

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dragana TICA

**DOSTOPNOST KOVIN V ONESNAŽENIH TLEH PO
REMEDIACIJI Z METODO STABILIZACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Dragana TICA

**DOSTOPNOST KOVIN V ONESNAŽENIH TLEH PO REMEDIACIJI
Z METODO STABILIZACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ACCESSIBILITY OF METALS IN CONTAMINATED SOILS AFTER
REMEDIATION WITH STABILIZATION METHOD**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Varstva okolja in je bilo opravljeno v Centru za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 16. 5. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študiju Varstvo okolja. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Domen Leštan, za somentorja pa prof. dr. Marjan Veber.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Mentor in član: prof. dr. Domen LEŠTAN
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Somentor in član: prof. dr. Marjan VEBER
 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: prof. dr. Franc LOBNIK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora: 4. 10. 2013

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Dragana TICA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 631.41:351.777.6+628.193:549.25+543.2(043.3)=163.6
KG	potencialno strupene kovine (PSK)/biodostopnost/stabilizacija tal/aditivi, stabilizanti/hidroksiapatit/Slovakit/kalcijev polisulfid/mobilizacija PSK/funkcionalnost tal/encimska aktivnost/deževniki
AV	TICA, Dragana, univ. dipl. inž. tehnologije
SA	LEŠTAN, Domen (mentor)/VEBER, Marjan (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Varstvo okolja
LI	2013
IN	DOSTOPNOST KOVIN V ONESNAŽENIH TLEH PO REMEDIACIJI Z METODO STABILIZACIJE
TD	Doktorska disertacija
OP	XIV, 101 str., 15 pregl., 19 sl., 177 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z delom, predstavljenim v doktorski disertaciji, je bila raziskana učinkovitost stabilizacije oz. imobilizacije potencialno strupenih kovin (PSK; Pb, Zn, Cu in Cd) z dodajanjem hidroksiapatita (HA) in komercialnega stabilizanta Slovakita tlem, onesnaženimi s PSK. Raziskan je tudi vpliv živih okoljskih dejavnikov (deževniških vrst <i>L. terrestris</i> in <i>D. veneta</i> , kot modelni vrsti) na usodo imobiliziranih PSK v remediranih tleh. Z različnimi ekstrakcijskimi testi je bilo dokazano, da se je z dodajanjem aditivov tlom (5 % w/w) znižala biodostopnost in mobilnost PSK (ekstrakcije z dietilentriaminpentaoacetno in etilendiamintetraoacetno kislino), posledično tudi fitodostopnost PSK v tleh (ekstrakcije z CaCl ₂ in NH ₄ OAc), in da so PSK prešle iz bolj mobilnih v manj mobilne ali nemobilne frakcije (sekvenčna ekstrakcija). Znižanje oralne biodostopnosti PSK v remediranih tleh je bilo dokazano na primeru dodajanja 5 % HA tlem (Unified BARGE Method). Stabilizacija tal je izboljšala funkcionalnost in kakovost tal; β-glukozidaze in dehidrogenaze (DHA) ter z glukozo inducirano dihanje (zvišano do 5,2-kratnika po dodatku aditivov) so se izkazali kot najobčutljivejši parametri pri spremembah pH, CEC in potencialne biodostopnosti PSK ter posledično kot primerni potencialni indikatorji kakovosti tal. Dostopnost PSK je bila zaradi delovanja deževnikov povečana s čimer je bil končni učinek stabilizacije zmanjšan, obenem pa je bilo izboljšano funkcionalno stanje tal (porast z glukozo induciranega dihanja in DHA aktivnosti). Za povečanje učinkovitosti stabilizacije onesnaženih tal sta bili po dodatku HA dodani tri natrijeva sol [S,S]-EDDS in melasa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 631.41:351.777.6+628.193:549.25+543.2(043.3)=163.6
CX potentially toxic metals (PTK)/bioaccessibility/ soil
stabilization/amendments/hydroxyapatite/Slovakite/calcium polysulfide/PTK
mobility/soil functioning/enzyme activity/earthworms/
AU TICA, Dragana
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)/VEBER, Marjan (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Environmental Protection
PY 2013
TI ACCESSIBILITY OF METALS IN CONTAMINATED SOILS AFTER
REMEDIATION WITH STABILIZATION METHOD
DT Doctoral Dissertation
NO XIV, 101 p., 15 tab., 19 fig., 177 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of doctoral work was to evaluate the effectiveness of stabilization i.e. immobilization of potentially toxic metals (PTMs; Pb, Zn, Cu and Cd) by adding hydroxyapatite (HA) and commercial stabilizant Slovakite to soil contaminated with PTMs. The impact of biotic environmental factors (two earthworms species *L. terrestris* and *D. veneta*, as a model species) on the fate of immobilised PTMs in remediated soil was also considered. By means of different extraction tests it was determined that both additives (5 % w/w each) were successful in lowering PTMs bioaccessibility and mobility (extraction tests with dietylenetriaminepentaacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid), phytoaccessibility (extractions with 0,01 M CaCl₂ and NH₄OAc) as well as in converting the most labile PTMs chemical forms into less labile soil fractions (sequential extraction). Oral bioaccessibility of PTMs was effectively reduced by the addition of 5 % hydroxyapatite (in gastrointestinal fraction concentration of Pb was reduced from 4 to 14 times after remediation), which was determined by UBM (Unified BARGE Method). At the same time functionality and quality of soil were improved due to soil stabilization; activity of β- glucosidase and dehydrogenase (DHA) as well as glucose-induced respiration (increased even 5,2 times after remediation) were most sensitive parameters to pH, CEC and PTM potential bioaccessibility changes in the soil, demonstrating their potential as indicators of soil quality. General increase of PTMs bioaccessibility was noticed after earthworm's incubation, indicating that the stabilization effect may decrease over time. On the other hand soil functioning after remediation was improved due to earthworm's activity. It was reflected in the increased induced respiration rate and increased DHA activity. We also tried to improve soil stabilization by adding tri-sodium salt of [S,S]-ethylenediaminedisuccinate and molasses after soil mixing with hydroxyapatite.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	XI
Okrajšave in simboli	XIV
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	9
1.2 PRIČAKOVANI REZULTATI IN PRISPEVEK DISERTACIJE K RAZVOJU ZNANOSTI	9
2 PREGLED OBJAV	10
2.1 UPORABA RAZLIČNIH ADITIVOV ZA STABILIZACIJO TAL	10
2.1.1 Alumosilikati	10
2.1.2 Fosfatni aditivi	10
2.1.3 Kalcijev polisulfid (CaSx)	12
2.2 VPLIV STABILIZACIJE NA BIODOSTOPNOST PSK	13
2.3 VPLIV STABILIZACIJE NA RASTLINE	16
2.4 VPLIV STABILIZACIJE NA ORALNO BIODOSTOPNOST PSK	17
2.5 VPLIV REMEDIACIJE NA FUNKCIONALNOST TAL	20
2.6 VPLIV DEŽEVNIKOV NA REMEDIRANA TLA	22
2.6.1 Vpliv deževnikov na lastnosti tal	23
2.6.2 Vpliv deževnikov na biodostopnost PSK	23
2.6.3 Vpliv deževnikov na funkcionalnost tal - vpliv na encimsko aktivnost in dihanje v tleh	25
2.7 UPORABA [S,S]-EDDS V POSTOPKU STABILIZACIJE TAL	26
3 MATERIALI IN METODE	27
3.1 LOKACIJE VZORČENJA	27
3.2 VPLIV ADITIVOV NA STABILIZACIJO PSK IN FUNKCIONALNO OBNOVITEV ONESNAŽENIH TAL PO STABILIZACIJI - ZASNOVA POSKUSA	28
3.3 VPLIV DEŽEVNIKOV NA BIODOSTOPNOST PSK IN FUNKCIONALNO OBNOVITEV ONESNAŽENIH TAL PO STABILIZACIJI - ZASNOVA POSKUSA	30
3.4 VPLIV ADITIVOV NA STABILIZACIJO PSK PO DODATKU Na ₃ EDDS IN HRANIL (MELASE)	30
3.5 OSNOVNE PEDOLOŠKE ANALIZE	33
3.5.1 Tekstura tal	33

3.5.2 pH vrednost	33
3.5.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta tal (CEC - cation exchange capacity)	34
3.5.4 Organska snov, C/N razmerje in rastlinam dostopni fosfor	34
3.6 ZADRŽEVALNA (POLJSKA) KAPACITETA TAL	35
3.7 VSEBNOST KOVIN	35
3.7.1 Določanje celokupnih vsebnosti kovin	35
3.7.2 Sekvenčna ekstrakcija kovin	36
3.8 EKSTRAKCIJSKI TESTI	37
3.8.1 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z 0,01 M CaCl₂	37
3.8.2 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z 1 M amonoacetatom (NH₄OAc)	37
3.8.3 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z DTPA	37
3.8.4 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z EDTA	38
3.9 ENCIMSKI TESTI	38
3.9.1 Dehidrogenazna aktivnost	38
3.9.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost	39
3.9.3 β- glukozidazna aktivnost	39
3.10 SUBSTRATNO (GLUKOZNO) INDUCIRANO DIHANJE	39
3.11 UBM TEST	40
3.12 RAZGRADNJA Na ₃ EDDS	40
3.13 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV	41
4 REZULTATI	42
4.1 OSNOVNE PEDOLOŠKE ZNAČILNOSTI TAL PRED STABILIZACIJO IN PO NJEJ	42
4.1.1 Tekstura tal	42
4.1.2 pH vrednost	44
4.1.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC)	45
4.1.4 Organska snov, C/N razmerje in rastlinam dostopni fosfor	46
4.1.5 Zadrževalna (poljska) kapaciteta tal	49
4.2 VSEBNOST PSK V TLEH	49
4.2.1 Celokupne vsebnosti PSK v tleh določene z zlatotopko	49
4.2.2 Celokupne vsebnosti PSK v tleh določene z rentgensko flouoroscenčno spektrometrijo	50
4.2.3 Frakcionacija PSK v tleh	51
4.3 MOBILNOST IN BIODOSTOPNOST PSK V TLEH	54
4.3.1 Določanje biodostopnosti PSK z metodo DTPA	54
4.3.2 Določanje biodostopnosti PSK z metodo NH₄OAc	57
4.3.3 Določanje biodostopnosti PSK z metodo CaCl₂	61
4.3.4 Določanje biodostopnosti PSK z metodo EDTA	62
4.4 ENCIMSKE AKTIVNOSTI V TLEH	63

4.4.1 Dehidrogenazna aktivnost	63
4.4.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost	64
4.4.2.1 Kisle fosfataze	64
4.4.2.1 Bazične fosfataze	64
4.4.3 β-glukozidazna aktivnost	65
4.5 SUBSTRATNO (GLUKOZNO) INDUCIRANO DIHANJE	66
4.6 BIODOSTOPNOST PSK IZ TAL PO ORALNEM VNOSU	67
4.7 SPIRANJE TAL (MEŽIŠKA TLA)	70
4.8 RAZGRADNJA Na ₃ EDDS	70
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	72
5.1 RAZPRAVA	72
5.1.1 Vpliv aditivov na biodostopnost PSK in funkcionalno obnavljanje tal	72
5.1.2 Vpliv biotičnih faktorjev na učinkovitost stabilizacije in kakovost tal	77
5.1.3 Možnosti izboljšanja postopka stabilizacije tal s dodajanjem Na₃EDDS in hranil (melase) tlem	80
5.2 SKLEPI	83
6 POVZETEK (SUMMARY)	85
6.1 POVZETEK	85
6.2 SUMMARY	87
7 VIRI	89
ZAHVALA	102

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled objavljenih učinkovitosti aditiva (Kumpiene in sod., 2008: 222) 6

Preglednica 2: Termodinamične konstante topnosti (oz. topnostni produkti K_{sp}) za določene spojine Pb, Zn, Cu in Cd 11

Preglednica 3: Seznam okrajšav analiziranih talnih vzorcev 42

Preglednica 4: Tekstura kontrolnih tal (iz Podkloštra) in tal, remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD 43

Preglednica 5: pH vrednost v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, ter v mežiških tleh po različnih talnih obravnavanj 45

Preglednica 6: Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovakita pred in po inkubaciji deževnikov (*L. terrestris* in *D. veneta*) ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med CEC v remediranimi in kontrolnimi tlemi, majhne črke pa statistično značilne razlike med CEC tleh brez deževnikov in tleh po inkubaciji s deževniki (Duncan, $p < 0,01$) 46

Preglednica 7: Organska snov, C/N in P_2O_5 v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med rezultati v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med rezultati tal brez deževnikov in tal po inkubaciji deževnikov (Duncan, $p < 0,01$) 48

Preglednica 8: Celokupne koncentracije PSK v kontrolnih tleh (Podklošter in Mežica) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami iste kovine v remediranih tleh in v kontroli, majhne črke pa statistično značilne razlike med

koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji s deževniki (Duncan, p < 0,01) 50

Preglednica 9: Frakcionalna razdelitev Pb, Zn, Cu in Cd v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01) 52

Preglednica 10: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* po DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih tleh in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01). 55

Preglednica 11: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* po NH₄OAc ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih oz. različno obravnavanih tleh in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01) 58

Preglednica 12: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* določene v ekstrakciji s CaCl₂. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01) 61

Preglednica 13: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, določene v ekstrakciji z EDTA. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01) 62

Preglednica 14: Koncentracije kovin v mežiških tleh (M_x, M_y in M_z) po različnih talnih obravnavanjih (I, II, III, IV), pridobljene v želodčni frakciji testa UBM. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin po različnih talnih obravnavanjih (Duncan, p < 0,01) 68

