila določena z merjenjem CO₂ po tretiranju tal z raztopino HCl (SIST ISO 10693).

Meritev skupne vsebnosti Pb in Zn v tleh

Skupna vsebnost Pb in Zn v talnih vzorcih je bila ugotovljena po razkroju z zlatotopko (SIST ISO 11466/ SIST ISO11047). Elementa sta bila potem merjena z metodo AAS (Perkin Elmer 1100). Kontrola analitskih postopkov je bila zagotovljena s slepimi vzorci in s standardnima referenčnima materialoma BCR 701 in MOL 10282.

3.2.2 Meritev frakcionacije Pb in Zn v tleh – metoda sekvenčnih ekstraktij

Frakcionacijo Pb in Zn enaindvajsetih talni vzorcev iz Žerjava smo ugotavljali z modificirano metodo sekvenčnih ekstraktij (Tessier in sod., 1979). To je metoda, pri kateri se s šestimi zaporednimi ekstraktijami ob uporabi različnih ekstraktijskih reagentov izloči težke kovine, vezane na posamezno talno frakcijo. Prvo frakcijo, kovin topnih v talni raztopini, pri kateri je ekstraktijska raztopina 10 ml deionizirane H₂O, smo izpustili.

Metodo smo izvajali v treh ponovitvah za vsak vzorec. Za vzorec smo uporabili 1g zračno suhih tal. V postopku smo uporabili stresanje (400 stresljajev min⁻¹) pri sobni temperaturi, 20°C. Ostanek po vsaki ekstraktiji smo od ekstraktijskih raztopin (supernatanta) ločili s centrifugiranjem (4500 rpm, 3000g, r = 16 cm). Po vsaki frakciji smo ponovili ekstraktijo še z 8 ml deionizirane vode (H₂O), ter vodni ekstrakt zavrgli. Pb in Zn v ekstraktijskih raztopinah smo izmerili z AAS. Kontrolo analitskih vzorcev smo zagotovili s slepimi vzorci in standardnim referenčnim materialom (BCR 701 in MOL 10282). Kontaminacijo vzorcev smo skozi celoten postopek preprečili s pranjem laboratorijskih posod s HNO₃ (65 %) in nato z večkratnim splakanjem z deionizirano vodo.

Preglednica 2: Pregled reagentov v postopku sekvenčnih ekstrakcij, modificirana metoda (Tessier in sod., 1979)

Frakcija težke kovine	Ekstrakcijska raztopina (reagent za 1 g zračno suhih tal)
Topna v talni raztopini (I)	10 ml deionizirane H ₂ O
Izmenljiva (II)	10 ml 1 M Mg(NO ₃) ₆ H ₂ O, 8 ml deionizirane H ₂ O
Vezana na karbonate (III)	10 ml 1 M NH ₄ OAc (pH 5), 8 ml deionizirane H ₂ O
Vezana na Fe in Mn okside (IV)	20 ml 0,1 M NH ₂ OH·HCl (pH 2), 8 ml deionizirane H ₂ O
Vezana na organsko snov (V)	3 ml 0,02 M HNO ₃ (65 %), 5 ml H ₂ O ₂ (30 %), 15 ml 1 M NH ₄ OAc v 6 % (v/v) HNO ₃ (65 %), 8 ml deionizirane H ₂ O
Preostanek (VI)	Zlatotopka: 21 ml HCl (37 %) in 7 ml HNO ₃ (65 %)

Izmenljive težke kovine

V polipropilenske 50 ml centrifugirke smo zatehtali 1 g zračno suhih tal, zmletih v ahatnem mlinu in presejanih skozi 150 µm sito. Dodali smo 10 ml 1 M raztopine Mg(NO₃)₆H₂O, stresali na stresalniku 2 uri pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 30 minut. Supernatant smo odpipetirali v polipropilenske plastenke in shranili do analize z AAS v hladilniku pri 4°C. Ostanku smo dodali 8 ml deionizirane H₂O, stresali na stresalniku 5 minut, ponovno centrifugirali 30 minut in supernatant odpipetirali ter zavrgli.

Težke kovine, vezane na karbonate

Ostanku iz prejšnje ekstrakcije smo dodali 10 ml 1 M raztopine NH₄OAc (pH 5 smo uravnali z HOAc), stresali na stresalniku 5 ur pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 30 minut. Supernatant smo odpipetirali v polipropilensko platenko in shranili v hladilniku pri 4°C do analize z AAS. Ostanku smo dodali 8 ml deionizirane H₂O, stresali 5 minut na stresalniku in centrifugirali 30 minut. Supernatant smo nato odpipetirali in zavrgli.

Težke kovine, vezane na Fe in Mn okside

Ostanku iz prejšnje ekstrakcije smo dodali 20 ml 0,1 M raztopine NH₂OH·HCl (pH 2 smo uravnali s HNO₃), stresali na stresalniku 12 ur pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 30 minut. Supernatant smo odpipetirali v polipropilenske plastenke in do analize z AAS shranili pri temperaturi 4°C. Ostanku smo dodali 8 ml deionizirane H₂O, stresali na stresalniku 5 minut, centrifugirali 30 minut in nato supernatant odpipetirali ter zavrgli.

Težke kovine, vezane na organsko snov

Ostanku iz prejšnje ekstrakcije smo dodali 3 ml 0,02 M raztopine HNO₃ (65 %) in centrifugirke namestili v vodno kopel s temperaturo 85 °C. Vzorcju smo postopoma dodajali 5 ml H₂O₂ (30 %) in segrevali 3 ure, da je ves H₂O₂ izparel. Ohlajenemu vzorcju smo dodali 15 ml 1 M NH₄OAc v 6 % (v/v) HNO₃ (65 %), stresali 30 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 30 minut. Supernatant smo odpipetirali v polipropilensko platenko in shranili do analize z AAS pri 4°C. Ostanku smo dodali 8 ml deionizirane H₂O, stresali na stresalniku 5 minut, centrifugirali 30 minut, odpipetirali supernatant in ga zavrgli.

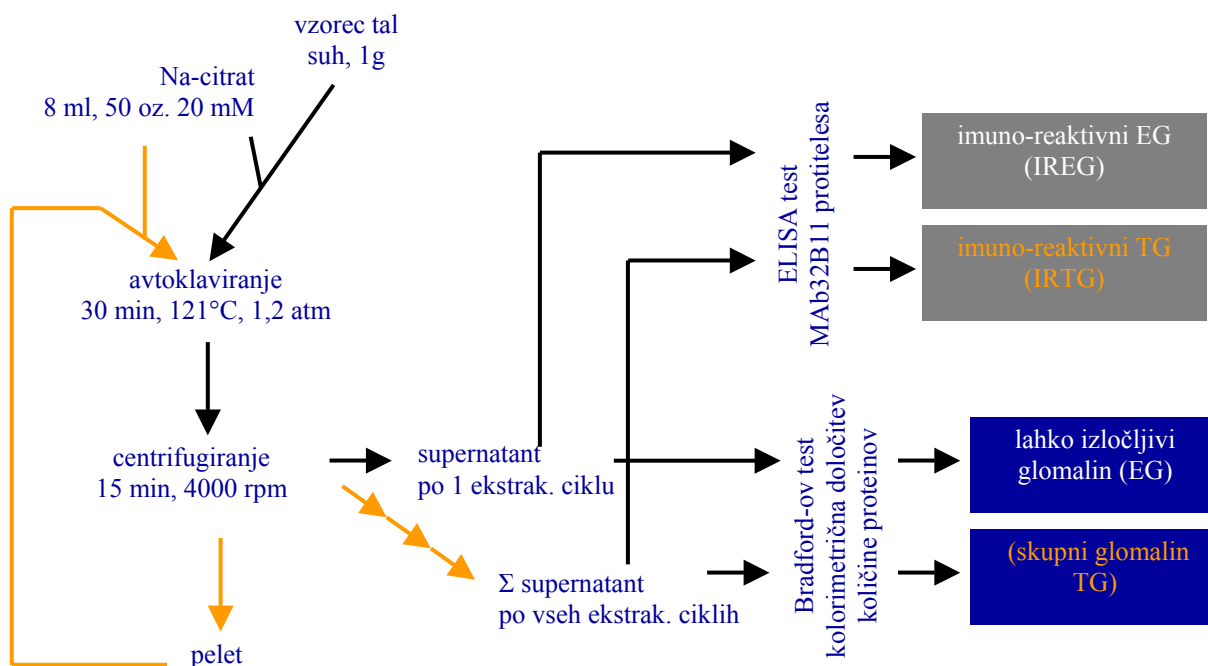
Ostanek

Ostanek iz prejšnje ekstrakcije smo kvantitativno prenesli v steklene posodice za razklop, dodali zlatotopko, to je 21 ml HCl (37 %) in 7 ml HNO₃ (65 %). Reakcijsko mešanico smo pustili stati pokrito v digestoriju vsaj 16 ur, nato pa smo jo na posebnem kuhalniku opremljenem s povratnimi hladilniki kuhali 2 uri. Ohlajeno smo filtrirali skozi filter papir v stekleno 100 ml bučko in dopolnili z deionizirano H₂O do 100 ml. Ekstrakcijsko raztopino smo prelili v polipropilensko plastenko ter jo shranili pri 4°C do analize z AAS.

3.2.3 Analiza glomalina

GRSP (glomalinu soroden talni protein), imenovan tudi Bradfordov reakcijski talni protein (Rillig, 2004), je bil ekstrahiran iz talnih vzorcev (štiri ponovitve za vsak vzorec) kot lahko izločljivi glomalin (EEG) in kot skupni glomalin (TG) (Wright in Upadhyaya, 1998, cit. po Nichols in Wright, 2004).

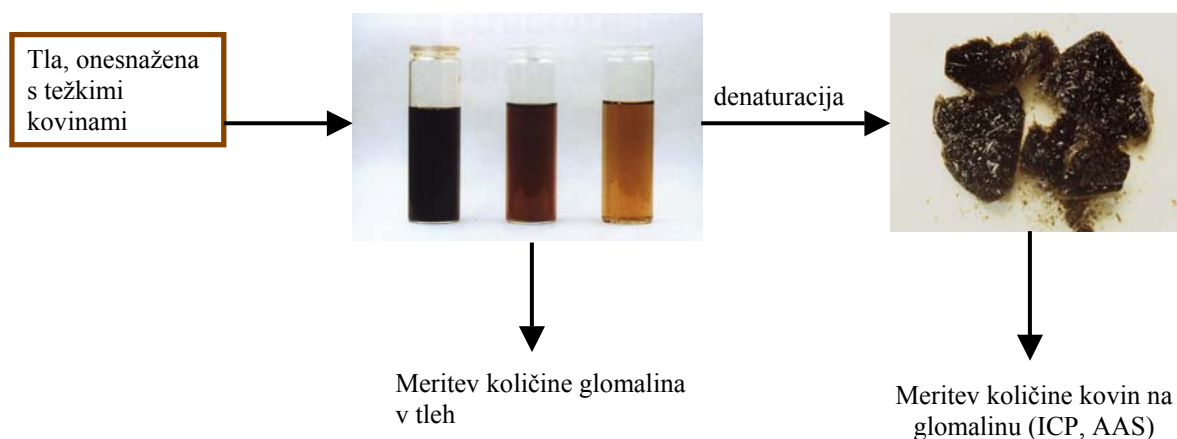
EEG je bil ekstrahiran iz 1 g zračno suhih in presejanih tal z 8 ml 20 mM citrata, pH 7,0, pri 121 °C, 30 minut. TG je bil dobljen s ponavljajočimi ekstrakcijami 1 g zračno suhih in presejanih tal z 8 ml 50 mM citratom, pH 8,0, pri 121 °C, 60 minut. Po vsakem ciklu avtoklaviranja je sledilo 20 minut centrifugiranja pri 5000 vrtljajev/min, supernatant pa smo vsakič odstranili in shranili. Cikle se je ponavljalo toliko časa, dokler ni bila vsebnost glomalina v supernatantu pod mejo detekcije (približno 2 µg/ml). Vsi ekstrakti so bili združeni, centrifugirani 10 minut pri 10000 vrtljajev/minuto in nato analizirani. Vsebnost proteina v supernatantu je bila analizirana z Bradfordovim testom (Sigma-Aldrich Inc.), kot standard je bil uporabljen protein govejega serumskega albumina.



Slika 4 : Ekstrakcija in kvantitativna analiza GRSP (Vodnik, 2005)

3.2.4 Vsebnost težkih kovin v glomalinu

GRSP je bil precipitiran iz ekstraktov s postopnim dodajanjem 3 mol L^{-1} HCl, dokler ni pH raztopine znašal 2,5. Precipitant je bil raztopljen v 100 mmol L^{-1} Na-borata, pH 9, dializiran, zamrznjen in liofibriran (González-Chávez in sod., 2004). Suh glomalin smo zatehtali ($< 50 \text{ mg}$) v posebni posodici, kamor smo dodali še 5 ml 65 % HNO_3 in 1 ml 30 % H_2O_2 . Posodico smo postavili v mikrovalovno pečico (Milestone MLS-1200 MEGA Microwave Digestion System, Shelton, Connecticut, USA). Postopek v mikrovalovni pečici je bil naslednji: 1 minuta pri 250 W, 2 minuti pri 0 W, 5 minut pri 250 W, 2 minuti pri 400 W in 10 minut pri 600 W. Po končanem postopku je bila posodica z vzorcem ohlajena na sobno temperaturo in nato razredčena z vodo do 25 ml. Za analizo Pb in Zn je bila uporabljena ICP-MS analiza, s spektrometrom Hewlett-Packard 4500 PLUS ICP-MS.



Slika 5 : Meritev količine kovin na GRSP (Vodnik, 2005)

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Rezultate meritev smo statistično analizirali z računalniškima programoma Statgraphics 4.0 in Microsoft Excel. Medsebojne povezanosti med parametri smo ugotavljali s Pearsonovim koeficientom korelacije pri 95 % intervalu zaupanja. Korelacije med talnimi lastnostmi in vsebnostjo glomalina smo prikazali z razsevnimi grafikoni in s Pearsonovim korelacijskim koeficientom r in intervalom zaupanja p . Če je p -vrednost pod 0,05 je korelacija statistično značilna pri 95 % zaupanju.

4 REZULTATI

4.1 TALNE LASTNOSTI

4.1.1 Osnovne talne lastnosti vzorcev

pH večine talnih vzorcev je nevtralen oz. rahlo bazičen, vrednosti so od 6,4 do 7,5, pH enega vzorca je rahlo kisel in je 5,65. Organska snov v tleh močno variira, najvišja vrednost je 476 mg g^{-1} tal, najnižja pa 40 mg g^{-1} tal, mediana je 164 mg g^{-1} . Najvišja vrednost pri C/N razmerju je 20,9, najnižja je 13,0, mediana je 15,1. Delež skeleta se med posameznimi vzorci tudi razlikuje, najvišja vrednost je 49,2, najnižja je 1,0, mediana je 8,8. Največja vrednost karbonatov v vzorcih je 94,8 %, najmanjša pa 6,8 %, mediana je 56,5 %.

Preglednica 3: Lastnosti talnih vzorcev

Vzorec	pH	Organska snov [mg g^{-1}]	C/N	Skelet [% w/w]	Karbonati [%]	Pb [mg kg^{-1}]	Zn [mg kg^{-1}]	Glomalin [mg g^{-1}]	
								EEG	TG
1	7,1	260	13,7	6,4	47,2	2861	485	3,20	30,51
2	7,1	322	16,9	3,2	33,4	5522	940	1,99	41,12
3	7,1	202	13,8	2,1	53,0	5493	1154	4,62	21,53
4	7,0	216	13,0	4,2	56,5	6510	839	2,64	29,92
5	7,1	150	13,2	1,6	16,4	2511	877	3,74	28,02
6	6,4	476	15,3	1,0	6,8	18399	1238	1,97	67,14
7	7,3	164	13,6	9,3	64,6	4743	500	3,37	34,69
8	7,1	183	15,1	7,7	59,3	2817	319	2,39	32,84
9	7,3	142,5	15,6	4,4	62,5	3772	401	3,29	19,51
10	7	187	15,2	13,1	63,9	7328	742	2,56	24,15
11	7,1	164	17,6	6,2	73,4	3543	589	2,95	23,43
12	7,1	288	14,6	3,3	39,5	5175	694	1,18	43,64
13	6,8	47	20,9	21,3	88,8	4246	459	2,28	6,51
14	6,6	103	17,0	18,6	83,7	15817	803	4,55	8,78
15	6,4	165	18,0	14,3	65,2	9873	603	3,39	2,92
16	5,7	297,5	14,7	3,3	43,9	16725	1446	3,22	38,31
17	7	43	17,8	49,2	94,8	2255	240	3,53	5,98
18	6,9	61	19,0	33,0	86,4	2241	340	4,72	3,32
19	7,4	54,5	13,1	26,7	33,7	270	62	2,52	4,08
20	7,3	143	15,0	8,8	35,6	4479	650	4,30	11,24
21	7,5	40,5	13,8	33,3	40,3	337	67	2,23	7,74
Max	7,5	476	20,9	49,2	94,8	18399	1446	4,72	67,14
Min	5,7	40,5	13,0	1,0	6,8	270	62	1,18	3,32
Mediana	7,1	164	15,1	8,8	56,5	4479	603	3,20	23,43

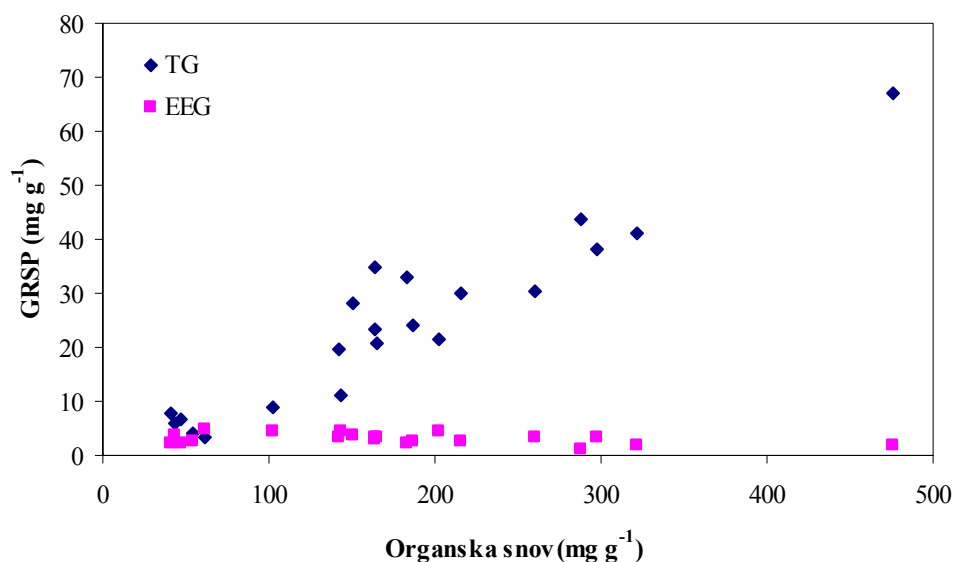
4.1.2 Skupna vsebnost Pb in Zn

Vrednosti skupnega Pb v tleh so od 270 do 18399 mg kg⁻¹, mediana je 4479 mg kg⁻¹. Zn v tleh rangira od 62 do 1446 mg kg⁻¹, mediana je 603 mg kg⁻¹.