Preglednica 15: Koreacijski koeficient med kemijskimi (pH vrednost tal, kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) in potencialna biodostopnost PSK določena z ekstrakcijami s dietilentriaminpentaocetno kislino (DTPA), etilendiamintetraocetno kislino (EDTA), NH₄OAc, CaCl₂ in sekvenčno ekstrakcijo (vsota vodotopne (I) in izmenljive (II) frakcije)) in mikrobiološkimi (z glukozo inducirano dihanje (S.I.R.), kisle fosfataze (Kisle PA), bazične fosfataze (Bazične PA), β - glukozidaze (β - Glu) in dehidrogenaze (DHA)) lastnosti neremediranih tal in tal remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita. 76

KAZALO SLIK

Slika 1: Onesnažena področja v Evropi leta 2006; status onesnaženih in remediranih tal v Evropi (Overview of ..., 2012; 32)	3
Slika 2: Lociranje kraja Podklošter (črna pika) na avstrijskem Koroškem (siva površina) (Friesl-Hanl in sod., 2009: 583)	27
Slika 3: Lociranje vzorčnih točk (zelene črke) v Mežiški dolini (x za vzorec Mx, y za My in z za Mz); avtor karte: dr. Neža Finžgar, ENVIT; geostatistična obdelava podatkov: dr. Milan Kobal, Gozdarski inštitut Slovenije (2012) (osebna komunikacija)	28
Slika 4: Priprava kontrolnih in stabiliziranih tal v kolonah; faza vlaženja tal do 100 % poljske kapacitete.	29
Slika 5: Določanje pH vrednosti (levo) in vsebnosti PSK s XRF metodo (desno) v talnih vzorcih na terenu	31
Slika 6: Postopek nasičenja različno remediranih talnih vzorcev	32
Slika 7: Potencialna biodostupnost kovin v kontrolnih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s hidroksiapatitom in Slovakitom (vsaki v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w) določena v DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD	55
Slika 8: Potencialna biodostopnost kovin v mežiških tleh po različnih talnih obravnavanjih po DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v različno obravnavanih tleh (Duncan, $p < 0,01$)	57
Slika 9: Potencialna biodostopnost kovin v kontrolnih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s hidroksiapatitom in Slovakitom (vsaki v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w), določena v ekstrakciji s NH_4OAc . Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD	58
Slika 10: Potencialna biodostopnost Pb v tleh Mx, stabiliziranih s hidroksiapatitom, Slovakitom in kalcijevim polisulfidom (v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w vsaki), določena z ekstrakcijo s NH_4OAc . Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev \pm SD	59
Slika 11: Potencialna biodostopnost kovin v mežiških tleh po različnih talnih	

obravnavanjih po NH₄OAc ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v različno obravnavanih tleh (Duncan, p < 0,01) 60

Slika 12: Dehidrogenazna aktivnost v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo remediranih in kontrolnih tal, majhne črke pa statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov za kontrolna in remedirana tla (Duncan, p < 0,01) 63

Slika 13: Aktivnost kislih fosfataz v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo remediranih in kontrolnih tal, majhne črke pa statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, za kontrolna in remedirana tla (Duncan, p < 0,01) 64

Slika 14: Aktivnost bazičnih fosfataz v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, tako v kontrolnih kakor v remediranih tleh (Duncan, p < 0,01). 65

Slika 15: Aktivnost β- glukozidaz v neremediranih tleh in tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med β- glukozidazno aktivnostjo v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med β- glukozidazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, tako v kontrolnih kakor v remediranih tleh (Duncan, p < 0,01) 66

Slika 16: Z substratom inducirano dihanje v neremediranih tleh in tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med dihanjem v remediranih in

kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med dihanjem v tleh brez deževnikov in po inkubaciji s deževniki, tako za kontrolna kakor za remedirana tla (Duncan, $p < 0,01$) 67

Slika 17: Koncentracija PSK v kontrolnih tleh in v različno tretiranih mežiških tleh po UBM ekstrakciji- črevesna faza. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med rezultati v kontrolnem tlu in v različno tretiranih tleh (Duncan, $p < 0,01$) 69

Slika 18: Odstranjeni Pb in Cd iz vzorca Mx po spiranju z uporabo štirih različnih koncentracij Na₃EDDS. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD ($n = 3$) 70

Slika 19: Koncentracija Pb v talni raztopini po različnem inkubacijskem času (0- 1008 h) tal tretiranih z 10 mM Na₃EDDS kg⁻¹ raztopljenim v volumnu vode, ki odgovarja 105 % zadrževalne kapacitet tal, ter v tleh z melaso in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS 71

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PSK:	potencialno strupene kovine
DTPA:	dietilentriaminpentaocetna kislina
[S,S]-EDDS:	[S,S]- stereoizomer etilendiamindisukcinata
Na ₃ EDDS:	tri-natrij-[S,S]-etylendiamindisukcinat
EDTA:	etylendiamintetraocetna kislina
HA:	hidroksiapatit
HP:	(hidroksi)piromorfit
DAP:	diamonijev fosfat
PBET:	Physiologically Based Extraction Test
UBM:	Unified Barge Method
LOQ:	limit of quantification
DHA:	dehidrogenaze
US EPA:	United States Environmental Protection Agency
EEA:	European Environment Agency
JRC:	Joint Research Center

1 UVOD

Tla so počasi obnovljiv, kompleksen in dinamičen sistem, katerega funkcije so bistvenega pomena za človekove dejavnosti ter delovanje ekosistema (Proposal for ..., 2006). Razvoj industrije, promet in širitev mest tekmujejo s kmetijstvom za iste površine in lahko povzročijo vnos potencialno nevarnih snovi v tla, kar lahko ogrozi kakovost tal (Grčman in sod., 2004). Glede na kemijsko sestavo, onesnažila delimo v dve skupini - anorganska in organska. V Evropi je največji onesnaževalec tal industrija (60 %), največja onesnažila pa so potencialno strupene kovine - PSK (37 %) in mineralna olja (33 %) (Soils policy ..., 2012). Tudi v ZDA beležijo podoben trend - kar šest od enajstih najpogostejših onesnažil predstavljajo PSK- svinec (Pb), krom (Cr), kadmij (Cd), nikelj (Ni) in cink (Zn) ter arzen (As) (Contaminants and ..., 1995).

PSK so v tleh v nižjih koncentracijah naravno prisotne, v preteklih desetletjih pa so se njihove koncentracije povečale predvsem zaradi človekovih aktivnosti - rudarjenja, taljenja rude, industrije, prometa, kmetijstva, pa tudi neustreznega odlaganja industrijskih in gospodinjskih odpadkov (Bolan in sod., 2003; Zupan in sod., 2007). PSK antropogenega porekla so pogosto bolj dostopne in bolj mobilne od tistih, ki so v tleh naravno prisotne (Adriano, 2001). Zaradi potencialne strupenosti in možnosti onesnaženja podtalnice, obstaja velika nevarnost vnesenih PSK že v začetni fazи onesnaženja, saj je takrat največ kovin v izmenljivi in mobilni frakciji (Nowack in sod., 2010). S časom se ta učinek lahko zmanjša, saj se PSK lahko pretvorijo v stabilnejše frakcije (s porazdelitvijo med trdno in tekočo frakcijo), kar lahko traja od nekaj mesecev do nekaj let in ne pomeni zmanjšanja nevarnosti in tveganja za okolje (Gusiatin in Klimiuk, 2012). Za razliko od organskih onesnažil se PSK v tleh ne razgradijo (niti po kemijski, niti po mikrobiološki poti), temveč v tleh povzročajo kronične vplive na okolje. Izjema so le kovine, ki jih mikroorganizmi pretvorijo v hlapne oblike kot je npr. živo srebro (mikrobne pretvorbe obsegajo predvsem redukcijo Hg^{2+} , metilacijo Hg^0 in dimetilacijo metilnega živega srebra (MeHg); metil-derivati se potem odstranjujejo iz tal z izparevanjem) (Adriano in sod., 2004).

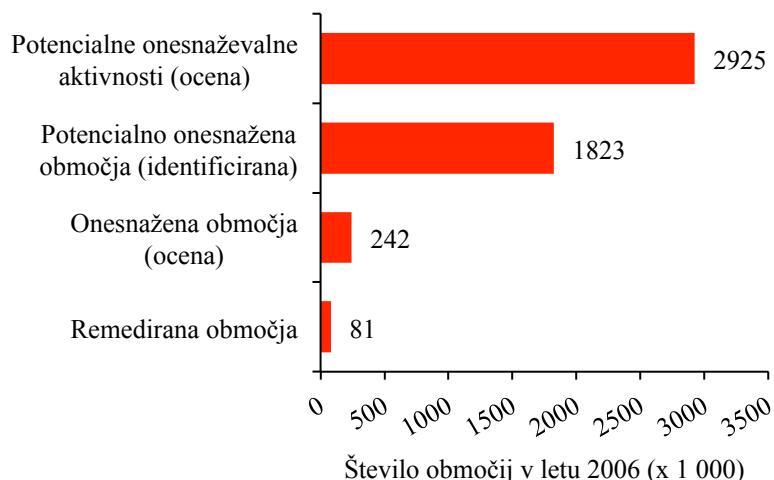
Tla predstavljajo najpomembnejši ponor PSK v kopenskih ekosistemih z omejeno zadrževalno kapaciteto; ione kovin lahko zadržijo skozi procese sorpcije,obarjanja, kompleksiranja ali redoks reakcije s talnimi sestavnimi deli (Adriano in sod., 2004). V kolikor je ta zadrževalna kapaciteta tal presežena, se pričnejo v tleh pojavljati mobilne kovine, ki so bodisi raztopljene v talni raztopini ali vezane na izmenljiva mesta organske snovi ali anorganskih komponent (Adriano, 2001). Prav mobilizirane PSK predstavljajo največjo grožnjo ekosistemom. PSK pri rastlinah povzročajo inaktivacijo encimov, blokiranje funkcionalnih skupin biološko pomembnih molekul in poškodbe biomembran (Leštan, 2002). Človekovo zdravje lahko ogrozijo z vstopom v prehranjevalno verigo - s prehrano z živili, gojenimi na onesnaženih območjih, s pitjem onesnažene vode,

neposrednim vdihovanjem prašnih talnih delcev ali zaužitjem onesnaženih tal, čemur so zaradi igralnih navad najbolj izpostavljeni otroci (Madrid in sod., 2006). Kronične zastrupitve pri odraslem človeku predstavljajo bistveno večje tveganje za zdravje kot akutne zastrupitve (Zupan in sod., 2007); kadmij (Cd), baker (Cu), svinec (Pb), živo srebro (Hg), nikelj (Ni) in cink (Zn) veljajo za najbolj nevarne PSK, zato jih Ameriška agencija za varstvo okolja (US EPA) uvršča na prednostni seznam onesnažil (Mulligan in sod., 2001). Zn in Cu sta esencialna mikroelementa, ki pa imata pri povišanih koncentracijah predvsem negativne učinke. Pb in Cd sta v neonesnaženih tleh prisotna v zelo nizkih koncentracijah; normalna povprečna vsebnost Cd v tleh je 1 ppm, Pb pa manj kot 10 ppm (Mulligan in sod., 2001). Svinec vstopa v telo predvsem z zaužitjem, vdihovanjem ali preko kože. V telesu se akumulira in tako vpliva na centralni živčni sistem in reprodukcijo, povzroča pa tudi resne okvare ledvic; za otroke, mlajše od šestih let, zato za zdaj ni mogoče določiti varne koncentracije Pb. Kadmij lahko vstopi v prehranjevalno verigo z zauživanjem na onesnaženih tleh pridelane hrane, povzroča pa motnje metabolizma kalcija in posledično osteoporozo. Dolgotrajnejša izpostavljenost preko vdihovanja in zaužitja povzroča okvaro pljuč in ledvic. Zastrupitve z Zn in Cu so redke, pa vendar povečan vnos Zn s prehrano lahko povzroči motnje metabolizma holesterola, Cu pa draži dihalne poti, moti ravnotežje Zn v organizmu in v visokih koncentracijah lahko povzroči poškodbe jeter in ledvic, organov, v katerih se Cu v največji meri akumulira (Bradl in sod., 2005).

Degradacija tal je počasen proces, ki pogosto nima hipnih dramatičnih posledic. Zaradi puferskih sposobnosti tal škodo, ki jo povzročajo različne dejavnosti, pogosto opazimo šele, ko se je ne da več popolnoma odpraviti. Ozaveščenost javnosti o tleh kot ogroženem naravnem viru je v primerjavi z vodo in zrakom manjša prav zaradi zakasnjenega učinka onesnaženosti, ki je posledica puferske sposobnosti tal (Leštan, 2002). Tla so v primerjavi z zrakom in vodo trenutno v neenakopravnem položaju predvsem na področju zakonodaje, kljub temu da je pravilno delovanje tal osnova za delovanje ekosistemov in ekonomijo.