4.1.3 Vsebnost glomalina

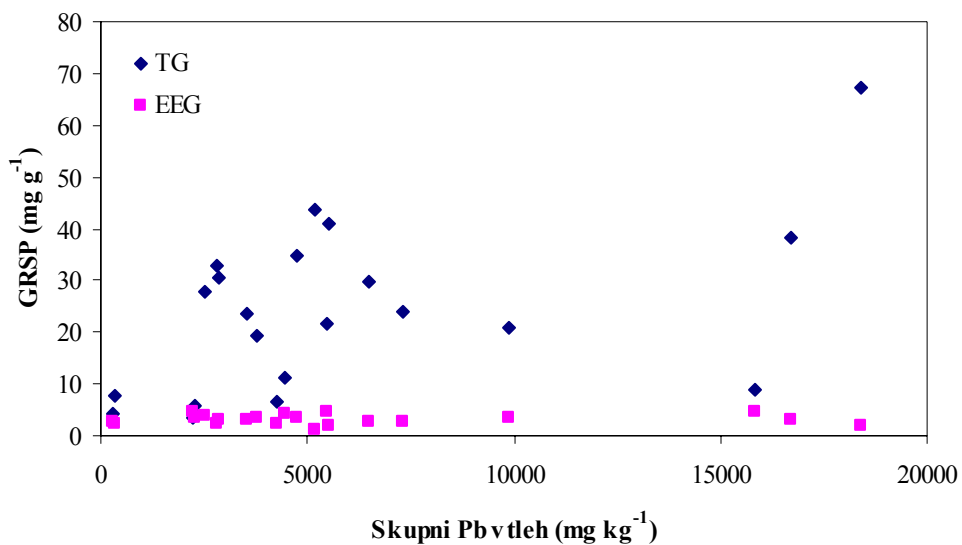
Vrednosti totalnega glomalina (TG) so v vzorcih variirale od 3,3 do 67,1 mg g⁻¹ tal, mediana je 23,4 mg g⁻¹ tal. Lahko ekstrahirane glomalina (EEG) je bilo v vzorcih od 1,18 do 4,72 mg g⁻¹ tal, mediana je 3,20 mg g⁻¹ tal.

4.1.4 Vpliv talnih lastnosti na vsebnost glomalina v tleh



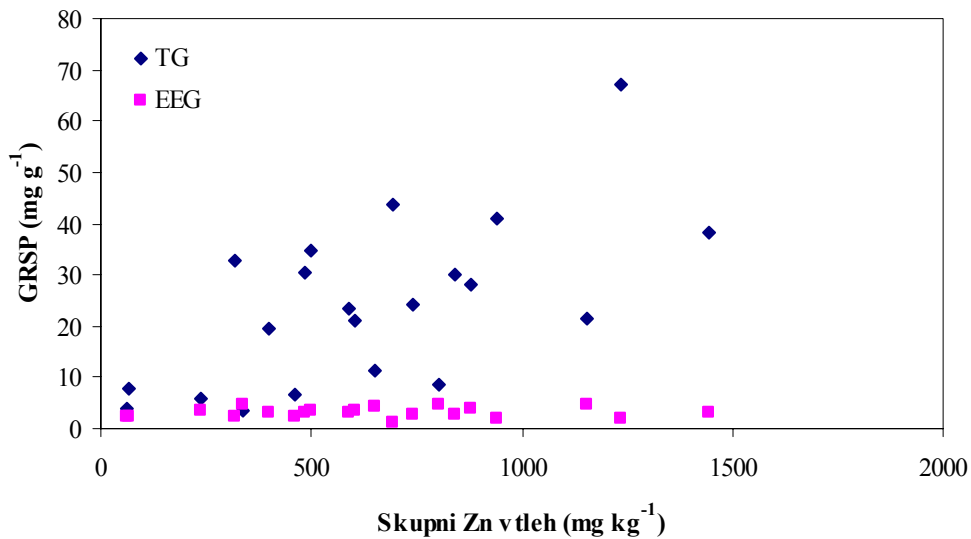
Slika 6: Povezava med organsko snovjo v tleh (mg kg⁻¹) in GRSP (mg g⁻¹)

Ugotovili smo, da obstaja korelacija med organsko snovjo v tleh in TG ($r = 0,9497$, $p = 0,0000$), med organsko snovjo v tleh in EEG korelacije ni.



Slika 7: Povezava med skupnim Pb (mg kg^{-1}) v tleh in količino GRSP (mg g^{-1})

Ugotovili smo, da obstaja korelacija med skupnim Pb v tleh in TG ($r = 0,5110$, $p = 0,0179$), med skupnim Pb v tleh in EEG korelacije ni.



Slika 8: Povezava med skupnim Zn (mg kg^{-1}) in GRSP (mg g^{-1}) v tleh

Ugotovili smo, da obstaja korelacija med skupnim Zn v tleh in TG ($r = 0,6406$, $p = 0,0018$), med skupnim Zn v tleh in EEG korelacije ni.

4.2 FRAKCIONACIJA SVINCA IN CINKA

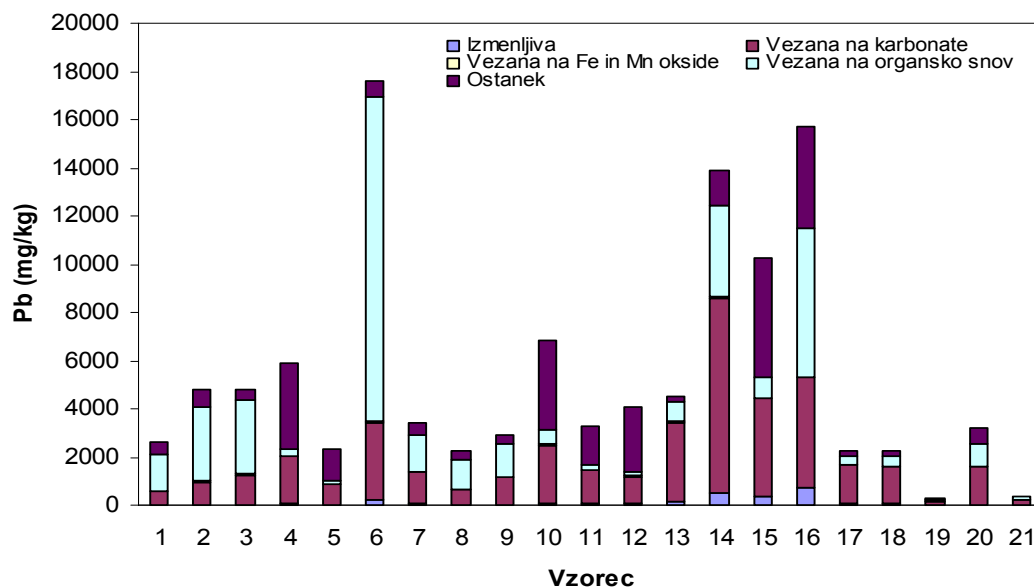
Z metodo modificirane sekvenčne ekstrakcije po Tessierju smo ugotovili porazdelitev svinca in cinka po posameznih talnih frakcijah. Rezultati frakcionacije svinca in cinka so prikazani v preglednicah, ki se nahajajo v Prilogi (Priloga A in B). Standardne odklone smo izračunali za tri ponovitve za posamezen talni vzorec.

4.2.1 Frakcionacija Pb

Ugotovili smo, da je v prvi frakciji, ki predstavlja deleže svinca, ki je topen v talni raztopini in izmenljivo vezan, vezana manjša količina Pb (0-4,5 %). Delež svinca vezanega na Fe in Mn okside je še manjši (do 0,4 %). Največ Pb je bilo vezanega na organsko snov (4,4-76 %), na karbonate (18,1-73,0 %) ali pa se je izločil v zadnji frakciji kot preostali Pb (3,8-65,5 %).

Preglednica 4 : Delež svinca v posameznih frakcijah (%)

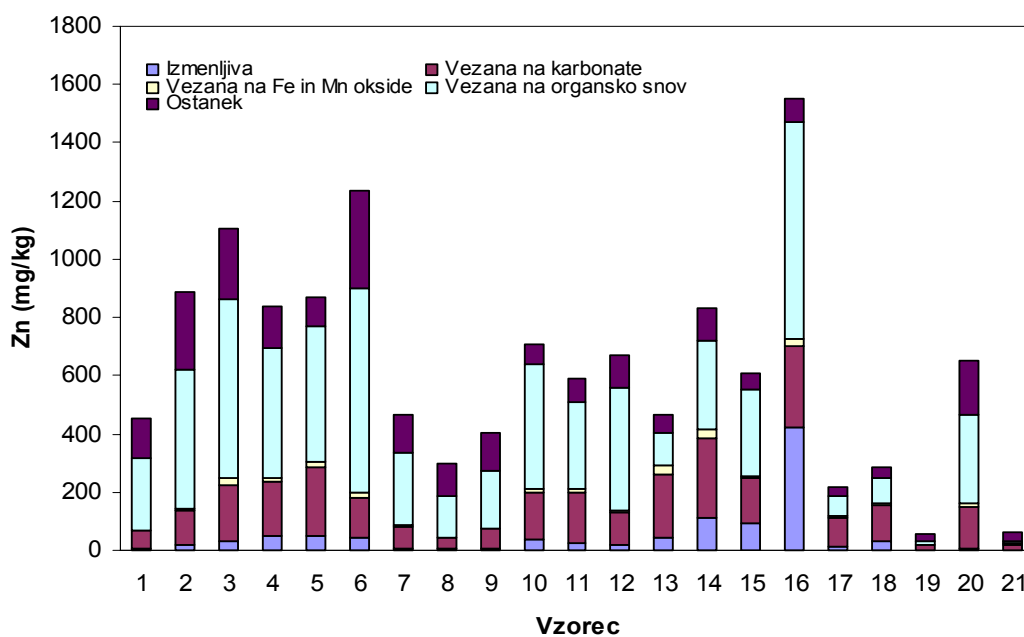
Vzorec	Delež Pb (%)				
	Topen v talni raztopini + izmenljivi	Vezan na karbonate	Vezan na Fe, Mn okside	Vezan na organsko snov	Preostali Pb
1	0,7	21	0,2	60,9	17,2
2	0,6	19,8	0,2	64,6	14,8
3	0,7	25,4	0,2	63,4	10,3
4	1,4	33,5	0,4	4,4	60,3
5	1,1	36,3	0,4	6,2	56,0
6	1,2	18,1	0,4	76,4	3,9
7	1,2	37,8	0,3	45,6	15,1
8	0,8	28,9	0,2	54,0	16,1
9	1,0	40,3	0,2	47,1	11,4
10	1,5	35,1	0,3	8,8	54,3
11	1,5	42,7	0,2	7,0	48,6
12	1,3	28,0	0,3	4,9	65,5
13	3,7	73,0	0,3	19,2	3,8
14	3,7	58,3	0,4	27,0	10,6
15	3,6	39,7	0,4	8,3	48,0
16	4,5	29,2	0,3	39,0	27,0
17	2,7	71,9	0,2	15,2	10,0
18	3,3	67,9	0,2	18,2	10,4
19	0	56,1	0	32,3	11,6
20	1,0	50,0	0,3	28,0	20,7
21	0	62,7	0	28,2	9,1
Max	4,5	73	0,4	76,4	65,5
Min	0	18,1	0	4,4	3,8
Mediana	1,2	37,8	0,3	28	15,1



Slika 9: Frakcionacija Pb (mg kg^{-1})

4.2.2 Frakcionacija cinka

V prvi frakciji smo našli od manj kot 0,5 % do 27,4 % cinka. Delež cinka vezanega na karbonate je od 10,7-48,2 %, delež cinka vezan na Fe in Mn okside je od 0-5,6 %, na organski snovi ga je vezanega od 19,7-62,4 %, v preostali frakciji je od 5,2-45,4 % cinka.



Slika 10: Frakcionacija Zn (mg kg^{-1})

Preglednica 5 : Delež cinka v posameznih frakcijah (%)

Vzorec	Delež Zn (%)				
	Topen v talni raztopini + izmenljivi	Vezen na karbonate	Vezen na Fe, Mn okside	Vezen na organsko snov	Preostali Zn
1	1,5	13,1	0,9	54,5	30,0
2	2,0	13,1	1,1	54,1	29,7
3	2,9	17,6	1,8	56,1	21,6
4	5,9	22,1	2,1	52,8	17,1
5	5,5	27,2	2,4	53,8	11,1
6	3,7	10,7	1,7	56,9	27,0
7	1,8	15,3	1,1	54,1	27,7
8	1,2	12,5	0,8	47,5	38,0
9	1,6	16,4	1,1	49,2	31,7
10	4,9	23,4	1,9	60,1	9,7
11	4,4	29,1	2,0	50,3	14,2
12	2,5	17,0	1,1	62,4	17,0
13	8,7	48,2	5,6	24,3	13,2
14	13,7	32,5	4,2	36,4	13,2
15	15,3	25,1	1,8	48,6	9,2
16	27,4	17,7	1,7	48,0	5,2
17	4,9	47,9	2,1	31,4	13,7
18	10,5	43,4	2,7	29,7	13,7
19	0	32,7	1,1	20,8	45,4
20	1,3	21,3	2,0	46,7	28,7
21	0	35,1	1,4	19,8	43,7
Max	27,4	48,2	5,6	62,4	45,4
Min	0	10,7	0,8	19,8	5,2
Mediana	3,7	22,1	1,8	49,2	17,1

4.2.3 Primerjava rezultatov frakcionacije Pb in Zn s skupno količino Pb in Zn v vzorcih

Uspešnost in točnost postopka sekvenčnih ekstrakcij kaže tudi primerjava med vsoto koncentracij kovine v posameznih frakcijah in skupno količino kovine v vzorcu, izmerjeno z neodvisno metodo, kar lahko poimenujemo izkoristek frakcionacije in ga izražamo v odstotkih. Prikazan je v zadnji koloni preglednic, ki so v Prilogi (Priloga A in B). Izkoristki za Pb variirajo od 71,3 do 111,6 %, povprečni izkoristek je dober in znaša 91 %, pri Zn izkoristki variirajo od 83,7 do 107,2 %, povprečni končni izkoristek je za cink še boljši in znaša 96,7 %.

Uporabljena metoda sekvenčnih ekstrakcij ni standardizirana, zato ni na voljo komercialnega referenčnega materiala. Točnost meritev smo zasledovali z analizo internega referenčnega vzorca CPVO MOL 10282 pri dveh serijah sekvenčnih ekstrakcij. Rezultati internega referenčnega vzorca (MOL 10282) za Pb in Zn so zbrani v Preglednici 6. Za Pb podajamo poleg naših meritev (1 in 2) tudi vrednosti treh meritev iz predhodnih analiz (3, 4, 5). Za Zn nismo imeli predhodnih meritev. Za Standardizirano štiristopenjsko BCR ekstrakcijo obstaja komercialni referenčni material BCR 701. Zaradi primerjav med sekvenčnimi shemami smo ga vključili kot referenčni material pri drugih dveh serijah

analiz. V Preglednici 7 podajamo vrednosti za Pb; poleg naših meritev (1 in 2) tudi vrednosti štirih meritev iz predhodnih analiz (3, 4, 5, 6). Za Zn nismo imeli predhodnih meritev.

Preglednica 6: Vsebnost Pb in Zn v internem referenčnem vzorcu z oznako MOL 10282

Pb	I (mg/kg)	II (mg/kg)	III (mg/kg)	IV (mg/kg)	V (mg/kg)	VI (mg/kg)	Vsota sekv. (mg/kg)	Skupni Pb (mg/kg)	Izkoristek %
Meritev 1	<2	<2	5	<0,200	63,6	24	92,6	90,24	102,6
Meritev 2	<2	<2	6,7	0	68,85	23	98,6	90,24	109,2
Meritev 3	<2	<2	6,3	<4	65,1	20,0	91,4	101,3	90,2
Meritev 4	<2	<2	6,5	<4	61,5	21,0	89,0	104,7	85,0
Meritev 5	<2	<2	6,5	<4	51,9	20,0	78,4	90,24	86,9
Zn	I (mg/kg)	II (mg/kg)	III (mg/kg)	IV (mg/kg)	V (mg/kg)	VI (mg/kg)	Vsota sekv. (mg/kg)	Skupni Zn (mg/kg)	Izkoristek %
Meritev 1		0	7,53	1,42	33,0	107,2	149,2	151,5	98,4
Meritev 2		0	8,39	1,42	34,1	124,5	168,4	152,2	110,6

Preglednica 7: Vsebnost Pb in Zn v Referenčnem vzorcu BCR 701

Pb	I (mg/kg)	II (mg/kg)	III (mg/kg)	IV (mg/kg)	V (mg/kg)	VI (mg/kg)	Vsota sekv. (mg/kg)	Skupni Pb (mg/kg)	Izkoristek %
Meritev 1	<2	<2	24,6	<4	103,5	<2	128,1	137,5	93,2
Meritev 2	<2	<2	19,2	<4	104,4	22	145,6	137,5	105,9
Meritev 3	<2	<2	18,3	<4	102,7	22,0	143,0	137,5	104,0
Meritev 4	<2	<2	21,6	<4	98,5	26,0	146,1	137,5	106,2
Meritev 5	<2	<2	18,1	<4	103,1	26,0	147,2	137,5	107,5
Meritev 6	<2	<2	19,8	<4	99,8	19,2	138,8	137,5	100,9
Zn	I (mg/kg)	II (mg/kg)	III (mg/kg)	IV (mg/kg)	V (mg/kg)	VI (mg/kg)	Vsota sekv. (mg/kg)	Skupni Zn (mg/kg)	Izkoristek %
Meritev 1		7,17	137,8	65	96,6	170,5	477,1	471,2	101,2
Meritev 2		7,72	129,2	64,8	99,0	152,5	453,2	471,2	96,2

Kot kažejo rezultati v preglednicah 6 in 7 je ponovljivost meritev Pb v frakcijah dobra tako znotraj naših meritev (meritev 1 in meritev 2) kot znotraj vseh meritev (vključno z meritvami 3, 4 in 5), za interni referenčni material MOL 10282 in komercialni referenčni material BCR 701. Tudi ponovljivost meritev za Zn je znotraj naših analiz dobra.