Tematska strategija za zaščito tal (COM(2006)231), ki jo je sprejela Evropska Komisija septembra 2006, je namenjena razvoju trajnostnega ravnjanja s tlemi, zaščiti pred nadaljnjo degradacijo, ohranjanju funkcionalnosti tal ter obnavljanju degradiranih tal (Report from ..., 2012). Sestavni del strategije je predlog okvirne direktive o tleh (COM(2006)232), ki temelji na treh tematskih sklopih: na uvajanju preventivnih ukrepov, opredelitvi problemov in izvajanju operativnih ukrepov. Cilj direktive je poenotenje skupne zaščite in ravnjanja s tlemi za celotno Evropo (The state of ..., 2012). Nekatere države članice so predlogu za okvirno direktivo iz leta 2006 nasprotovale in so v Svetu leta 2010 blokirale sprejetje zakonodaje; sklicevale so se na argument subsidiarnosti, dodatne stroške in administrativno obremenitev. Ker degradacija tal nedvomno povzroča tudi čezmejne učinke, je usklajevanje politike na evropski ravni povsem upravičeno. Eno od ključnih poročil Evropske agencije za okolje (EEA) in Skupnega raziskovalnega središča Evropske

komisije (JRC) o stanju tal v Evropi v letu 2012 (Izvajanje Tematske strategije ..., 2012) ugotavlja, da se degradacija tal v EU nadaljuje, da se v nekaterih delih Evrope položaj celo zaostruje in da obstoječe politike in zakonodaja na ravni EU ter na nacionalni in regionalni ravni ne zadostujejo za popolno zaščito tal. Zaradi tega je potrebno sprejeti ukrepe na lokalni in regionalni ravni, kjer se politika varstva tal izvaja; vrzeli v ukrepnih varstva tal pa obravnavati na skupni osnovi v EU. Trenutno ima le devet držav članic EU specifično zakonodajo za varstvo tal (posebej za onesnaženost) (Soil ..., 2012). Da je problem tudi globalen govor podatek, da letno izgubimo kar 24 milijard ton tal. V Indiji je po podatkih, objavljenih tudi s strani Evropske komisije (Report from ..., 2012), okrog 36 000 onesnaženih področij, na Kitajskem med 300 000 in 600 000. V EU je onesnaževanje tal resen problem (Slika 1), čeprav predstavlja le enega izmed vidikov degradacije tal. Evropska Agencija za okolje je leta 2006 ocenila, da je v EU prisotnih okoli tri milijone potencialno ogroženih območij, od katerih 250 000 onesnaženih nujno potrebuje remediacijo. Komisija je leta 2006 ocenila, da bi lahko skupni stroški degradacije tal v EU-25 znašali 38 miliard EUR letno (Report from ..., 2012; Izvajanje Tematske strategije ..., 2012).



Slika 1: Onesnažena področja v Evropi leta 2006; status onesnaženih in remediranih tal v Evropi (Overview of ..., 2012)

Figure 1: Contaminated sites in Europe, 2006; status of identification and clean-up of contaminated sites in Europe (Overview of ..., 2012)

Večina evropskih držav v zakonodaji podaja dopustne meje onesnažil, vendar te meje varirajo in pogosto ne upoštevajo multifunkcionalne rabe tal (Environmental assessment ..., 2008). Tako je v Republiki Sloveniji še vedno veljavna Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (Ur. L. RS, 68/96), ki mejno, opozorilno in kritično koncentracijo podajajo kot celokupno koncentracijo kovin, čeprav je znano, da so transport, mobilnost, biodostopnost in izpiranje kovin bolj od njihove koncentracije odvisni od njihovih kemijskih oblik in porazdeljenosti po različnih talnih frakcijah (Mulligan in sod., 2001; Kumpiene in sod., 2007). Potrebna bi bila nadgradnja

obstoječih kriterijev vrednotenja po obstoječi uredbi, ki torej ne bi temeljili zgolj na celokupnih koncentracijah anorganskih ali organskih onesnažil brez upoštevanja njihovega biodostopnega deleža. Poleg te Uredbe, so bili na podlagi Zakona o varstvu okolja (Zakon o varstvu ..., 2006) sprejeti različni podzakonski akti in programi s področja varstva tal: Uredba o mejnih vrednostih vnosa nevarnih snovi in gnojil v tla (Uredba o mejnih ..., 2005), Pravilnik o obratovalnem monitoringu pri vnosu nevarnih snovi in rastlinskih hranil v tla (Pravilnik o obratovalnem ..., 1997), Pravilnik o obremenjevanju tal z vnašanjem odpadkov (Pravilnik o obremenjevanju ..., 2003), Nacionalni program varstva okolja (Program ukrepov na področju varstva tal) (Nacionalni program ..., 1999) in Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja 2005-2012 (Resolucija o nacionalnem ..., 2006). Nekatere evropske države (npr. Nemčija) v svoji zakonodaji opozorilne in mejne vrednosti kovin v tleh predpisujejo glede na obliko rabe tal (otroška igrišča, parki in površine za rekreacijo, stanovanska območja, industrijske cone), pa tudi glede na potencialno pot vnosa kovin (oralni vnos pri ljudeh, privzem v rastline, spiranje v podtalnico). Poleg celokupne koncentracije PSK (izluževanje z raztopino *aqua regia*) njihova zakonodaja vključuje tudi ekstrakcijo z amonijevim nitratom, kar jim omogoča določanje vsebnosti kovin v tleh za vsak, točno določen primer (npr. vnos Cd, Pb in talija v rastline na kmetijskih zemljiščih in v zelenjavnih vrtovih) (Federal Soil Protection ..., 1999).

Zaradi nevarnosti, ki jih s PSK onesnažena tla povzročajo na človekovo zdravje in okolje, je onesnažena tla potrebno remedirati, s čimer mobilizirane, škodljive PSK pretvorimo v nemobilne, varne oblike, ali jih popolnoma odstranimo iz tal. Izbera ustrezne metode remediacije je odvisna od značilnosti onesnaženega območja, koncentracije in vrste onesnažila, ki jih želimo odstraniti ter končne uporabe onesnaženega območja oz. zahtevane stopnje očiščenja tal, ki jo določa zakonodaja in raba tal (Mulligan in sod., 2001; Leštan, 2002).

Remediacijske metode glede na lokacijo delovanja delimo v dve skupini- v t. i. *in situ* metode (npr. pokrivanje tal, solidifikacija, stabilizacija, fitoekstrakcija, izpiranje tal) in *ex situ* metode (izkop in deponiranje tal, pranje tal, izpiranje tal, elektrokinetična remediacija). V urbanem okolju, kjer je potrebna hitra remediacija onesnaženega območja, so *ex situ* tehnike bolj primerne, predvsem zaradi preprečevanja širjenja onesnaženja, medtem ko je v primeru remediacije velikih površin (npr. v okolici rudnika) ustrezniji *in situ* pristop (Dermont in sod., 2008). Običajno se z *in situ* remediacijo dosežejo trije cilji: zmanjšanje spiranja kovin, njihove strupenosti ter spodbujanje rasti vegetacije (Martin in Ruby, 2004).

Konvencionalne remediacijske tehnike, med katere uvrščamo izkopavanje, transport in zamenjavo onesnaženih tal z neonesnaženimi tlemi, so učinkovite, ampak ekonomsko zelo zahtevne (Lee in sod., 2009) in lahko negativno vplivajo na strukturo tal in talno biologijo

(Friesl-Hanl in sod., 2009). PSK je iz tal mogoče odstraniti tudi s pranjem z različnimi kelatnimi ligandi (npr. etilendiamintetraocetno kislino, EDTA), ali s kombinacijo kislin in kelatnih ligandov. Odstranitev PSK iz tal s pomočjo akumulacije v rastlinah omogoča fitoremediacijo; elektrokinetične metode odstranjujejo PSK po principu električnega polja, hidrocikloni delujejo na podlagi mehaničnega ločevanja onesnaženih delcev; flotacija in gravimetrijsko posedanje pa delujeta v sistemih trdna faza - tekočina. Pirometalurški procesi temeljijo na uporabi visokih temperatur, pri čemer onesnažila izhlapijo in jih je posledično mogoče odstraniti ali imobilizirati. Biokemične metode zajemajo ekstrahiranje kovin z mikrobiološkimi procesi, bioizpiranje ter oksidacijske in reduksijske reakcije (Mulligan in sod., 2001). V določenih primerih je bolj kot odstranjevanje PSK iz tal primernejša njihova imobilizacija, kar dosežemo s prekrivanjem onesnaženih tal z asfaltom, drugim nepropustnim materialom ali s prekrivanjem onesnažene lokacije z neonesnaženimi tlemi. Vitrifikacija zajema imobilizacijo PSK s segrevanjem onesnaženih tal do 2000 °C (Leštan in sod., 2008). Solidifikacija imobilizira PSK z dodajanjem aditivov (npr. cement), ki omogočajo vezavo PSK v trdno matriko. Pri fitostabilizaciji rastline proizvajajo kemikske spojine in na ta način imobilizirajo PSK v območju stika korenine/tla (Kumpiene in sod., 2008).

Stabilizacija temelji na dodajanju stabilizanta onesnaženim tlem oz. aditiva, ki bo vplival na prehod PSK iz mobilnih v fizikalno-kemijsko stabilne kovine. Na ta način se reducira njihova mobilnost in tveganje, ki ga predstavljajo za okolje (Bade in sod., 2012), brez nastanka stranskih produktov (Lee in sod., 2011a). Stabilizacija oz. imobilizacija PSK v tleh je zelo obetavna remediacijska tehnika, predvsem zaradi svoje enostavnosti in visoke učinkovitosti, *in situ* izvedbe in, kar je zelo pomembno, nizkih stroškov (Guo in sod., 2006). K znižanju stroškov prispevajo predvsem *in situ* izvedba (Mulligan in sod., 2001), uporaba že obstoječe kmetijske mehanizacije (Friesl-Hanl in sod., 2009) ter uporaba naravnih materialov in odpadnih produktov kot stabilizantov (Guo in sod., 2006). Cena postopka *in situ* stabilizacije znaša od 40-65 \$/m³ in je v primerjavi s stroški konvencionalnih tehnik remediacije tal (izkop/deponiranja tal) nižja (cene se gibljejo od 300-500 \$/m³), nižja je tudi od stroškov solidifikacije tal (128-248 \$/m³) in izrazito ugodnejša od postopka pranja tal (358-1717 \$/m³) (Dermont in sod., 2008). Sama tehnologija stabilizacije je še vedno v fazi raziskovanja in razvoja, tako v Evropi kot v ZDA (Dermont in sod., 2008).

Stabilizacija je najbolj primerna za remediacijo velikih površin, kjer so onesnažila prisotna predvsem v površinskem sloju (Mulligan in sod., 2001). Stabilizacija se je prvotno začela uporabljati za čiščenje onesnaženih voda sredi prejšnjega stoletja in od takrat dalje se intenzivno uporablja tako za vode kot za tla (Guo in sod., 2006). Za stabilizacijo kovin so na voljo številni, tudi testirani aditivi- stabilizanti (Preglednica 1). Med njimi so tako kmetijski (apno (Geebelen in sod., 2003), fosfati (Basta in McGowen, 2004) in organske

snovi (Brown in sod., 2004)) kot tudi industrijski produkti (npr. zeolit (Oste in sod., 2002)) in rdeče blato (Lombi in sod., 2002; Gray in sod., 2006). Da bi se aditivi lahko uporabljali kot stabilizanti v procesih remediacije tal, morajo imeti visoko sorptivno sposobnost in ne smejo škoditi strukturi tal, rodovitnosti in dostopnosti hranil (Usman in sod., 2005).

Preglednica 1: Pregled objavljenih učinkovitosti aditiva (Kumpiene in sod., 2008: 222)

Table 1: Summary of the reported efficiencies of the amendments (Kumpiene in sod., 2008: 222)

Aditiv	As	Cu	Cr	Zn	Pb
Fosfatni material	-	+		+	++
Organska snov	+/-	+/-	++	+/-	+/-
Glina	-	+	-	++	+/-
Alkalni material	++	+/-	++	+	+
Fe oksidi	++	+/-	++	+	+
Mn oksidi	++		-		

(++) = zelo dobro, (+) = zadovoljivo dobro, (+/-) = različni rezultati kažejo majhno izboljšanje ali bodisi pozitivne kot tudi negativne vplive na mobilnost elementa, (-) = izogibati se teh aditivov, zaradi očitnega negativnega vpliva na spiranje elementov, () = niso najdeni v literaturi.

(++) = very good, (+) = satisfactory to good, (+/-) = showing weak improvements or both positive and negative effects on the element mobility, (-) = avoidable due to obvious negative effects on the element leaching, () = not found in the reviewed literature.

Z imobilizacijo PSK zmanjšamo potencial za spiranje kovin, njihovo biodostopnost in prehod v prehranjevalno verigo preko naslednjih mehanizmov: kationske izmenjave, povečane adsorbcije kovin, precipitacije kovin kot fosfatov, hidroksidov ali karbonatov in ustvarjanja netopnih kovinsko-organskih kompleksov v primeru uporabe organskih aditivov (Bolan in sod., 2003). Celokupna koncentracija kovin v tleh sicer ostane ista, spremeni se le oblika PSK. Mobilne PSK postajajo nemobilne in zato manj škodljive ali celo povsem neškodljive. Učinkovitost aditivov za imobilizacijo kovin je odvisna predvsem od fizikalnih in kemijskih lastnosti kovin ter aditivov/stabilizantov, kjer mobilnost kationov predstavlja eno izmed najpomembnejših specifičnih kemijskih lastnosti, saj ta določa usodo kovin v okolju ter njihovo strupenost. Mobilnost kovin je zelo različna, zato je zelo težko najti aditiv, ki bo lahko stabiliziral več kovin hkrati. V uporabi so sicer tudi aditivi, ki so sposobni imobilizirati več kovin hkrati, na podlagi dosedanjih raziskav pa lahko ugotovimo, kateri so ti aditivi in v kolikšnih količinah jih moramo uporabljati (Guo in sod., 2006).

V literaturi najdemo številne raziskave na temo biodostopnosti in biodosegljivosti PSK, ob tem pa tudi različne definicije teh dveh pojmov. Po zaužitju tal se v prebavnem traktu onesnažila delno ali popolnoma sprostijo. Del onesnažil, ki se iz tal izloči v prebavne

sokove, določa biodostopna frakcija. Biodostopna frakcija se prenese preko črevesnega epitelija v portalno veno ali limfo in lahko se zgodi, da se del onesnažila metabolizira in izloči v črevesnem epiteliju ali razgradi v jetrih (predsistemska presnova). Frakcija onesnažila, imenovana biodosegljiva koncentracija, preide skozi jetra nespremenjena ter končno prispe v krvni obtok, kjer postane strupena za organe in tkiva. Oralno biodosegljivost onesnažil iz tal torej pogojujejo funkcija biodostopnosti, transporta skozi črevesni epitelij in predsistemske presnove (Oomen in sod., 2003). Biodosegljiva frakcija je manjša od biodostopne in se lahko neposredno meri le v živem organizmu (Lee in sod., 2009). Vse pogosteje so za preučevanje biodostopnosti v uporabi t.i. *in vitro* raziskave, ki določajo biodostopnost PSK za oceno in napovedovanje biodosegljivosti. Te metode so cenovno ugodne, enostavne, hitre, ponovljive in etično sprejemljive (Patinha in sod., 2012). Z biodostopno koncentracijo PSK bomo označili koncentracijo PSK, ki jo organizmi potencialno lahko privzamejo in ki imajo posledično vpliv na biološki material.

Dosedanje raziskave so bile osredotočene predvsem na določanje vpliva različnih anorganskih aditivov na zmanjšanje biodostopnosti PSK v tleh (kot primarne ocene za učinkovitost remediacije tal), medtem ko je vpliv teh aditivov na kakovost tal in funkcionalno obnavljanje šele v zadnjem času postalo zanimivo. Za oceno strupenega vpliva onesnažila in določanje značilnosti onesnaženega področja ne zadošča zgolj poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti tal, saj se s tem ne zajemajo niti vplivi kemijskih spojin na organizme, niti interakcije med onesnažilom, talno matriko in bioto (Lee in sod., 2009). Kakovost tal je definirana kot sposobnost tal za izpolnjevanje njegovih edinstvenih ekosistemskih funkcij (Wang in sod., 2006), ki so bistvenega pomena za ljudi in okolje. Te funkcije je zelo težko neposredno meriti, zato jih lahko zgolj ocenimo z pomočjo t. i. indikatorjev kakovosti. Encimi veljajo za ene najbolj občutljivih indikatorjev kakovosti (biološki indikatorji), saj se na spremembe v ravnanju s tlemi odzovejo skoraj hipoma (Soil quality ..., 2011). Mikrobnna aktivnost v tleh ima zelo pomembno vlogo pri razgradnji organskih snovi in kroženju elementov in na ta način vpliva na vse organizme v tleh (Garau in sod., 2007). PSK lahko vplivajo na mikrobnno oz. encimsko aktivnost in jo lahko pospešijo ali celo inhibirajo (Kandeler in sod., 1996; Zhang in sod., 2010). Na podlagi tega pri monitoringu funkcionalne degradacije tal onesnaženih s PSK ter obnove in izboljšanja določenih funkcij tal po remediaciji poleg kemijskih in fizikalnih lastnosti tal uporabimo tudi meritve mikrobnne oz. encimske aktivnosti (Wang in sod., 2006; Garau in sod., 2007; Lee in sod., 2009). S takšnim pristopom lahko ocenimo vpliv PSK na naravne ekosisteme (Zhang in sod., 2010).

Po *in situ* uporabi aditivov za stabilizacijo PSK, začnejo v remediranih tleh delovati različni živi in neživi okoljski dejavniki, ki sčasoma lahko spremenijo lastnosti tal in onesnažil ter na ta način zmanjšajo učinek imobilizacije PSK. Pri tem lahko pride do prehoda imobiliziranih PSK v mobilnejše in bolj biodostopne oblike. Dosedanje raziskave

so bistven poudarek namenjale simuliranju vpliva neživih okoljskih dejavnikov v stabiliziranih tleh, npr. temperaturne spremembe (Schrek in sod., 2011) in redoks cikli (Contin in sod., 2007). Tla je pri izdelavi ocene tveganja potrebno obravnavati kot dinamičen sistem, kjer talna biota vpliva na distribucijo, mobilnost in posledično biodostopnost PSK (Sizmur in sod., 2011a). Deževniki, upravičeno imenovani ekosistemski inženirji, predstavljajo v tleh do 80 % skupne biomase talne faune (Kabata-Pendias, 2001) in so zelo pomemben člen pri razgradnji organske snovi in kroženju nutrientov, zato so zelo primerni kot indikatorski organizmi za oceno biološkega vpliva onesnaževalcev tal (Sizmur in Hodson, 2009). Deževniki lahko pozitivno vplivajo na degradirana tla (Butt, 1999), vključno z vplivom na mikrobne populacije v tleh, njihovo aktivnost (McLean in sod., 2006) in posledično na encimsko aktivnost v tleh (Zhang in sod., 2010). Torej bi lahko pričakovali, da prisotnost deževnikov v tleh preprečuje funkcionalno degradacijo onesnaženih tal in spodbuja okrevanje in obnavljanje tal po remediaciji z metodo stabilizacije.

Rudarjenje in talilniški procesi nedvomno predstavljajo visoko tveganje za onesnaženje tal s PSK. Disperzijo PSK v zraku lahko zaznamo tudi nekaj kilometrov od emisijskega vira (Adriano, 2004). Takšna tla so bila tudi predmet naših raziskav, preučevali smo tla iz Podkloštra na avstrijskem Koroškem ter tla v Mežiški dolini.

Cilj raziskovalnega dela je celovita ocena učinkovitosti imobilizacije PSK v onesnaženih tleh po dodatku stabilizantov: hidroksiapatita, Slovakita (anorganske mešanice dolomita, diatomita, smektita, bazaltnega tufa, bentonita, alginita in zeolita) in kalcijevega polisulfida. Končni cilj raziskave je preveriti možnost vrnitev remediranih tal v naravno okolje, glede na frakcjonacijo in biodostopnost kovin in vpliva remediacijskih postopkov na kakovost tal in ohranitev (obnovitev) talnih funkcij. Poskušali smo izbrati čim bolj primerne encimske teste ter kemijske ekstrakcije za monitoring vpliva aditiva na tla onesnažena s PSK.

Cilj raziskav je bil tudi oceniti dolgoročni učinek stabilizacije in sicer vpliv deževnikov iz dveh različnih ekoloških skupin: *Lumbricus terrestris* in *Dendrobaena veneta* kot modelnih bioloških dejavnikov okolja na kakovost in lastnosti tal ter prehodnost PSK v mobilnejše in bolj biološko dostopne oblike, kar bi zmanjšalo končni učinek remediacije. Učinkovitost stabilizacije smo skušali izboljšati s povečanjem kemijske dostopnosti PSK za stabilizante po dodatku biološko razgradljivega liganda tri-natrij-[S,S]-etilendiamindisukcinata v tla. Stabilizacijo kovin smo ocenili ne le prek vpliva na mobilnost in biodostopnost PSK ampak tudi s stališča oralne biodostopnosti.

1.1 HIPOTEZE

Naše hipoteze so:

- I. Stabilizacija tal z dodatkom stabilizantov hidroksiapatita in Slovakita bo poleg zmanjšanja mobilnosti in biodostopnosti PSK vplivala tudi na funkcioniranje tal.
- II. Vpliv deževnikov kot živih dejavnikov okolja bo vplival na dolgoročni učinek stabilizacije tal.
- III. Končni učinek stabilizacije je možno izboljšati z dodatkom biološko razgradljivega liganda tri-natrij-[S,S]-etilendiamindisukcinata (Na_3EDDS) v tla.

1.2 PRIČAKOVANI REZULTATI IN PRISPEVEK DISERTACIJE K RAZVOJU ZNANOSTI

Z našim delom želimo raziskati vpliv različnih aditivov (stabilizantov) na biodostopnost posameznih PSK ter oceniti njihov vpliv na funkcionalnost oz. obnovitev funkcij tal in na njihovo kakovost. V okviru doktorske raziskave zbrani in ocenjeni encimski testi in kemijske ekstrakcije za monitoring vpliva aditivov na onesnažena tla bodo prispevali k dopolnitvi in izboljšanju zakonodaje s tega področja, ki še vedno temelji na določanju celokupnih koncentracij kovin. Ovrednotili bomo vpliv pedofavne (deževnikov kot modelnih organizmov z največjim vplivom na lastnosti tal) na biodostopnost Pb, Zn, Cu in Cd pred stabilizacijo onesnaženih tal in po njej. Pričakujemo, da se bo dostopnost in porazdeljenost Pb, Zn, Cu in Cd v tleh zaradi delovanja deževnikov spremenila. Ocenili bomo tudi vpliv deževnikov na funkcionalno obnovitev tal po remediaciji tal z metodo stabilizacije. Z uporabo različnih vrst deževnikov bomo upoštevali dejavnik vrstne raznolikosti, ki je prisotna v naravi ter tako dobili bolj realen vpogled v dogajanje v tleh po remediaciji.

Onesnažila v tleh povzročajo kronična obolenja ljudi, zmanjšujejo rabo kmetijskih zemljišč (zaradi upoštevanja okoljske zakonodaje), onesnažene podtalnice in zmanjšane biodiverzitete ekosistema. Remediacija je tako bistvenega pomena za zdravje ljudi in okolja. V doktorskem delu bomo stabilizacijo tal obravnavali s širšega vidika ter poudarili pomen raziskav, ki omogočajo napovedovanje potencialnih nevarnosti onesnaženih tal za okolje in zdravje ljudi.

2 PREGLED OBJAV

Znanstvena literatura s področja stabilizacije tal je obširna; največ objav zajema področje raziskovanja učinkovitosti različnih aditivov pri stabilizaciji PSK, njihov vpliv na mobilnost in biodostopnost ter privzem PSK v rastline.

2.1 UPORABA RAZLIČNIH ADITIVOV ZA STABILIZACIJO TAL

2.1.1. Alumosilikati

Naravni in sintetični alumosilikati (glineni minerali, zeoliti) ter fosfati sodijo med aditive, ki lahko uspešno imobilizirajo PSK v tleh. Zeolit je alkalen, porozen alumosilikat z negativnim nabojem. Učinkovitost izmenjave kationov pogojujeta mikroporoznosti ter izmenjevalna kapaciteta zeolita; medsebojno se zeoliti razlikujejo predvsem v poreklu (Shi in sod., 2009; Yamada in sod., 2011). Zeoliti zmanjšujejo mobilnost kovin v onesnaženih tleh s spremjanjem lastnosti tal; (1) dvig pH vrednosti lahko spodbudi sorpcijo kovin na površino talnih delcev, pri čemer se slednje kemijsko imobilizirajo in (2) na povečanje zadrževanja PSK vpliva kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) zeolita, neodvisno od pH vrednosti (Li in sod., 2009). Prednost zeolitov pred drugimi aditivi pri remediaciji tal onesnaženih s PSK je, da neagresivno uravnavajo pH vrednost in dejstvo, da njihovo dodajanje ne povzroča vnosa dodatnih onesnažil (Shi in sod., 2009). Glineni minerali imajo zaradi svoje velike specifične površine velik potencial za imobilizacijo PSK; kaolinit ima specifično površino $15\text{-}20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, montmorijonit pa $280\text{-}500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (Hooda, 2010). Znano je, da CEC glinenih mineralov pada v vrstnem redu: montmorijonit, vermekulit > ilit, klorit > kaolinit (Kabata- Pendias, 2001).

2.1.2. Fosfatni aditivi

Za imobilizacijo PSK v onesnaženih tleh se uporabljam različni naravni in sintetični, tako topni kot netopni P aditivi (apatit in hidroksiapatit (HA), fosfatni kamen (PR), topna fosfatna gnojila kot so monoamonijski fosfat, diamonijski fosfat (DAP), fosforna kislina ipd.) (Miretzky in Fernandez- Cirelli, 2008). Osnovni mehanizem imobilizacije PSK s fosfatnimi minerali vključuje: (a) ionsko izmenjavo, (b) kompleksiranje na površini, (c) raztopljanje izvirnih fosfatnih mineralov in obarjanje novih s PSK ter (d) zamenjavo kalcija v fosfatih z drugimi kovinami preko procesa rekristalizacije (ko-precipitacije) (Mignardi in sod., 2012).

Dodajanje fosfatnih aditivov v s PSK onesnažena tla povzroča izobarjanje dostopnih kovin kot netopnih fosfatov (stabilnost nekaterih fosfatov je prikazana v Preglednici 2). Naravno prisotne PSK (Pb, Zn, Cu in Cd) so običajno tudi v slabo topnih oblikah, predvsem sulfida

(Kabata-Pendias, 2001); v oksidativnih pogojih iz sulfida svinca nastajajo sulfati, karbonati, fosfati (Hettiarachchi and Pierzynski, 2004); pogosto se baker in kadmij nahajata v obliki karbonatov v tleh (Kabata-Pendias, 2001). Fosfati so veliko stabilnejše spojine PSK kot sulfati oz. karbonati (Preglednica 2).