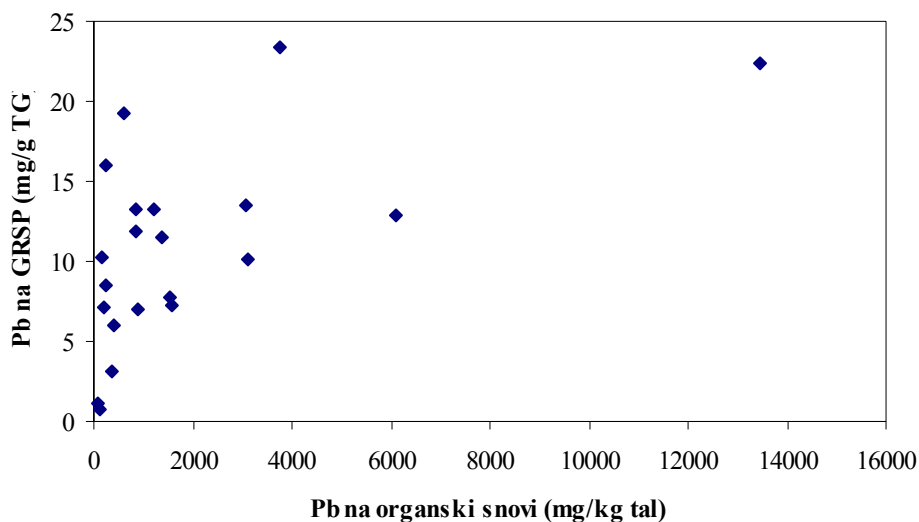
4.3 SEKVESTRACIJA Pb IN Zn NA GLOMALINU

V enaindvajsetih vzorcih tal variirajo vrednosti svinca vezanega na glomalinu soroden talni protein (GRSP) od 0,69 do 23,4 mg g⁻¹ GRSP, kar predstavlja od 0,8-15,5 % (mediana 5,3 %) od skupnega svinca v tleh. Vrednosti za cink vezan na GRSP pa se gibljejo med 0,42 in 3,71 mg g⁻¹ GRSP in predstavljajo od 1,1 do 20,5 % (mediana 5,3 %) od skupnega cinka v vzorcih.

Preglednica 8: Sekvestracija svinca in cinka na GRSP (mg g⁻¹). Podajamo količino vezane kovine na utežno enoto GRSP (A), količino kovine, ki je vezana na GRSP na utežno enoto tal (B) in delež kovine, ki je vezana na GRSP v talni enoti od skupne količine kovine na talno enoto (C).

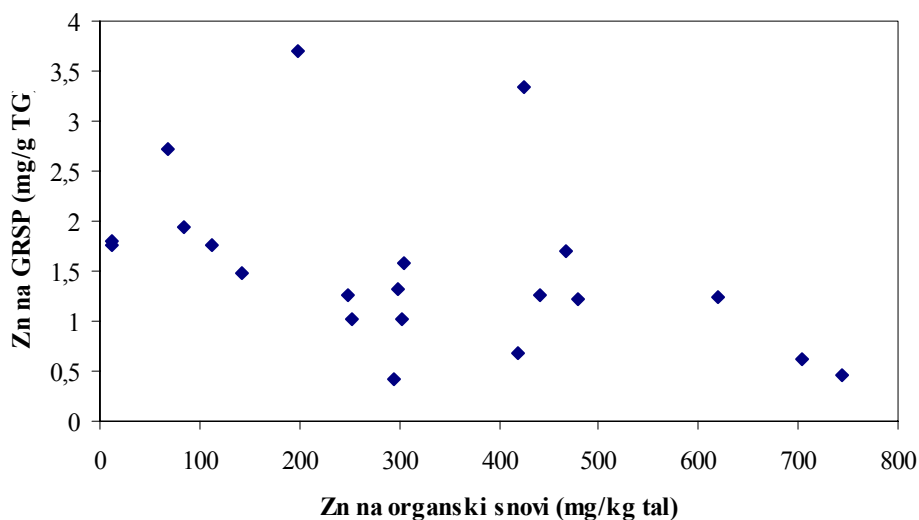
Vzorec	Pb in Zn vezana na GRSP					
	Pb			Zn		
	A	B	C	A	B	C
	mg g ⁻¹ GRSP	mg g ⁻¹ tal	% od celokupnega Pb v tleh	mg g ⁻¹ GRSP	mg g ⁻¹ tal	% od celokupnega Zn v tleh
1	7,78	0,238	8,30	1,26	0,038	7,92
2	10,13	0,417	7,58	1,23	0,051	5,38
3	13,54	0,291	5,30	1,25	0,027	2,34
4	16,05	0,480	7,38	1,26	0,038	4,50
5	10,26	0,287	11,45	1,70	0,047	5,42
6	22,37	1,502	8,16	0,63	0,043	3,44
7	7,30	0,253	5,34	1,03	0,036	7,12
8	13,30	0,437	15,50	1,48	0,049	15,21
9	11,48	0,224	5,94	3,71	0,072	18,03
10	19,27	0,465	6,35	3,34	0,081	10,88
11	8,55	0,200	5,65	1,33	0,031	5,31
12	7,11	0,310	6,00	0,68	0,030	4,28
13	13,23	0,086	2,03	1,77	0,012	2,52
14	23,37	0,205	1,03	1,03	0,009	1,12
15	11,84	0,248	2,51	0,42	0,009	1,45
16	12,82	0,491	2,94	0,47	0,018	1,23
17	3,10	0,019	0,82	2,72	0,016	6,79
18	5,96	0,020	0,88	1,94	0,006	1,90
19	1,18	0,005	1,78	1,81	0,007	11,94
20	7,02	0,079	1,76	1,59	0,018	2,75
21	0,69	0,005	1,58	1,77	0,014	20,51
Max	23,37	1,502	15,50	3,71	0,081	20,51
Min	0,69	0,005	0,82	0,42	0,006	1,12
Mediana	10,26	0,248	5,34	1,33	0,030	5,31

4.3.1 Primerjava med frakcionacijo Pb in Zn na GRSP in organsko snovjo, ter deležem Pb in Zn na GRSP od Pb in Zn na organski frakciji



Slika 11: Povezava med Pb na GRSP (mg/g TG) in Pb na organski snovi (mg/kg tal)

Ugotovili smo, da obstaja korelacija med Pb na GRSP in Pb na organski snovi ($r = 0,5740$, $p = 0.0065$).



Slika 12: Povezava med Zn na GRSP (mg/g TG) in Zn na organski snovi (mg/kg tal)

Ugotovili smo, da Zn na GRSP in Zn na organski snovi nista v korelaciji

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Talne lastnosti

Vrednosti osnovnih talnih lastnosti posameznih vzorcev se med sabo precej razlikujejo, predvsem delež organske snovi (od 4,1 do 47,6 %) in skeleta (od 1,0 do 49,2 %) ter posledično delež karbonatov (od 6,8 do 94,8 %). Visoka vsebnost organske snovi je posledica vegetacije (travne ruše) in počasnejše razgradnje organske snovi bodisi zaradi višje nadmorske višine ali drugih okoljskih dejavnikov, ki zavirajo mikrobiološko aktivnost. Visoke vrednosti C/N razmerja nakazujejo na počasno razgradnjo organskih ostankov in na to, da v tleh prevladuje srednje humificiran (moder) humus. Vzrok za variabilnost v deležih organske snovi, skeleta in karbonatov pa je v različno globokih tleh. Tla, ki so klasificirana kot rendzina na apnencu in dolomitu, imajo razvit različno globok zgornji humusno akumulativni A horizont, ki takoj prehaja v matično podlago. Zgornji horizont lahko vsebuje tudi več kot 35 % organske snovi in ga imenujemo organski (O). Na območjih, ki so bolj izpostavljena vetrni in vodni eroziji, razvijejo rendzine plitvejši humusno akumulativni horizont, v predelih, ki so pred erozijo zaščiteni, se razvije globji humusno akumulativni horizont. Pri vzorčenju tal po naprej določenih globinah, kot je bilo to v naši raziskavi (0-10 cm), zajamemo pri globjih tleh samo humusno akumulativni horizont, pri plitvejših tleh pa tudi večji ali manjši delež dolomitnega drobirja (C horizonta). Dolomitni drobir povzroči razredčitveni efekt v količini organske snovi in poveča delež skeleta in delež karbonatov. Variabilnost v količini karbonatov spremljajo tudi razlike v pH talne raztopine. pH talne raztopine večine vzorcev je v nevtralnem območju (od 6,4 do 7,5), pH enega vzorca je rahlo kisel (5,7).

Vsebnost glomalina v tleh

Analize vsebnosti glomalina v tleh so pokazale, da je v tleh od 3,3 do 67,1 mg g⁻¹ skupnega glomalina (TG) in od 1,18 do 4,72 mg g⁻¹ lahko izločljivega glomalina (EEG). Ugotovili smo, da je količina TG v tleh v močni korelaciji s količino organske snovi v tleh, torej je v tistih vzorcih tal, ki so bogata z organsko snovjo, tudi količina TG večja. Delež skupnega glomalina glede na vsebnost organske snovi je od 5,4 do 21,2 % (Preglednica 9). To potrjuje dejstvo, da je GRSP del organske snovi v tleh in je ena izmed v vodi netopnih komponent humina (Hayes in Clapp, 2001). Zanimivo je, da nismo ugotovili statistično značilne korelacije med EEG in organsko snovjo v tleh. Ugotovimo lahko, da so naše analize vsebnosti TG v tleh primerljive s količinami TG, ki so jih z ekstrakcijo ugotovili v drugih študijah različnih tal po svetu. V večini primerov je bila količina TG med 2 in 14 mg g⁻¹ tal (Wright in Upadhyaya, 1998, cit. po Nichols in Wright, 2004), v nekaterih neobdelanih tleh pa lahko presega 60 mg g⁻¹ tal (Rillig in sod., 2001b, cit. po Nichols in Wright, 2004). Za takšne količine GRSP v tleh je lahko več razlogov. GRSP naj bi bil v tleh zelo obstojen in glede na raziskave, ki temeljijo na izotopskih razmerjih C, naj bi GRSP potreboval od nekaj let do nekaj desetletij za svoj razkroj (Rillig in sod., 2001a, cit. po Rillig, 2004). Ugotovljeno je bilo tudi, da je vsebnost GRSP v tleh v korelaciji s stabilnostjo talnih agregatov (Wright in sod., 1999, cit. po Hayes in Clapp, 2001; Franzluebbbers in sod., 2000, cit. po Hayes in Clapp, 2001; Wright in Anderson, 2000, cit.

po Hayes in Clapp, 2001; Rillig in sod., 2001b, cit. po Hayes in Clapp, 2001), kar pomeni, da se GRSP adsorbira na površino talnih delcev in je tako lahko odporen na razkroj (Hayes in Clapp, 2001). Eden od razlogov bi bil lahko, kot so ugotovili Driver in sod. (2005), da je večina GRSP vezana v hifah arbuskularnih mikoriznih gliv in da naj bi ga glive izločale v tla le v manjših količinah. Torej naj bi večina GRSP prispela v tla po razkroju hif gliv (Steinberg in Rillig, 2003, cit. po Driver in sod., 2005). Driver in sod., 2005 so ugotovili, da so za razkroj hif in ekstrakcijo glomalina v laboratoriju potrebni agresivni postopki ter da so za to v naravi odgovorni mikroorganizmi. Trdoživost GRSP v tleh nakazujejo tudi pogoji ekstrakcije, ki smo jih uporabili v naših raziskavah, saj moramo tla tretirati z močnimi kislinami in avtoklavirati, da ga izločimo iz tal. GRSP proizvajajo vse arbuskularne mikorizne glive, ki so jih raziskovali do sedaj (Wright in sod., 1996, 1998, cit. po González-Chávez in sod., 2004; Nichols, 2003, cit. po González-Chávez in sod., 2004), zato prisotnost GRSP v tleh kaže na to, da je v tleh prisotna arbuskularna mikoriza, kar so potrdili tudi pegledi kolonizacije korenin (Vodnik, 2007). O prisotnosti arbuskularne mikorize na istem rastišču poročajo tudi Vogel-Mikuš in sod. (2006).

Naše raziskave so pokazale pozitivno korelacijo med količino GRSP in koncentracijami skupnega Pb in Zn v tleh. Vzrok bi bil lahko v tem, da je na analiziranem območju zaradi visokih vsebnosti Pb in Zn prisotnih zelo malo mikroorganizmov, ki bi bili lahko odgovorni za razgradnjo GRSP. Med EEG in skupnim Pb v tleh in med EEG in skupnim Zn v tleh, korelacije nismo našli.

Skupna vsebnost in frakcionacija Pb in Zn

Talni vzorci so bili v glavnem onesnaženi s Pb. Vrednosti skupnega Pb v tleh so od 270 do 18399 mg kg⁻¹. Po Slovenski zakonodaji o kritičnih vrednosti, ki znašajo za Pb 530 mg kg⁻¹, jih kar devetnajst od enaindvajsetih presega to vrednost. Zn v tleh rangira od 62 do 1446 mg kg⁻¹, osem vzorcev tako presega kritično mejo, ki je za Zn 720 mg kg⁻¹ (Uredba..., 1996).

Rezultati sekvenčne ekstrakcije so pokazali, da je delež Pb v tleh v prvi frakciji, ki predstavlja rastlinam dosegljiv, torej vodotopen in izmenljivo vezan Pb, majhen (od 0-4,5%), delež svinca vezanega na Fe in Mn okside je še manjši (do 0,4 %). Največ Pb je bilo vezanega na organsko snov (4,4-76 %) in karbonate (18,1-73,0 %) ali pa se je izločil v zadnji frakciji kot preostali Pb (3,8-65,5 %). Pri frakcionaciji Zn je bilo v primerjavi s Pb v prvi frakciji vezanega več Zn (od manj kot 0,5 % do 27,4 %) kot Pb. Posledično je bil tako delež Zn vezanega na karbonate od 10,7-48,2 %. Najmanjši delež Zn (do 5,6 %) je bil prav tako kot pri svincu vezan na Fe in Mn okside. Največ Zn je bilo vezanega na organsko snov (19,7-62,4 %) in v preostali frakciji (5,2-45,4 %). Večinski delež Pb in Zn v tleh je bil torej vezan tako, da je rastlinam nedostopen. Podobno frakcionacijo svinca in cinka za Mežiško dolino sta opisala tudi Leštan in Grčman (2001).

Vezava Pb in Zn na GRSP in primerjava s frakcionacijo na organsko snov

Vzorci tal se razlikujejo po količini Pb vezanega na GRSP. Vrednosti so od 0,69 do 23,4 mg g⁻¹ GRSP in predstavljajo od 0,8 do 15,5 % od skupnega Pb v tleh. Na GRSP je bilo v vzorcih tal vezanega od 0,42 do 3,71 mg g⁻¹ Zn, ki predstavlja od 1,1 do 20,5 % od

skupnega Zn v vzorcih. Naše rezultate smo primerjali s količinami Pb in Zn vezanega na GRSP, ki so jih izmerili v svojih raziskavah González-Chávez in sod. (2004). Analizirali so količino kovin, vezanih na GRSP v dveh različno onesnaženih tleh. V prvih tleh, ki so vsebovala 1487 mg kg^{-1} Pb in Zn v sledovih, so izmerili $0,62 \text{ mg g}^{-1}$ GRSP vezanega Pb ter $1,57 \text{ mg g}^{-1}$ GRSP Zn. V drugih tleh, ki so vsebovala 1250 mg kg^{-1} Pb in 963 mg kg^{-1} Zn, so izmerili, da je bilo na GRSP vezanega $1,12 \text{ mg g}^{-1}$ Pb ter $1,70 \text{ mg g}^{-1}$ Zn. Tako smo ugotovili, da so njihove količine Pb vezanega na GRSP precej manjše, količine Zn vezanega na GRSP so bolj primerljive z našimi meritvami.

Ugotovili smo, da med Pb, vezanim na GRSP, in Pb, vezanim na organski snovi tal, obstaja pozitivna korelacija ($r = 0,574$, $p = 0,0065$), medtem ko med Zn, vezanim na GRSP, in Zn vezanim na organski snovi, korelacije ni. To potrjuje splošno večjo afiniteto organske snovi za vezavo Pb (Adriano, 2001, cit. po Boruvka in Drabek, 2004). Ker so sorpcijska mesta na organski snovi lahko zelo specifična (Adriano, 2001, cit. po Boruvka in Drabek, 2004; Heredia in sod., 2002, cit. po Boruvka in Drabek, 2004), so vzroki za to možni zaradi načina vezave, Angehrn-Bettinazzi in sod. (1989, cit. po Boruvka in Drabek, 2004) poročajo o veliki zmožnosti Pb za tvorbo kompleksov z netopnimi huminskimi substancami, Cd in Zn pa tvorita komplekse z mobilnimi huminskimi substancami, ki imajo nizko molekulsko maso.

Primerjava deležev Pb in Zn, vezanih na GRSP, z deleži Pb in Zn, vezanih na organsko snov, kaže, da je v povprečju 43 % Pb in 20 % Zn, ki sta vezana na organski snovi, vezano na GRSP. Vendar pa smo tu naleteli na določena razhajanja. Analize so pokazale, da je bilo v nekaterih vzorcih na GRSP vezano veliko več Pb in Zn, kot je bilo Pb in Zn v celotni organski frakciji (od 54 do skoraj 100 % več za Pb in 17 % več za Zn). Vzroki za takšne rezultate so lahko v pedoloških značilnostih talnih vzorcev, ki pa verjetno ne pojasnijo vse variabilnosti. Bolj verjetna je razlaga, ki pojasnjuje vpliv postopkov analiz za ekstrakcijo GRSP iz tal na eni strani in ugotavljanja frakcionacije kovin na drugi strani. Pri ekstrakciji GRSP iz tal se uporablja močne reagente (Na–citrat), ki lahko izločijo iz tal tudi kovine, ki so vezane na druge frakcije tal (posegajo po frakcijah manj močno vezanih kovin: izmenljive, karbonatno vezane, vezane na Mn in Fe okside in organsko snov). Po ekstrakciji GRSP smo kovine na GRSP ugotavljali z ekstrakcijo z zlatotopko, ki je tako lahko zajela vse prej ekstrahirane kovine iz talnega vzorca, ki smo jih pripisali vezavi na GRSP. Pri ugotavljanju kovin vezanih na organsko snov z metodo sekvenčnih ekstraktij, že v predhodnih sekvencah izločimo manj močno vezane oblike kovin in zajamemo kot organsko vezane samo tiste, ki jih iz ostanka talnega vzorca ekstrahira amonacetat po predhodnem razkroju z H_2O_2 . To potrjuje primerjava deleža kovin vezanega na GRSP z deležem kovin vezanih na seštevek prvih štirih frakcij (Preglednica 9), ki je za Pb od 0,9 do 28,1 %, delež Zn na GRSP od količine Zn vezanega v prvih štiri frakcijah je od 0,1 do 5,8 %.

Bolj jasne dokaze o vezavi kovin na GRSP bi verjetno dala analiza količine GRSP in količine vezanih kovin na GRSP po predhodni izločitvi manj močno vezanih kovin – torej če bi ekstrakcijo GRSP začeli v ostanku talnega vzorca po prvih treh izvedenih sekvenčnih ekstraktijah. Zanimiva bi bila tudi primerjava količine kovin, ki jo ekstrahira samo Na-citrat (brez zlatotopke), s frakcionacijo kovin, ki jo daje sekvenčna shema.

Glede na rezultate naših analiz lahko trdimo, da je v tleh iz Žerjava prisoten GRSP in da v večini analiziranih vzorcev sekvestrira pomembno količino Pb in Zn. Njegova vezava s težkimi kovinami bi bila lahko zelo pomemben dejavnik pri zmanjševanju biodostopnosti težkih kovin v tleh.