Preglednica 2: Termodinamične konstante topnosti (oz. topnostni produkti K_{sp}) za določene spojine Pb, Zn, Cu in Cd

Table 2: Thermodynamic dissolution constants (i.e. solubility product constants, K_{sp}) of respective Pb, Zn, Cu and Cd compounds

Mineral	Formula	Topnostni produkt (Log K _{sp})
Octavite	CdCO ₃	-11,3 ^a
Kadmijev fosfat	Cd ₃ (PO ₄) ₂	-38,1 ^a
Grinokit	CdS	-27 ^c
Bakrov fosfat	Cu ₃ (PO ₄) ₂	-36,8 ^c
Kovelin	CuS	-36,1 ^c
Svinčev klorid	PbCl ₂	-4,8 ^c
Anglezit	PbSO ₄	-7,7 ^a
Ceruzit	PbCO ₃	-12,8 ^a
Svinčev fosfat	PbHPO ₄	-11,4 ^a
Pb-hidroksipiromorfit	Pb ₅ (PO ₄) ₃ OH	-76,8 ^a
Pb-hloropiromorfit	Pb ₅ (PO ₄) ₃ Cl	-84,4 ^a
Galenit	PbS	-27,5 ^b
Smitsonit	ZnCO ₃	-9,9 ^a
Zn-piromorfit	Zn ₅ (PO ₄) ₃ OH	-63,1 ^a
Cinkov fosfat	Zn ₃ (PO ₄) ₂	-35,3 ^d
Sfalerit	ZnS	-22,5 ^c

^a Basta in McGowen, 2004

^b Ruby in sod., 1994

^c Solubility ..., 2003

^d PIMS ... 2013

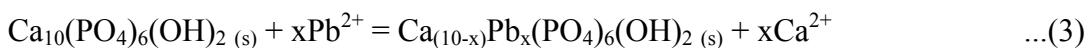
Pri stabilizaciji tal, onesnaženih s Pb, s fosfatnimi aditivi prihaja do porasta količine Pb v rezidualni frakciji kot posledica nastanka netopnega piromorfta (HP; Pb₅(PO₄)₃X, kjer je X= F, Cl, Br, OH). Apatit, Ca₁₀(PO₄)₆(OH, F, Cl)₂, je aditiv, ki omogoča stabilizacijo PSK, ker je njegova kristalna struktura tolerantna za številne ionske substitucije in popolne zamenjave ionov Ca²⁺ s Ba²⁺, Sr²⁺, Cd²⁺ in Pb²⁺ in P⁵⁺ s V⁵⁺, Cr⁵⁺ in As⁵. Hidroksiapatit (HA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) ima veliko sorptivno sposobnost, slabo topnost pri bazičnem in nevtralnem pH, stabilen je v redukcijskih ter oksidativnih pogojih, lahko dostopen in cenovno ugoden (Srinivasan in sod., 2006). Imobilizacija Pb s hidroksiapatitom poteka preko dveh različnih mehanizmov:

(I) raztpljanja HAp (1), čemur sledi reakcija fosfatov s raztopljenim Pb in precipitacija hidroksipiromorfta (2):





(II) ionske izmenjave Pb^{2+} s Ca^{2+} na kristalni rešetki hidroksiapatita (3):

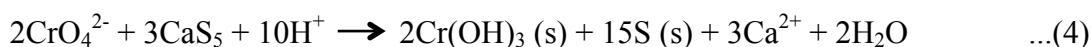


Oba mehanizma sta močno odvisna od pH vrednosti (Miretzky in Fernandez- Cirelli, 2008). Mignardi in sod. (2012) poudarjajo, da so pri slabo topnih fosfatnih aditivih (kot je hidroksiapatit, z vrednostjo $K_{\text{sp}} 1 \times 10^{-100}$) bolj dominatni procesi površinskega kompleksiranja in ionske izmenjave kot raztpljanje in precipitacija ravno zaradi slabe topnosti HA.

Laperche in sod. (1996) so v svojih raziskavah tudi potrdili, da je apatit odgovoren za nastanek piromorfita v s Pb onesnaženih tleh. Učinkovitost stabilizacije s hidroksiapatitom so preverjali na mineralih, ki vsebujejo Pb, in na s Pb onesnaženih tleh. Fizikalno prisotnost HP so dokazali z uporabo kombinacije dveh separacijskih tehnik (na podlagi velikosti delcev in gostote frakcije tal) in meritvami s pomočjo odklanjanja X žarkov (XRD) ter s presevnim elektronskim mikroskopom (SEM). Dokazali so, da je proces nastanka HP oz. učinkovitost imobilizacije odvisen od pH vrednosti, da je najbolj učinkovit pri pH 5 in da je pri $\text{pH} < 8$ nastanek HP odvisen bolj od kinetičnih kot termodinamičnih parametrov. Ruby in sod. (1994) so opisali nastajanje Pb-fosfata v procesu preperevanja galenita na onesnaženih tleh, kjer je 11 let potekalo njegovo skladiščenje. Zaradi prisotnosti fosfatov v tleh se je v 13 letih kar 46 % začetnega PbS spremenilo v Pb-fosfat. Proses je potekal v nekontroliranih okoljskih pogojih, ta procent bi bil še izrazitejši, če bi bili pogoji optimizirani.

2.1.3. Kalcijev polisulfid (CaS_x)

Kalcijev polisulfid (CaS_x) so sprva uporabljali za redukcijo in odstranjevanje PSK iz odpadnih vod. Kasneje so ga pričeli uporabljati pri določenih *in situ* remediacijah (Fruchter, 2002). Prednosti CaS_x pred drugimi sredstvi za redukcijo so povišana stabilnost in odpornost v podpovršinskem okolju, odsotnost tekmovalnih procesov, ki vključujejo nastajanje netopnih oborin in okoljska neoporečnost (Graham in sod., 2006). CaS_5 so uporabljali za čiščenje podtalnice, onesnažene s Cr, in sicer z redukcijo mobilnega in topnega Cr(VI) v netopni in netoksični Cr(III), ki se je oboril kot kromov hidroksid. Kalcijev polisulfid je uporabljen tudi v postopku *in situ* geokemijske fiksacije Cr(VI) v tleh in podtalnici v aluvialnih sedimentih. Cr(VI), ki je običajno prisoten kot kromat CrO_4^{2-} , se reducira s pomočjo CaS_5 v relativno netopni Cr(III) in seobarja iz raztopine ter premesti v tla (enačba 4):



CaS_5 se uporablja za remediacijo ostankov, ki nastanejo pri predelavi kromove rude (COPR). Graham in sod. (2006) so CaS_x kot prvi uporabili pri remediaciji podtalnice in alkalnega COPR v seriji laboratorijskih poskusov. V podtalnici so učinkovito reducirali Cr(VI), kar je potrdila alkalna razgradnja, ki je iz trdne faze sprostila le majhno količino Cr(VI) - približno 0,1-0,2 % začetnega Cr(VI). V šaržnem poskusu se je CaS_x (tekoči), dodan trdnemu Cr(VI) v razmerju 5:1 dokazal kot učinkovit pri redukciji Cr(VI) v pH območju od 8-13, pri čemer Cr(VI) niso zaznali niti v tekoči niti v rezidualni trdni fazi. Pri pilotnem poskusu so Wazne in sod. (2007a) uporabili CaS_5 v stehiometrijskem razmerju 2. TCLP in alkalna razgradnja so podali sprejemljive rezultate, medtem ko je XANES (elektrokemijska metoda) pokazal, da redukcija Cr(VI) ni končana, X- difrakcija pa da je Cr(VI) delno zajet v Cr(VI)-hidrokalumitu. Wazne in sod. (2007b) so v šaržnem poskusu dokazali, da je dodatek CaS_x v stehiometrijskem razmerju 5 zadosten, pri čemer je nujna kontrola pH vrednosti, ki ne sme preseči 9,27, saj sicer vodi do nastajanja mineral etringit (kalcijev sulfoaluminat).

Dosedaj kalcijevega polisulfida niso uporabili za imobilizacijo PSK (Pb, Zn, Cu, Cd) v tleh onesnaženih zaradi rudarjenja in topilniške dejavnosti. Kovine bi se po dodatku kalcijevega polisulfida vezale na ligand po principu reakcije:



Messalimov in sod. (2007) navajajo, da se CaS_x zaradi svojih potrjenih fungicidnih učinkov lahko uporablja za varovanje kultiviranih rastlin in gozdnih nasadov.

2.2 VPLIV STABILIZACIJE NA BIODOSTOPNOST PSK

Tla, onesnažena s PSK v koncentracijah, ki presegajo zakonsko predpisane mejne vrednosti, predstavljajo veliko tveganje za okolje. V raziskavah je tako primerneje uporabljati naravno onesnažena tla kot pa tla, onesnažena v laboratorijskih pogojih, saj se PSK v teh dveh primerih zaradi različnega zadrževalnega časa PSK v tleh različno obnašajo (Sizmur in Hodson, 2009).

V dosedanjih raziskavah se je večinoma raziskoval vpliv različnih fosfatnih aditivov na biodostopnost PSK; uporabljeni so sledeči aditivi: apatit in hidroksiapatit (HA) (Ma in sod., 1993; Chen in sod., 2007; Mignardi in sod., 2012; Zupančič in sod., 2012), slabo topni fosfatni kamen (PR) (Chen in sod., 2007; Basta in McGowen, 2004; Mignardi in sod., 2012), PR v kombinaciji s bakterijami (Park in sod., 2012), PR in TSP skupaj s Mn oksidom (Hettiarachchi in sod., 2000), fosfatno gnojilo diamonijev fosfat (DAP) (Basta in

McGowen, 2004; Chen in sod., 2007). Imobilizacijo PSK z uporabo zeolita so raziskovali Alpaslan in Yukselen (2001), Madrid in sod. (2006), Querol in sod. (2006), Usman in sod. (2006); učinkovitost bentonita na imobilizacijo PSK pa Usman in sod. (2005, 2006), Fleri in Whetstone (2007).

Chen in sod. (2007) so v svoji raziskavi tlom dodajali naravni HA, PR, trojen superfosfat (TSP) in DAP; tla so bila različno onesnažena: T0 (tla brez dodanih PSK), T1 (Cd/Pb/Zn: 0,6/100/66 mg kg⁻¹) in T2 (Cd/Pb/Zn: 1,5/300/200 mg kg⁻¹). Vsak fosfatni aditiv je bil dodan v količini 2500 mg P₂O₅ na kg tal. Fosfatni aditivi so se izkazali kot učinkoviti pri imobilizaciji Pb, Zn in Cd, najbolj očitni rezultati so bili zaradi formacije piromorftita pri Pb, kar je dokazano tudi glede na podatke, dobljene s pomočjo SEM. Tudi Zn in Cd sta bila v nižjih koncentracijah prisotna v koreninah in mladikah kitajske repe zaradi formacije ali koprecipitacije netopnih fosfatov. S pomočjo sekvenčne ekstrakcije so ugotovili, da se PSK prenesti iz nerezidualnih v rezidualne frakcije, med njimi se Pb prenesti najučinkoviteje. Zanimivo je, da je DAP vplival na znižanje pH vrednosti in bi tako lahko povzročil povišano izpiranje PSK iz tal. Učinkovitost TSP, PR in njihove kombinacije z Mn oksidom na imobilizacijo Pb so preučevali Hettiarachchi in sod. (2000). Rezultati PBET testa in mineraloške spremembe, opažene s XRD, so pokazali, da so bile stabilizacije učinkovite, in sicer najučinkovitejše pri kombinaciji P aditiva z Mn oksidom (slednje so preverili s TCLP testom). Pri tem predstavlja adsorpcija poleg formacije netopnih Pb spojin še en pomemben mehanizem v kontroli biodostopnosti Pb v tleh. Ma in sod. (1993) so opisali kako umetni HA in tri različne vrste naravnega apatita (NA) v reakcijah s vodotopnim Pb, izmenjevalnimi smolami s Pb in tlemi, onesnaženimi s Pb, reducirajo koncentracije vodotopnega Pb. HA je učinkovito imobiliziral Pb v vseh treh primerih, reakcije so bile zelo hitre (okrog 30 min). Apatit je uspešno imobiliziral Pb iz vodne raztopine, pri čemer je nastajal hidroksiromorfit (HP), v kolikor je HA ali vodotopni P stopil v reakcijo z vodotopnim Pb pri pH vrednostih 3, 4, 5, 6 in 7; nastali HP je vselej imel drugačno sestavo. Učinkovitost P aditivov na zmanjšanje vodotopnega Pb je proporcionalna njegovi topnosti in ni odvisna od velikosti zunanje površine aditiva. Apatit poskrbi za imobilizacijo Pb s P ter Pb zamenja s Ca ioni.

Učinkovito imobilizacijo PSK je mogoče doseči s pravilno kontrolo pH. Pri dovolj nizkih pH vrednostih v tleh lahko pride do istočasnega raztopljanja fosfatov in Pb ter do nastajanja piromorftita. Znano je, da do popolnega raztopljanja HA prihaja pri pH 2-5, ko se celoten Pb spremeni v kloropiromorfit, medtem ko sorpcija poteka pri pH 6-7, saj se z zvišanjem pH površina apatita negativno nabije in omogoči vezavo Pb²⁺ na površino, od koder se nato obori kot kloropiromorfit ter na ta način prepreči nadaljnje raztopljanje. Nizek pH lahko negativno vpliva na talne procese, saj lahko povzroči več spranega P. Zaradi tega je pri izbiri optimalne pH vrednosti za postopek stabilizacije tal nujno upoštevati stranske učinke kislih pogojev v tleh (Zupančič in sod., 2012). Dodatek

fosfatnega aditiva ima lahko tudi dvojni pozitivni učinek- lahko vodi do imobilizacije PSK (Cu) in obenem pospeši rast rastlin (Negim in sod., 2012).

Imobilizacija Pb z uporabo P aditivov je sicer zelo učinkovita, vendar se pri tem pojavljajo tudi potencialne nevarnosti za eutrofikacijo površinskih vod zaradi izpiranja P vanje iz tal in možnega mobiliziranja As v tleh zaradi tekmovalnosti arsenata in fosfata pri adsorpciji na talne delce.

Basta in McGowen (2004) sta primerjala učinkovitost apna (170 g kg^{-1}), PR ($60 \text{ in } 180 \text{ g kg}^{-1}$) in DAP ($10 \text{ in } 90 \text{ g kg}^{-1}$) ter učinkovitosti reaktivne ovire PR (180 g kg^{-1}) na znižanje transporta PSK v onesnaženih tleh poleg topilnice. DAP (10 g kg^{-1}) je bil najučinkovitejši, ker ni imobiliziral zgolj Pb, ampak je tudi značilno zmanjšal mobilnost in topnost Cd in Zn; Cd- fosfati, Pb- hidroksipiromorfit in Zn- fosfatni minerali so pogojevali topnost in posledično tudi mobilnost kovin. Obenem je prišlo tudi do povečane količine sproščenega As in spranega P. Park in sod. (2012) so preučevali vpliv PR ob dodatku bakterij, ki raztapljajo fosfate (PSB; *Enterobacter* sp.) in topnega P na imobilizacijo Pb v umetno onesnaženih tleh s $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ raztopino s koncentracijo $2\,000 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ tal. Uporaba topnih in netopnih P aditivov je povzročila zmanjšanje fitodostopnega Pb (ekstrakcija s amonijevim nitratom) in manjši privzem v sončnico (*Helianthus annuus*). Prisotnost topnega P je povzročila povišanje koncentracije Pb v talni raztopini, najverjetneje zaradi raztpljanja organskega kompleksa ogljika in Pb. Glede na tveganje, ki ga povzroča dodajanje topnih P aditivov v tla za vodna telesa, ima uporaba PSB bakterij prednost. Mignardi in sod. (2012) so dali prednost slabo topnim P aditivom (HA in PR), saj so v poskusih dokazali uspešnost pri znižanju mobilnosti PSK (Pb, Zn, Cd in Cu - med 84 in 99 %) ter minimalno tveganje za eutrofikacijo površinskih vod. Pri pH 5 je postopek trajal 20 min, mehanizmi imobilizacije pa so bili kompleksiranje PSK na zrna fosforja in delno raztpljanje fosfatnih aditivov ter precipitacija PSK, ki so bili vezani na fosfate. Značilno mobilizacijo As pri imobilizaciji Pb z monokalcijevim fosfatom so opazovali Xenidis in sod. (2010), ta efekt so preprečili s dodajanjem železevega sulfata. Posledično znižanje pH (sa 7,8 na 5,6) je povzročilo mobilizacijo Zn in Cd, da bi se temu izognili, pa so v tla dodali apnenec ali apno.