Preglednica 9: Delež GRSP od organske snovi v tleh in deleži Pb in Zn na GRSP od Pb in Zn na organski snovi ter delež Pb in Zn na GRSP od Pb in Zn, ki je vezan v prvih štirih frakcijah tal

Vzorec	Delež GRSP od organske snovi	Delež Pb na GRSP od Pb na organski snovi (%)	Delež Pb na GRSP od Pb v prvih 4 frakcijah (%)	Delež Zn na GRSP od Zn na organski snovi (%)	Delež Zn na GRSP od Zn v prvih 4 frakcijah (%)
1	11,7	15,3	11,3	15,4	0,4
2	12,8	13,4	10,2	10,6	0,2
3	10,7	9,5	6,7	4,4	0,1
4	13,9	185,1	20,6	8,6	0,2
5	18,7	199,0	28,1	10,2	0,2
6	14,1	11,2	8,9	6,1	0,1
7	21,2	16,1	8,6	14,1	0,3
8	18,0	36,1	23,2	34,1	0,8
9	13,7	16,5	8,8	36,5	1,4
10	12,9	77,2	14,9	19,0	0,5
11	14,3	87,8	11,9	10,5	0,3
12	15,2	154,9	22,0	7,1	0,1
13	13,9	10,0	2,0	10,2	0,4
14	8,5	5,5	1,7	3,0	0,1
15	12,7	29,3	4,7	3,0	0,1
16	12,9	8,0	4,3	2,4	0,1
17	13,9	5,3	0,9	23,8	1,5
18	5,4	4,9	1,0	7,6	0,8
19	7,5	5,6	2,1	62,0	5,8
20	7,9	8,8	3,1	5,9	0,3
21	19,1	5,0	1,5	116,6	5,3
Max	21,2	199,0	28,1	116,6	5,8
Min	5,4	4,9	0,9	2,4	0,1
Mediana	13,7	13,4	8,6	10,2	0,3

5.2 SKLEPI

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je pomemben delež Pb in Zn v tleh vezan na organski snovi (4,4-76 % in 19,7-62,4 %) in karbonate (18,1-73 % in 10,7-48,2 %).

Ugotovili smo tudi, da je v tleh prisoten GRSP (3,3-67,1 mg g⁻¹), ki je v korelaciji s količino organske snovi v tleh in s celokupnimi vsebnostmi Pb in Zn v tleh.

Z uporabljenimi metodami smo potrdili, da GRSP veže Pb in Zn. Ugotovili smo, da je na GRSP vezano od 0,69 do 23,4 mg g⁻¹ Pb in od 0,42 do 3,71 mg g⁻¹ Zn.

Ugotovili smo korelacijo med frakcionacijo Pb na GRSP in Pb na organski snovi, medtem ko med frakcionacijo Zn na GRSP in Zn na organski snovi, korelacije nismo našli.

Razhajanja med rezultati frakcionacije Pb in Zn z uporabo Tessierjeve sekvenčne sheme in rezultati ugotavljanje količine Pb in Zn, vezanega na GRSP, nakazujejo, da z ekstrakcijo GRSP z Na-citratom lahko posegamo tudi po kovinah, ki so manj močno vezane oziroma vezane na organsko snov in jih nato z analizo po ekstrakciji z zlatotopko pripišemo vezavi na GRSP. Te domneve bi bilo smiselno preveriti v dodatnih raziskavah.

6 POVZETEK

Težke kovine se v tleh lahko nahajajo naravno ali pridejo tja kot posledica človeških aktivnosti. Analize skupne koncentracije težkih kovin nam ne povedo veliko o njihovi toksičnosti za žive organizme, saj se kovine v tleh vežejo na različne talne komponente, zaradi česar so lažje ali težje dostopne. To vezavo imenujemo tudi frakcionacija. V tleh se kovine tako lahko zadržujejo v talni raztopini, kot izmenljive na glinenih mineralih, vezane na Fe in Mn okside, adsorbirane na organsko snov in vezane na karbonate. Frakcionacijo določamo s postopki zaporednih (sekvenčnih) ekstrakcij, pri katerih uporabljamo serijo različno močnih ekstrakcijskih raztopin. Frakcionacija je uravnavana z različnimi talnimi lastnostmi, največji vpliv na vezavo kovin imata organska snov in pH tal.

V nalogi smo ugotavljali, kakšna je frakcionacija svinca in cinka v vzorcih tal iz Žerjava. Zanimalo nas je ali je v tleh prisoten glomalinu soroden talni protein (GRSP), ki je ena izmed v vodi netopnih komponent humina in je del organske snovi v tleh. Sekvestriral naj bi pomemno količino svinca in cinka v tleh ter tako prispeval veliko k biostabilizaciji težkih kovin v tleh. V raziskavi smo za ugotovitev frakcionacije svinca in cinka v tleh uporabili modificirano metodo sekvenčne ekstrakcije (Tessier in sod., 1979). Za analizo glomalina smo uporabili ekstrakcijsko metodo, ki sta jo opisali Wright in Upadhyaya (1998, cit po González-Chávez in sod. 2004), svinec in cink na GRSP je bil določen s postopkom, ki so ga uporabili González-Chávez in sod. (2004).

Za našo raziskavo smo izbrali 21 talnih vzorcev vzdolž grebena nad Dolino smrti v Žerjavu (Mežiška dolina), ki je eno izmed najbolj onesnaženih območij s Pb, Zn in Cd v Sloveniji. Koncentracije teh težkih kovin so v tleh povečane zaradi rudniške in topilniške dejavnosti, ki je v teh krajih prisotna že od leta 1665. Z analizami smo ugotovili, da je bila koncentracija skupnega Pb v vzorcih od 270 do 18399 mg kg⁻¹ in Zn od 62 do 1446 mg kg⁻¹. Glede na slovensko zakonodajo lahko trdimo, da je večina talnih vzorcev onesnažena s Pb (presega kritično mejo) ter približno polovica vzorcev s Zn.

Sekvenčna ekstrakcija je pokazala, da se zelo malo svinca in cinka nahaja v frakcijah, ki so rastlinam dosegljive, torej v vodotopni in izmenljivo vezani. Večina svinca in cinka v tleh je vezana na način, ki je rastlinam nedostopen: vezan na organsko snov, karbonate ali se nahaja v ostanku, manjši delež ju je tudi na Fe in Mn oksidih.

Ugotovili smo, da je v tleh prisoten GRSP, ki je v močni statistično značilni korelaciji s koncentracijo organske snovi v tleh. Pozitivno korelacijo smo ugotovili tudi med koncentracijo GRSP v tleh in koncentracijami skupnega Pb in Zn v tleh. Pri primerjavi količine Pb vezanega na GRSP in Pb vezanega na organsko snov v tleh smo ugotovili pozitivno korelacijo, pri primerjavi Zn na GRSP in Zn na organski snovi nismo ugotovili statistično značilne korelacije. Ugotovili smo, da je v povprečju velik delež Pb in Zn, ki se nahaja na organski snovi vezan na GRSP, torej bi lahko predstavljal pomemno komponento za vezavo potencialno toksičnih kovin v tleh, ki posledično zmanjšuje njihovo biodostopnost. Natančno oceno pomena GRSP za sekvestracijo Pb in Zn omejuje to, da smo pri določenih talnih vzorcih naleteli na precejšnja razhajanja, saj je bilo na GRSP vezano več Pb in Zn, kot ju je bilo na celotni organski snovi. Vzroki za razhajanja so verjetno v postopkih analiz. Pri sekvenčni ekstrakciji ugotavljamo kovine vezane na

organsko snov v ostanku talnega vzorca po predhodnih ekstrakcijah s šibkejšimi reagenti; ekstrakcijo GRSP smo izvedli v izvornem talnem vzorcu, pri čemer smo uporabili agresivne postopke (močne reagente, ponavljanje ekstrakcij, avtoklaviranje vzorcev), ki, po naših predvidevanjih, lahko posegajo tudi po kovinah, ki so v tleh manj močno vezane (vezane v prvih frakcijah glede na sekvenčne metode). Zato se nam zdi realnejša primerjava deležev Pb in Zn na GRSP z vsoto količin Pb in Zn, ki sta vezana v prvih štirih talnih frakcijah. Da bi potrdili ta predvidevanja, bi bilo potrebno v tej smeri narediti še dodatne raziskave.

7 VIRI

- Adriano D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, Springer-Verlag: 533 str.
- Boruvka L., Drabek O. 2004. Heavy metal distribution between fractions of humic substances in heavily polluted soils. *Plant Soil Environment*, 50: 339-345
- Chern E.C., Tsai D.W., Ogunseitan O.A. 2007 Deposition of Glomalin-Related Soil Protein and Sequestered Toxic Metals into Watersheds. *Environmental Science and Technology*, 41: 3566-3572
- Driver J.D., Holben W.E., Rillig M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 101-106
- Förstner U. 1992. Metal speciation – general concepts and applications. *Environmental Analytical Chemistry*, 51: 5-23
- González-Chávez C., Carrillo-González R., Wright S.F., Nichols K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 130: 317-323
- Hayes M.H.B., Clapp C.E. 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Science*, 166, 11: 723-737
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1984. Trace elements in Soil and Plants. Boca Raton, Florida, CRC Press: 315 str.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1992. Trace elements in Soil and Plants. Boca Raton, Florida, CRC Press: 315 str.
- Leštan D. 2002. Ekopedologija. Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 268 str.
- Leštan D., Grčman H. 2001. Speciation of lead, zinc and cadmium in contaminated soils from Mežica valley. *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo*, 77, 2: 205-214
- Maček I., Vodnik D. 2005. Glomalin, lepilo strukturnih agregatov in pomembna sestavina organske snovi tal. *Proteus*, 67, 6: 244-251
- Nichols K.A., Wright S.F. 2004. Contributions of Fungi to Soil Organic Matter in Agroecosystems. *Soil organic matter in sustainable agriculture*. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., CRC Press: 179-198
- Rillig M.C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science*, 84: 355-363