Usman in sod. (2005) so najprej ugotovili, da Na- in Ca- bentonit zmanjšata mobilnost PSK in povečata biološko aktivnost v tleh (izmerjeno preko respiracije tal in mikrobne biomase). V naslednji raziskavi so Usman in sod. (2006) preučevali učinkovitost Na- in Ca- bentonita ter zeolita v koncentracijah 1 % in 2 % (w/w) na imobilizacijo Zn, Cd, Cu in Ni v tleh, na katera se je 50 let odlagalo blato iz čistilnih naprav. Najprej so na teh tleh sezali pšenico, jo po 7 tednih poželi in po 10 dneh postopek ponovili še dvakrat. Kot najučinkovitejša sta se pri tem izkazala Na- in Ca- bentonit v koncentraciji 2 % (w/w), ki sta v največji meri zmanjšala delež mobilne frakcije PSK v tleh (določene z $1\text{M NH}_4\text{NO}_3$

po prvi in tretji žetvi). Na-bentonit je znižal mobilnost PSK 25-54 %, Ca-bentonit 25-61 %, zeolit pa 9-23 %, pri enakih koncentracijah in v obeh vzorčenjih. Uporabljena Ca- in Na-bentonit sta vsebovala glinene minerale iz smektitne skupine, največ montmorijonita (62-70 %), uporabljen zeolit pa je vseboval 80 % klinoptiolita, 10 % montmorijonita in 5 % feldspata. Znano je, da dodatek zelo majhnih količin bentonita lahko zmanjša prepustnost tal; pri dodatku 0,75 % bentonita se je prepustnost tal znižala za dvakrat (Fleri and Whetstone, 2007). Učinkovitost različnih zeolitov pri stabilizaciji s Pb in zmerno s Cu in Zn onesnaženih ilovnatih tleh so raziskovali tudi Madrid in sod. (2006). Tla so stabilizirali s kislim zeolitom, zeolitom nasičenim z natrijem in Slovakitom v koncentracijah 1 % in 5 % (w/w) ter jih inkubirali 1 leto. Na podlagi rezultatov koncentracij mobilne frakcije PSK (ekstrahirane z EDTA) in pH so sklenili, da je kisl zeolit dolgoročno zelo učinkovit, pri uporabi Slovakita je učinkovitost sčasoma upadla, prav tako tudi učinkovitost zeolita, nasičenega z Na, ki je bila v nekaterih primerih celo zanemarljiva. Querol in sod. (2006) so z uporabo zeolita sintetiziranega iz premogovega pepela, uspešno imobilizirali PSK (Cd, Co, Cu, Ni in Zn) ter dokazali, da je za to odgovoren dvig pH vrednosti, ki favorizira adsorpcijo kovin in nastajanja kovinskih hidroksidov. Alpaslan in Yukselen (2001) so pokazala, da zeolit ni bil učinkovit za imobilizacijo Pb v umetno onesnaženih tleh s Pb (določeno s pomočjo TCLP testa).

2.3 VPLIV STABILIZACIJE NA RASTLINE

Mnogo raziskav je bilo opravljenih na področju vpliva stabilizacije PSK na njihov vnos v rastline ter akumulacijo PSK v rastlinah. Pri tem so uporabljane različne rastline kot tudi različni aditivi za stabilizacijo kovin. Koruza (*Zea mays*) se uporabljala za oceno učinkovitosti fosfatnih aditivov (PR), apna in ciklonskega prahu v imobilizaciji Pb (Geebelen in sod., 2003). Boisson in sod. (1999) so poleg koruze v raziskave vključili še fižol (*Phaseolus vulgaris*) in ocenili vpliv dodajanja HA v tla onesnažena s Pb, Zn, Cu in Cd na rastlinsko rast in akumulacijo PSK, medtem ko so Chlopecka in Adriano (1997) ocenili vpliv apatita in zeolita na vnos Cd in Pb v koruzo in ječmen (*Hordeum vulgare*). Gorčica (*Brassica juncea* L.), ki je zelo odporna na visoke koncentracije PSK, se je uporabljala za oceno učinkovitosti kalium dihidrogenfosfata v stabilizaciji Cd (Bolan in sod., 2003); trava St. Augustine (*Stenotaphrum secundatum*) je bila primerna kot prevladujoča rastlina iz onesnaženega območja za oceno vpliva fosfatnih aditivov (H_3PO_4 , $H_3PO_4 + Ca(H_2PO_4)_2$ in $H_3PO_4 + PR$) na imobilizacijo Pb, Zn in Cu (Cao in sod., 2003); pšenico (*Triticum aestivum*) pa so uporabljali za oceno učinkovitosti zeolita v stabilizaciji Pb in Zn (Chen in sod., 2000). Chen in sod. (2007) so v svoji naslednji raziskavi uporabili rastlino *Brassica campestris* s namenom, da čim bolj ocenijo učinkovitost fosfatnih aditivov (HA, PR, TSP in DAP) v imobilizaciji Pb, Zn in Cd.

Na splošno velja, da stabilizacija s PSK onesnaženih tal s fosfatnimi aditivi povzroči

zmanjšane vnosa PSK v rastline ter poveča njihovo biomaso (Chlopecka in Adriano, 1997; Bolan in sod., 2003; Cao in sod., 2003; Geebelen in sod., 2003; Chen in sod., 2007). Boisson in sod. (1999) so pisali o obnavljanju rastlinske rasti pri dodajanju HA v nižjih koncentracijah; v višjih koncentracijah pa je HA imel zaviralni učinek. Istočasno se je pri nižjih koncentracijah HA koncentracija PSK v listu znižala in je naraščala z uporabo večje količine aditivov. Istemu trendu so sledili esencialni elementi (npr. Mn), kar kaže na povečano nevarnost pomanjkanja hranil pri uporabi visokih koncentracij HA. Dodatek fosfatnih aditivov v Pb onesnaženih tleh je povzročilobarjanje piromorfita na membrano korenin trave St. Augustin, zaradi česar se je koncentracija Pb v koreninah zvišala, medtem ko se je v nadzemnih delih znižala. Park in sod. (2012) so ugotovili, da je dodatek obeh P aditivov povzročil visok porast mase nadzemnih delov in korenin in zmanjšal koncentracijo Pb v nadzemnih delih do 50 %, kar kaže, da z imobilizacijo Pb lahko zmanjšamo njegov fitotoksični učinek. Chen in sod. (2000) so ugotovili, da dodatek zeolita vpliva na imobilizacijo Cd in Pb ter posledično na njun zmanjšan vnos v pšenico in njene nadzemne dele. Učinkovitost zeolita v zmanjšanju koncentracije Pb v užitnih delih rastline (oljne ogrščice) so potrdili Li in sod. (2009) tudi v močno onesnaženih vrtnih tleh ($\geq 1000 \text{ g kg}^{-1}$ Pb).

Učinkovitost imobilizacije PSK je ocenjevana z uporabo različnih ekstrakcijskih testov. Porazdeljenost kovin med različnimi talnimi frakcijami ter prestavljanje kovin iz bolj dostopnih v manj dostopne oz. manj mobilne frakcije po uporabi aditivov so določani s sekvenčno ekstrakcijo (Cao in sod., 2003; Chen in sod., 2007; Li in sod., 2009). Za oceno izmenljivih in fitodostopnih koncentracij PSK so uporabljene ekstrakcije s CaCl_2 (Geebelen in sod., 2003), 0,1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Boisson in sod., 1999; Chen in sod., 2000), amonijevim nitratom (Park in sod., 2012), deionizirano vodo (Chen in sod., 2000); uporabljana so tudi močnejša topila kot 0,05 M EDTA in 0,1 M HCl (Chen in sod., 2000). V raziskavah, kjer je ocenjevana učinkovitost aditiva v imobilizaciji kovin tudi s stališča vnosa kovin v rastline, so uporabljana tako umetno oz. laboratorijsko onesnažena tla (Chlopecka in Adriano, 1997; Bolan in sod., 2003; Chen in sod., 2007), kot tudi tla, dejansko onesnažena s PSK (Boisson in sod., 1999; Chen in sod., 2000; Cao in sod., 2003; Geebelen in sod., 2003; Li in sod., 2009).

2.4 VPLIV STABILIZACIJE NA ORALNO BIODOSTOPNOST PSK

Za določanje oralne biodostopnosti Pb v tleh so v primerih, ko živalske *in vivo* raziskave niso možne, Ruby in sod. (1993) razvili fiziološko zasnovan *in vitro* ekstrakcijski test (PBET), ki posnema delovanje človeškega gastrointestinalnega (GI) trakta (pH v želodcu in črevesju, razmerje tla:raztopina, mešanje v želodcu in ritem praznjenja želodca). Rezultate PBET potrjujejo rezultati *in vivo* testov, ki so v linearni korelaciji z rezultati iz modela na Sprague- Dawley podgani ($r^2 = 0,93$ med *in vitro* in *in vivo* rezultati); na podlagi

slednjega se PBET lahko uporablja za napovedovanje biodostopnosti Pb pri otrocih (Ruby in sod., 1996). Po končani PBET ekstrakciji dobimo dva vzorca- enega iz želodčne in drugega iz črevesne faze; na podlagi izmerjenih vrednosti PSK v teh dveh vzorcih lahko ocenimo, koliko PSK se lahko absorbira iz črevesja v kri.

Najobširnejše raziskana kovina na področju oralne biodostopnosti je nedvomno Pb. Zaužitje talnih delcev predstavlja najnevarnejšo pot vnosa Pb za otroke; Ameriška okoljska agencija ocenjuje, da privzeta vrednost za biodostopnost Pb iz tal znaša kar 30 % (relativna biodostopnost Pb v tleh glede na privzem s hrano in vodo znaša približno 60 %) (US EPA, 1999). Biodostopnost Pb pogujejo predvsem fosfati, oksidi železa, z organsko snovjo in pH, pa tudi pot izpostavljenosti, farmakokinetike organizma in speciacija onesnažila. Meritve biodostopnosti Pb so s poskusi na živalih zelo dolgotrajne in ekonomsko zahtevne (Zia in sod., 2011).

Hettiarachchi in sod. (2000) so dokazali, da se z dodajanjem fosforja znatno zmanjša biodostopnost Pb v primerjavi s kontrolnimi tlemi, ne glede na vir P - tako v želodcu, kot tudi v črevesju. Topni Pb v želodčni in črevesni frakciji nastaja kot posledica interakcije med trdim Pb, P in različnimi komponentami tal (interakcije lahko vključujejo raztopljanje Pb trdnih delcev, desorpcijo Pb z organskih in anorganskih komponent, nastanek različnih Pb trdnih snovi in kompleksov). Ugotovili so tudi da se del P aditiva (PR), ki ni reagiral s Pb, lahko raztopi v želodčni fazi PBET in tako imobilizira Pb, kar je zelo pomembno s stališča vrednotenja učinkovitosti stabilizacije. Čas je imel na biodostopnost Pb zelo majhen vpliv, kar lahko pripisemo reakciji med Pb in P aditivom v prvem mesecu inkubacije, ki se kasneje zelo malo spreminja, ali pa reakciji med Pb in aditivom v želodčni fazi, ki ni odvisna od časa inkubacije. V drugi raziskavi z istega področja so Hettiarachchi in sod. (2001) ugotovili, da je zmanjšanje biodostopnega Pb (PBET) sorazmerno povezan s količino dodanega fosforja. Redukcija biodostopnega Pb je bila najočitnejša tretji dan inkubacije, kar spet kaže na to, da se reakcija med Pb iz tal in P zgodi ali *in situ* ali med PBET. Moseley in sod. (2008) so poročali o vplivu različnih P aditivov (TSP, PR, apatita) in njihovih koncentracij, časa (0-365 d) ter pH vrednosti v *in vitro* PBET ekstrakciji (1,5 proti 2,3) na biodostopnost Pb v 10 različnih tleh. Začetne vrednosti biodostopnosti so bile večje od standardnih vrednosti (US EPA). Velik vpliv na Pb biodostopnost so imeli tako vrsta aditiva, kot tudi njihova koncentracija; za redukcijo biodostopnosti Pb za okrog 25 % je bila potrebna velika količina aditivov (20-25 %). Za večino kombinacij aditivov se je redukcija nadaljevala v obdobju po enem letu, kar je bilo v nasprotju z rezultati, ki so jih dobili Hettiarachchi in sod. (2000). Biodostopnost Pb je z dvigom pH vrednosti upadla, vendar niso ugotovili niti ene značilne korelacije med značilnostmi tal in biodostopnostjo Pb v kontroli s pH 1,5 ali 2,3. Zaradi velike količine aditivov, ki jih je potrebno dodati tlem za majhno zmanjšanje biodostopnosti Pb, stabilizacija Pb ni vselej izvedljiva.

Finžgar in sod. (2006) so uporabili stabilizacijo s Slovakinom (komercialnim stabilizantom, ki vsebuje dolomit, diatomit, smektit, bazaltni tuf, bentonit, alginit in zeolit), vitrifikacijo z mikrovalovno pečico, spiranje z EDTA in z biorazgradljivim [S,S]-EDDS s horizontalno prepustno membrano na dnu s ciljem zmanjšanja nevarnosti (tudi oralne biodostopnosti, določeno s PBET), ki jo onesnažena tla predstavljajo za človeka in okolje. Slovakin je v primerjavi z apatitom bolj uspešno imobiliziral Zn in Cu; v primerjavi s kontrolnimi tlemi Slovakin ni znatno vplival na oralno biodostopnost, čeprav je zvišal fitodostopnost (določeno s hiperakumulatorom *Thlaspi goesingens*). S spiranjem tal s kelatnimi ligandi se je iz tal sicer odstranil del Pb, oralna biodostopnost in fitodostopnost preostalega Pb pa sta se zvišala; upad oralne biodostopnosti Pb so dokazali zgolj po vitrifikaciji. Geebelin in sod. (2003) navajajo, da je od treh uporabljenih aditivov (apno, ciklonski prah in PR) pri stabilizaciji Pb zgolj PR znatno znižal oralno biodostopnost, določeno s PBET, a zgolj v treh izmed 10 začetnih vzorcev. Ryan in sod. (2004) so raziskovali metode za zmanjšanje biodostopnosti Pb v urbanih tleh, onesnaženih s Pb iz topilnice (Joplin, Missouri, ZDA) s pomočjo različnih tretmajev. Raziskave so pričeli že leta 1997; v letu 2000 so zbrali vse talne vzorce in izvedli *in vivo* in ekstrakcijske *in vitro* teste za določanje biodostopnosti Pb. Najboljše rezultate so dobili pri remediaciji tal s fosfati, kjer je oralna biodostopnost Pb upadla za 69 %. Brown in sod. (2004) so opisali možnost *in situ* imobilizacije Pb, Zn in Cd s pomočjo različnih aditivov na področju Joplina, država Missouri. Izbrali so aditive, ki so se izkazali za najučinkovitejše: H₃PO₄, kompost iz organskih odpadkov in Fe- stranski proizvod z dodatkom P iz TSP. Sočasno so izvedli laboratorijski in poljski poskus, biodostopnost Pb so določali s pomočjo *in vitro* ekstrakcij in *in vivo* testov. V poljskem poskusu so uporabili tudi različne kombinacije aditivov. Glede na različne mehanizme adsorpcije in precipitacije Pb, Zn in Cd so izdali priporočilo, da naj se za zmanjšanje fitodostopnosti uporablja zgolj en aditiv (in ne kombinacija različnih aditivov). Vsi tretmaji so sicer zmanjšali bio- in fito-dostopnost PSK, ampak neskladnosti med rezultati lahko povzročajo težave pri ocenjevanju njihove učinkovitosti.

Evropska raziskovalna skupina za določanje biodostopnosti (ARGE) združuje mednarodne institucije in raziskovalne skupine; namen skupine je preučevanje ogroženosti ljudi z biodostopnimi onesnažili iz tal preko gastrointestinalna trakta (GI). BARGE je razvila t. i. UBM metodo ("Unified BARGE Method") za določanje biodostopnosti PSK. Wragg in sod. (2011) so izvedli medlaboratorijske mednarodne raziskave na področju biodostopnosti Pb, Cd in As v tleh, za katere so že imeli rezultate biodostopnosti, pridobljene v *in vivo* testih na prašičkih, in ugotovili, da so rezultati med seboj primerljivi, potrebno bo le izboljšati ponovljivost in obnovljivost (reproaktivnost) metode. Pelfréne in sod. (2010) so preiskovali biodostopnost Cd, Pb in Zn v zelo onesnaženih kmetijskih tleh, vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti tal ter povezanost z rezultati sekvenčnih ekstrakcij. Cd se izkazal kot najbolj mobilen, Pb je bil v večji meri vezan na Fe/Mn okside, Zn pa v nerezidualni frakciji. Faktor mobilnosti (določen v prvi frakciji sekvenčne ekstrakcije) je

sledil nizu Cd > Zn >> Pb in dokazal visoko mobilnost Cd in Zn. Biodostopnost kovin, določena s pomočjo UBM testa, je bila najvišja pri Cd, potem Pb, na koncu Zn. Znatne razlike so zabeležili tudi med želodčno (G) in črevesno (GI) frakcijo tal, kar je pogojevala frakcija tal, na katero so bile kovine vezane. Istočasno so dokazali da pseudototalne koncentracije PSK in fizikalno-kemijski parametri tal vplivajo na *in vitro* določeno biodostopnost PSK. Pomembne korelacije *in vivo* in *in vitro* testov se nanašajo na ciljne organe - ledvice za Cd in Pb ter urin za As (Pelfrêne in sod., 2010), za Zn takšni podatki ne obstajajo. Z uporabo UBM testa so Roussel in sod. (2010) analizirali 27 vzorcev onesnaženih urbanih tal ter ocenili oralno biodostopnost Pb, Cd in Zn. Ugotovili so, da je vsebnost PSK v G veliko višja kot v GI frakciji ter dokazali pozitivno korelacijo med koncentracijo PSK, dobljeno z UBM ekstrakcijo in celokupno koncentracijo. Fizikalno-kemijski parametri tal so tudi vplivali na biodostopnost PSK; UBM podaja pomembne informacije o biodostopnosti PSK in ga je potrebno vključiti v ocene tveganja, saj omogoča pridobivanje realnih informacij za oceno tveganja za zdravje.

2.5 VPLIV REMEDIACIJE NA FUNKCIONALNOST TAL

Učinkovita *in situ* stabilizacija PSK lahko pozitivno vpliva na funkcionalnost tal na podlagi zmanjšanja mobilne frakcije PSK. Dinamika in obnavljanje ekosistemskih procesov v tleh ni dovolj raziskana, a v zadnjem času postaja za raziskovalce vse bolj zanimiva (Lee in sod., 2009). Medtem ko je vpliv remediacije na kemijske in fizikalne lastnosti v veliki meri že raziskan, preučevanje vplivov na mikrobnou oz. encimsko aktivnost v tleh zahteva dodatne raziskave. Ocene encimskih aktivnosti, ki jih izvajamo z indirektnimi meritvami v laboratorijih, merijo le potencialno aktivnost pod optimalnimi pogoji in ne *in situ* aktivnosti. Odsotnost encimov ali zaviranje njihove aktivnosti negativno vplivata na procese prehranjevanja rastlin (Soil quality ..., 2010). Jimenez in sod. (2002) so predlagali uporabo mikrobine biomase in encimsko aktivnosti kot indikatorje kakovosti tal zaradi njihove povezanosti s talno biologijo, enostavnosti merjenja, hitrosti odzivov na spremembe pri ravnanju s tlemi in visoko občutljivost na začasne talne spremembe.

Wang in sod. (2006) so preučevali kvantitativno vzročno zvezo med pH in biološkimi aktivnosti v tleh, onesnaženih s Zn in Cd, ter povezavo med PSK in biološkimi aktivnosti v tleh pri nizkih pH vrednostih. Znižanje pH je znatno znižalo aktivnost alkalne fosfataze, arilsulfataze, nitrifikacijski potencial in dihanje, povišalo pa aktivnost kisle fosfataze. Vsi določeni mikrobiološki parametri, razen dihanja v tleh, so se izkazali kot občutljivi indikatorji statusa pH tal. Zhang in sod. (2010) so pisali o inhibitorskem vplivu PSK kot posledice rudarjenja na mikrobnou aktivnost oz. encimsko aktivnost v tleh (ureaze, sukraze in kisle fosfataze), mikrobine biomaso in bazalno dihanje. Mikrobeni parametri so znatno korelirali s pH vrednostjo, pH pa je negativno koreliral s PSK. Podobne rezultate so dobili v prejšnjih raziskavah Wang in sod. (2007) in Papa in sod. (2009). Lee in sod. (2009) so

potrdili zgoraj omenjene korelacije - povišanje ureazne in DHA aktivnosti ter dihanje tal z naraščanjem pH in imobilizacijo Pb, Zn in Cd, ugotovljeno z naborom različnih testov (PBET, rastlinski poskus s solato (*Lactuca sativa* L.), ekstrakcijo s Ca(NO₃)₂ in sekvenčno ekstrakcijo). Mikroorganizmi za preživetje v onesnaženih tleh potrebujejo več energije, saj energijo za rast preusmerjajo v ohranjanje celičnih funkcij; to povzroča porast bazalnega dihanja v onesnaženih tleh (Mikanova, 2006).

O vplivu *in situ* remediacije s PSK onesnaženih tal na kakovost tal, določeno predvsem z meritvami encimske aktivnosti (arilsulfataze, β -glukozidaze in dehidrogenaze) in mikrobnega heterotrofičnega potenciala skupaj z določenimi kemijskimi parametri so pisali Pérez-de-Mora in sod. (2005). Zgornjih 25 cm onesnaženih tal so odstranili in jim dodali različne aditive: organske (kompost iz aktivnega blata čistilnih naprav, kompost iz organskih odpadkov, lisni odpad in leonardit) in anorganske (preostalo apno iz prozvodnje sladkorja iz sladkorne pese) v količinah 100 Mg ha⁻¹. Po enem mesecu so v tla posejali *Agrostis stolonifera* L.; tla so vzorčili pred sejanjem in po šestih mesecih. Aditivi so izboljšali kemijske lastnosti tal in zmanjšali vsebnost topnega Cd, Cu in Zn. Mikrobiološki parametri so se po dodatku organskih aditivov izboljšali; rastlinski pokrov je izboljšal tudi kemijske in biološke lastnosti tal, še zlasti ko so dodali anorganski aditiv. V naslednji raziskavi so Pérez-de-Mora in sod. (2006) opisali dolgoročne učinke istih aditivov in rastlin kot v prejšnji raziskavi v poskusu, ki je trajal 18 mesecov. Dodatek aditivov je povzročil izboljšanje mikrobine aktivnosti; kompost iz aktivnega blata čistilnih naprav, kompost iz organskih odpadkov in apno so bili najučinkovitejši pri zvišanju aktivnosti dehidrogenaze in arilsulfataze, medtem ko β -glukozidaze in kisle fosfataze niso bile pod značilnim vplivom sprememb pH vrednosti in koncentracij topnih PSK. Pérez-de-Mora in sod. (2005, 2006) so dokazali, da rastlinski pokrov prispeva k izboljšanju kemijskih in bioloških lastnosti onesnaženih tal (preko povišanja vsebnosti organske snovi, hrani, kationske izmenjevalne kapacitete ter biološke aktivnosti) in na ta način omogoča nastajanje avtonomnih ekosistemov. Garau in sod. (2007) so ugotovili, da so rdeče blato, apno in naravni zeolit izboljšali status tal, onesnaženih s Pb, Cd in Zn (posledica dolgoletnega rudarjenja galenita in sfalerita) - zmanjšali so biodostopnost kovin, povišali pH vrednost tal in povišali dehidrogenazno ter ureazno aktivnost. Aktivnost β -glukozidaze se je po dodatku rdečega blata in apna znižala, kar je bila najverjetnejše posledica spremenjene pH vrednosti tal. Lee in sod. (2011a) so dokazali, da so dehidrogenaze (ali druge mikrobine lastnosti) ustrezni indikatorji za ponovno vzpostavljanja biotskih zvez in obnavljanje povezovalnih funkcij v remediranih sistemih. Lee in sod. (2011b) so ocenili tudi učinkovitost imobilizacije As, Cd, Pb in Zn glede na končne »prijemnike« - mikroorganizme, rastline, človeka - in pokazali, da PSK in As inhibirajo encime, ker se vežejo namesto kovinskih kofaktorjev in interagirajo z aktivnimi katalitskimi encimskimi mesti ali potencialnim encimskim substratom. Ureaze in fosfataze so se zopet izkazali kot občutljivi indikatorji v močni povezi s kvaliteto tla.

2.6 VPLIV DEŽEVNIKOV NA REMEDIRANA TLA

Vpliv PSK na deževnike je zelo raziskan, medtem ko se je veliko manj pozornosti posvečalo vplivu deževnikov na mobilnost in biodostopnost PSK. Za pravilno oceno nevarnosti onesnaženih tal za okolje je potrebno razumeti vpliv biote na mobilnost kovin. Od biotskih faktorjev so deževniki verjetno najpomembnejši organizmi zaradi svojega vpliva na talne lastnosti, razgradnjo organske snovi in sproščanje nutrientov, transportne procese, strukturo tal ter dominantnosti v talni živalski biomasi (Kizilkaya, 2004). Deževniki so na PSK občutljivejši kot drugi nevretenčarji in lahko akumulirajo več PSK iz onesnaženih tal kot druge živali (Ma in sod., 2002).

Deževniki so pogosto inokulirani na degradirana tla med procesom restavriranja tal (Butt, 1999). Dickinson (2000) je predlagal inokulacijo deževnikov v tla, onesnažena s PSK, zaradi njihove vloge v formiraju tal. Tudi če niso umetno inokulirani, lahko deževniki relativno hitro poselijo degradirana tla, v kolikor v njih vladajo ustrezni pogoji (Eijssackers, 2010). Deževniki lahko glede na svojo aktivnost in letno proizvodnjo glistin- od 5 do 250 ton ha⁻¹ v kratkem času vplivajo na frakcionalco in biodostopnost PSK (Udovič in Leštan, 2007).