- Pirc S., Šajn R. 1997. Vloga geokemije v ugotavljanju kemične obremenitve okolja. V: Kemizacija okolja in življenja. Do katere mere? Zbornik projekta Evropskega leta varstva narave 1995. Lah A. (ur.). Ljubljana, Slovensko ekološko gibanje: 165-186
- Rieuwerts J. S., Thornton I., Farago M. E., Ashmore M. R. 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10, 2: 61-75
- Ross S. M. 1994. *Toxic Metals in Soil Plant System*. New York, John Wiley and Sons: 496 str.
- SIST ISO 11261. Kakovost tal - Ugotavljanje skupnega dušika- modificirana Kjeldahlova metoda. 1996: 4 str.
- SIST ISO 10390. Kakovost tal - Ugotavljanje pH. 1996: 5 str.
- SIST ISO 14235. Kakovost tal -Določanje organskega ogljika z oksidacijo v kromžvepleni kislini (Modificirano po Walkley-Black). 1999: 5 str.
- SIST ISO 11466. Kakovost tal – Ekstrakcija elementov v sledovih, topnih v zlatotopki. 1996: 6 str.
- SIST ISO 11047. Kakovost tal – določanje Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, Zn –metoda plamenske in elektrotermične atomske absorpcijske spektrometrije. 1996: 5 str.
- SIST ISO 10693. Kakovost tal - ugotavljanje vsebnosti karbonatov – volumetrijska metoda. 1996: 7 str.
- Souvent P.1994. Rudnik Mežica nekoč, danes in jutri. V: *Okolje v Sloveniji*. Zbornik. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije : 533-541
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51, 7: 844-851
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Ur. l. RS št. 68-5773/96
- Vodnik D. 2005. Glomalin-razkrivanje večplastnosti funkcij mikorize v ekosistemih. V: Seminar Oddelka za agronomijo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, 25. oktober 2005 (neobjavljeno)
- Vodnik D. 2007. "Glomalin v tleh iz Žerjava". Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo (osebni vir, junij 2007)
- Vodnik D., Grčman H., Maček I., van Elteren J.T., Kovačević M. 2008. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. *Science of the Total Environment*, 392: 130-136

Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Regvar M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb Hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution*, 139: 362-371

WHO. 1996. Guidelines for drinking-water quality. 2nd ed., vol. 2. Health criteria and other supporting information. Geneva, World Health Organization, 382-388.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/zinc.pdf. (9. april, 2008)

ZAHVALA

Hvala mentorjema in staršem za vso pomoč pri nastanku te diplomske naloge.

PRILOGA A

Frakcionacija svineca (mg kg^{-1}) po posameznih vzorcih

Vzorec	Skupni Pb (mg kg^{-1})	FRAKCIONACIJA Pb (mg kg^{-1})					Izkoristek %
		Topen v talni raztopini +Izmenljivi	Vezan na karbonate	Vezan na Fe, Mn okside	Vezan na organsko snov	Preostali Pb	
1	2861,0	18,7 ± 1,5	534,7 ± 12,7	5,2 ± 0,1	1554,5 ± 158,3	493,7 ± 34,7	91,1
2	5521,5	29,6 ± 1,3	951,7 ± 41,4	12,0 ± 0,8	3102,0 ± 191,4	708,7 ± 98,4	87
3	5493,0	35,2 ± 4,6	1228 ± 18,5	11,8 ± 1,3	3065,0 ± 500,4	496,0 ± 29,5	88
4	6510,0	79,2 ± 2,0	1964,3 ± 48,5	22,9 ± 3,3	259,6 ± 22,6	3531,7 ± 90,2	90
5	2510,5	26,2 ± 0,3	843,3 ± 43,0	9,2 ± 1,7	144,4 ± 7,2	1303,0 ± 18,0	92,7
6	18398,5	209,5 ± 1,7	3186,0 ± 68,4	77,6 ± 0,7	13464,0 ± 996,1	682,3 ± 87,0	95,8
7	4743,0	41,7 ± 3,7	1304,7 ± 19,4	11,0 ± 0,5	1573,5 ± 48,3	520,0 ± 93,5	72,8
8	2817,0	18,3 ± 2,5	650,5 ± 32,5	4,3 ± 0,3	1211,5 ± 155,0	363,3 ± 24,8	80
9	3772,0	26,7 ± 2,7	1160,0 ± 15,7	7,0 ± 0,8	1357,5 ± 63,5	329,7 ± 55,6	76,4
10	7327,5	103,1 ± 1,7	2388,7 ± 106,4	19,3 ± 2,0	602,5 ± 218,1	3698,3 ± 840,7	93
11	3543,0	49,0 ± 0,7	1390,7 ± 32,3	7,0 ± 0,3	228,3 ± 35,1	1584,3 ± 47,7	92
12	5175,0	53,4 ± 0,4	1141,3 ± 38,9	11,1 ± 0,7	200,5 ± 27,8	2676,7 ± 55,8	78,9
13	4246,0	168,2 ± 6,1	3273,3 ± 58,7	14,5 ± 1,1	863,0 ± 45,8	167,7 ± 37,6	105,7
14	15817,0	515,3 ± 9,1	8101,7 ± 90,7	58,4 ± 3,4	3750,0 ± 72,7	1477,3 ± 82,1	87,9
15	9873,0	364,5 ± 3,8	4065,3 ± 281,9	38,6 ± 11,8	845,0 ± 193,7	4916,7 ± 158,1	103,6
16	16724,5	709,0 ± 9,2	4582,0 ± 299,5	51,7 ± 3,2	6118,0 ± 1424,3	4228,3 ± 2126,6	93,8
17	2255,0	60,6 ± 0,5	1636,7 ± 43,0	4,7 ± 0,3	346,6 ± 18,6	227,3 ± 23,1	100,9
18	2241,0	75,2 ± 0,1	1526,7 ± 41,7	5,3 ± 0,5	408,3 ± 13,5	234,0 ± 6,0	100,4
19	269,5	2,0 ± 0,0	149,3 ± 6,3	2,0 ± 0,0	85,9 ± 1,1	31,0 ± 2,6	98,8
20	4478,5	31,7 ± 0,5	1592,7 ± 87,5	8,4 ± 0,3	897,5 ± 92,5	661,0 ± 82,7	71,3
21	336,5	2,0 ± 0,0	235,7 ± 6,7	2,0 ± 0,0	105,9 ± 2,6	34,0 ± 2,6	111,6

*Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± standardni odklon (σ).

PRILOGA B

Frakcionacija cinka (mg kg^{-1}) po posameznih vzorcih

Vzorec	Skupni Zn (mg kg^{-1})	FRAKCIONACIJA Zn (mg kg^{-1})					Izkoristek %
		Topen v talni raztopini + izmenljivi	Vežan na karbonate	Vežan na Fe, Mn okside	Vežan na organsko snov	Preostali Zn	
1	484,5	6,8 ± 0,1	59,9 ± 3,2	3,9 ± 0,2	248,8 ± 9,5	136,7 ± 9,3	94,1
2	939,9	18,0 ± 2,5	115,7 ± 2,8	10,0 ± 0,3	479,3 ± 11,1	262,7 ± 5,9	94,2
3	1154,0	32,3 ± 0,6	193,7 ± 2,1	20,4 ± 0,9	618,8 ± 9,1	238,3 ± 4,1	95,6
4	839,2	49,1 ± 1,6	184,8 ± 1,5	17,3 ± 1,3	441,2 ± 12,0	142,8 ± 5,4	99,5
5	877,0	47,4 ± 6,2	236,3 ± 5,8	21,0 ± 2,4	467,0 ± 74,9	96,2 ± 8,8	99,0
6	1237,5	45,4 ± 6,9	132,7 ± 7,3	20,5 ± 2,5	703,0 ± 8,7	334,0 ± 15,1	99,8
7	499,5	8,4 ± 0,1	71,4 ± 2,6	5,3 ± 0,2	251,8 ± 8,6	128,7 ± 12,8	93,2
8	319,0	3,7 ± 0,3	37,5 ± 1,8	2,3 ± 0,2	142,3 ± 9,8	113,5 ± 2,2	93,8
9	401,3	6,5 ± 0,1	66,1 ± 1,0	4,6 ± 0,2	198,3 ± 7,6	127,5 ± 1,3	100,4
10	741,8	34,4 ± 0,6	165,0 ± 3,5	13,5 ± 0,6	424,3 ± 62,8	68,2 ± 4,7	95,1
11	588,6	25,8 ± 1,4	172,3 ± 10,7	11,6 ± 0,2	297,8 ± 10,9	84,3 ± 2,9	100,6
12	693,5	16,6 ± 0,2	114,5 ± 2,0	7,3 ± 0,2	419,3 ± 6,0	114,3 ± 7,6	96,9
13	458,7	40,4 ± 1,5	223,2 ± 7,9	26,1 ± 1,34	112,7 ± 11,9	61,1 ± 7,5	101,0
14	803,0	113,9 ± 7,5	269,2 ± 5,5	34,9 ± 1,0	302,0 ± 9,4	109,2 ± 5,0	103,3
15	602,7	93,0 ± 4,2	152,3 ± 3,8	10,7 ± 1,0	294,5 ± 5,0	56,0 ± 9,3	100,6
16	1445,6	424,8 ± 2,5	273,5 ± 7,5	25,7 ± 1,0	744,0 ± 4,9	81,2 ± 7,0	107,2
17	239,5	10,7 ± 0,1	104,2 ± 10,1	4,6 ± 0,1	68,4 ± 1,1	29,8 ± 1,1	90,9
18	339,5	29,9 ± 0,5	123,5 ± 12,7	7,6 ± 0,3	84,3 ± 5,3	39,0 ± 2,1	83,7
19	61,8	0	18,7 ± 0,8	0,6 ± 0,1	11,9 ± 0,2	25,9 ± 2,8	92,6
20	650,2	8,6 ± 0,1	138,5 ± 9,5	12,8 ± 0,1	304,5 ± 6,0	187,0 ± 3,0	100,2
21	66,8	0	20,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	11,8 ± 0,2	26,0 ± 1,8	89,2

*Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± standardni odklon (σ).