V omenjenih raziskavah je bilo dokazano, da deževniki vplivajo na zvišanje mobilnosti in dostopnosti PSK v onesnaženih tleh; spiranje višjih koncentracij kovin v podtalnico, povečan vnos v rastline (Wang in sod., 2006) in talne živali (Coeurdassier in sod., 2007). Znano je tudi, da lahko deževniki mobilizirajo kovine, ki preostanejo po remediaciji s spiranjem z EDTA in na ta način zmanjšajo končni učinek remediacije (Udovič and Leštan, 2007; Udovič in sod., 2007). Slednje najverjetneje povzroči vpliv deževnikov na razgradnjo organske snovi in posledično sproščanje organsko vezanih kovin (Sizmur in sod., 2011b). Po drugi strani rezultati raziskav Lukkari in sod. (2006) kažejo, da deževniki povzročijo porast mobilnosti Cu in Zn v glistinah, obenem pa zmanjšajo mobilnost kovin v tleh, naseljenih z deževniki. Iz navedenega izhajata dva nasprotne mehanizma vpliva deževnikov na mobilnost kovin - deževniki se zakopljejo v tla in producirajo glistine s povišanimi koncentracijami mobilnih kovin, obenem pa sproščajo mukus v talno raztopino, kar lahko povzroči upad topnosti kovin v tleh (Sizmur in sod., 2011c).

Usoda stabiliziranih kovin po remediaciji ni dovolj raziskana. Deževniki pomagajo pri mešanju aditiva in tal in na ta način lahko prispevajo k stabilizaciji PSK, še posebej v manjših poskusih, kjer tal ni mogoče mehansko homogenizirati (Sizmur in sod., 2011b). Sizmur in Hodson (2009) sta poudarila, da je v raziskavah potrebno uporabljati različne vrste deževnikov iz različnih ekoloških skupin, kar nam omogoča oceno njihove interakcije in skupnega vpliva na dostopnost in speciacijo PSK. V dosedanjih raziskavah so raziskovalci uporabljali vse tri tipe deževnikov; od epigeičnih vrst so najpogosteje

uporabili *Eisenia fetida*, čeprav ta običajno ni prisotna v onesnaženih tleh. Aneceični deževniki v tleh oblikujejo vertikalne tunele, obložene z glistinami in s plastjo, bogato z bakterijami in mukusom, in lahko povzročijo večje spiranje v tleh. Endogeične vrste so verjetno najbolj primerne za določanje vpliva deževnikov na distribucijo kovin v tleh, saj so v tleh prisotne največ časa, obenem pa se hranijo z največjo količino tal. Vse trije tipi povzročajo povišanje biodostopnosti in mobilnosti kovin (Sizmur in Hodson, 2009).

2.6.1 Vpliv deževnikov na lastnosti tal

Spremembe v mobilnosti kovin v tleh in zgolj en parameter tal je kljub rezultatom laboratorijskih poskusov težko povezati; hkrati lahko kontroliramo le spremembe enega parametra tal, ki pa lahko vpliva na katero izmed drugih lastnosti tal, ki lahko povzročijo spremembe v mobilnosti PSK (Sizmur in Hodson, 2009).

Znano je, da pH vrednost tal primarno določa del celokupne koncentracije kovin, ki se bo raztopila v talni raztopini (Sauve in sod., 2000); s pomočjo tega mehanizma nekateri raziskovalci razlagajo poraste mobilnosti kovin v tleh, procesiranih z deževniki, pri čemer se zniža pH vrednost tal (Kizilkaya, 2004; Yu in sod., 2005). V večji meri rezultati opravljenih raziskav kažejo na dvig pH vrednosti tal zaradi delovanja deževnikov preko izločanja mukusa, pri čemer se zopet zviša dostopnost kovin (Ma in sod., 2002; 2003; Wen in sod., 2006; Udovič in Leštan, 2007; Udovič in sod., 2007). Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da spremembe pH niso edini parameter, ki vpliva na mobilnost kovin. Vpliv deževnikov na zvišanje PSK in na spremembe pH je zelo pomemben s stališča ocene uspešnosti remediacije - bodisi z odstranjevanjem PSK iz tal, ali z imobilizacijo PSK brez spremenjanja celokupne koncentracije kovin v tleh.

Raztopljeni organski snovi v talni raztopini lahko vpliva tudi na dostopnost kovin, bodisi skozi kompleksiranje kovin v raztopini, bodisi s prehajanjem kovin v raztopino skozi izmenjavo na površini tal (Sizmur in Hodson, 2009). Znano je, da deževniki prispevajo humificiranju tal (Mršić, 1997), medtem ko huminska kislina zvišuje fitodostopnost kovin na podlagi nastajanja organo-kovinskih kompleksov (Evangelou in sod., 2004). Pomembno korelacijo med zvišanjem organske snovi zaradi aktivnosti *E. fetida* in koncentracijo vodotopnih kovin (Zn, Cu, Cr, Cd, Co, Ni in Pb) so dokazali Wen in sod. (2004). Zvišanje topne organske snovi so zabeležili Dandan in sod. (2007), ko so deževniki vrste *M. guillelmi* povzročili zvišanje fitodostopnega Cu.

2.6.2 Vpliv deževnikov na biodostopnost PSK

Kljub dobro znanemu dejству, da deževniki vplivajo na zvišanje biodostopnosti kovin, osnovni mehanizmi vpliva deževnikov na kovine v tleh še vedno niso povsem raziskani.

Sizmur in sod. (2011a) so dokazali, da lahko *L. terrestris* mobilizira PSK in As ter vpliva na njihovo porazdeljenost v tleh; vpliv je odvisen tako od tipa tal kot tudi od specifičnosti elementov, od zvišanja ali znižanja pH in topne organske snovi v tleh. Cu in Pb sta močneje vezana na organsko snov in tako bolj odvisna od spremembe topne organske snovi, medtem ko Zn ni močno vezan na organsko snov in je njegova topnost bolj pod vplivom pH sprememb. Pri nižjih pH vrednostih je topnost PSK višja, topnost As pa upada z zniževanjem pH vrednosti. Mobilizirane kovine se lahko sperejo v površinske in podtalne vode, kar predstavlja nevarnost tudi za bioto. Sizmur in sod. (2011b) so dokazali, da *L. terrestris* ne povzroča ponovne mobilizacije PSK (Pb, Cu in Zn) po remediaciji tal s kompostom in aktivnim ogljem. Deževnike so inkubirali 28 dni v tleh, remediranih s kombinacijo obeh aditivov (10 % + 10 % w/w) po 77 dneh od začetnega dodatka aditiva. Dobljeni rezultati se od rezultatov predhodnih raziskav precej razlikujejo in dokazujejo, da so aditivi s svojimi lastnosti (pH in CEC) razveljavili učinek deževnikov. Avtorji so predlagali, da je v prihodnje potrebno raziskati dolgoročne vplive različnih aditivov in različnih vrst deževnikov na mobilnost kovin. Sizmur in sod. (2011c) so preučevali vpliv organskih aditivov na spremembe v topnosti PSK (Pb, Cu in Zn) in As in vpliv *L. terrestris* na končni vpliv remediacije s kompostom iz zelenih ostankov v tleh iz rudnika As/Cu in Pb/Zn. Kompost so uporabili v količinah 0, 5, 10, 15 in 20 % (w/w) in dodali en ali dva deževnika v konstantnem razmerju deževnik:tla. Ugotovili so, da kompost zviša topnost As in zniža topnost Cu, Pb in Zn. Dodatek deževnika je vplival tudi na zmanjšanje topnosti As in Cu in povišal topnost Pb in Zn, z izjemo primera, ko so določeni vodotopni Pb in As v porni vodi. Dodatek komposta je znižal topnost kovin in zmanjšal vpliv deževnikov na topnost kovin. Mobilizacijo PSK (Pb, Zn in Cd) so kot posledico aktivnosti deževnika *Eisenia fetida* (epigeičen) in *Octolasion tyrtaeum* (endogeičen) po remediaciji onesnaženih tal s spiranjem z EDTA dokazali tudi Udovič in sod. (2007). V raziskavi so opazili razveljavitev učinka remediacije in potrdili interspecifične razlike v aktivnosti deževnikov, ki se najbolj izražajo v učinkovitosti asimilacije, hitrosti transporta skozi prebavni trakt, metabolizmu Ca, poti izločanja ipd. Obe vrsti sta povzročili porast Pb v karbonatni frakciji v glistinah in zvišali biodostopnost Pb v črevesni fazi (določeno s PBET) za faktor 2,4 (*E. fetida*), oz. 2,8 (*O. tyrtaeum*). Mobilizacijo Cu so v onesnaženih tleh, spranih z EDTA, in s prisotnostjo avtohtonega deževnika vrste *L. terrestris* v svoji raziskavi opisali Udovič in Leštan (2010). Remedirana in neremedirana tla (< 5 mm) so zatehtali (400 g) v plastične posode, navlažili do cca. 50 % zadrževalne kapacitete tal in stabilizirali v temi na 15 °C in 80 % vlažnosti. Po tri odrasle in zrele primerke *L. terrestris* - oprane, posušene in postene 2 dni (zaradi praznjenja prebavil) - so dodali vsakemu vzorcu. Inkubacija je trajala 12 tednov, redno so vzdrževali vlažnost tal. V remediranih tleh so deževniki povzročili porast Cu, vezanega na karbonate (določeno s sekvenčno ekstrakcijo); koncentracija v črevesju se je povišala 1,7- krat (PBET), 1,1- krat se je povišala koncentracija Cu, določena z DTPA. Udovič in Leštan (2007) sta raziskala vpliv dveh epigeičnih vrst deževnika, *L. rubellus* in *E. fetida*, na frakcionacijo in biodostopnost Pb in Zn pred spiranjem z EDTA in po njem.

Odrasle osebke so inkubirali v tla, po inkubaciji so glistine previdno pobrali s površine tal. Nobena izmed vrst ni značilno vplivala na frakcijosko kovin v glistinah, pobranih iz remediaranih ali neremediranih tal, koncentracija biodostopnega Pb (določena s PBET) v glistinah *E. fetida* pa je bila znatno višja kot v preostalih tleh.

Zvišanje PSK (Cr, Cu, Cd, Co, Zn, Pb in Ni) v vodotopni, izmenljivi in karbonatni frakciji zaradi delovanja deževnikov vrste *E. fetida* so zabeležili tudi Wen in sod. (2004), medtem ko sta Cheng in Wong (2002) pisala o vplivu *Pheretima* sp. na znižanje izmenljivega Zn in Zn, vezanega na karbone odvisno od tipa tal, uporabljenega v poskusu. Omenjeni raziskovalci so v svojih raziskavah uporabljali procesirana tla, v objavi Udovič in Leštan (2007) pa so bile uporabljeni glistine. Do razlik med rezultati je tako lahko prišlo zaradi različnih talnih značilnosti ter fizioloških in ekoloških razlik med vrstami deževnikov, ki so znane kot selektivni porabniki.

2.6.3 Vpliv deževnikov na funkcionalnost tal - vpliv na encimsko aktivnost in dihanje v tleh

Poleg vpliva deževnikov na kemijske in fizikalne lastnosti tal je znan tudi njihov vpliv na distribucijo in aktivnost mikroorganizmov in talnih živali (Binet in sod., 1998; Salmon, 2001). Mikrobiološki procesi v tleh so ključni za številne ekološke funkcije, saj je mikrobiološka aktivnost tesno povezana s strukturo tal, rodovitnostjo in transformacijo organske snovi (Kizilkaya in Hepşen, 2007). Deževniki lahko stimulirajo in/ali spremenijo mikrobiološko in encimsko aktivnost v tleh. V glistinah deževnikov je bila zabeležena porast bakterijske biomase, aktinomicet in gliv, obenem pa tudi določena povišana koncentracija fitodostopnih kovin (Wen in sod., 2004), kar je mogoče pripisati stimulaciji bakterijske populacije, ki encimsko razgrajuje organsko snov, pri čemer se organsko vezane kovine sproščajo v raztopino (Sizmur in Hodson, 2009). Deževniki vplivajo na talno mikrofoloro z razgradnjo organske snovi, kopanjem tunelov, odlaganjem glistin, prehrano in eventuelnim končnim razpadom. Zmožnost mikroflore za preživetje omenjenih procesov je odvisna od njihove zmožnosti za adaptacijo na pogoje, ki jih povzroči vsak posamezen deževnik (Sizmur in sod., 2009). Deževniki povzročajo zvišanje mikrobne respiracije v glistinah, v tunelih in v preostalih tleh, saj s seboj prinašajo dodatne vire dostopnega C (McLean in sod., 2006). S svojo aktivnostjo lahko deževniki povišajo mikrobnou aktivnost tudi skozi izboljšanje prezračenosti tal, višjo vsebnostjo organske snovi in večjo dostopnostjo vode. McLean in sod. (2006) so v pregledu vpliva invazije deževnikov v ekosistem, ki predhodno ni bil naseljen, ugotovili, da se mikrobne skupine prilagajajo z aktivnostjo prisotnih deževnikov ter formirajo manjše in bolj aktivne skupine.

Deževniki lahko vplivajo na spremembe mikrobioloških ali aktivnih skupin v tleh, zaradi pogojev v njihovem črevesju; mikroorganizmi v črevesje deževnika prihajajo predvsem iz

zaužitega materiala, vsebujejo pa lahko tudi endemske mikroorganizme. Zaradi anoksičnih pogojev v črevesju deževnika so stimulirani mikrobi sposobni anaerobne rasti - takšne so npr. fermentativne bakterije (Drake in Horn, 2006; Sizmur in Hodson, 2009). Devliegher in Verstraete (1995) sta opisala vpliv aktivnosti deževnikov *L. terrestris* na mikroorganizme skozi procese obogatitve tla s hranili (NEP; mešanje tal, inkorporacija organske snovi z površine, mobilnost in prehranjevalne navade deževnika, ne pa tudi metabolizem) in procese, povezane z aktivnostmi v črevesju (GAP; produkcija encimov, biokemijske reakcije, mešanje, mikrobna aktivnost v črevesju, procesi v glistinah). Ugotovili so, da NEP bolj kot GAP povzroča zvišanje mikrobne populacije. O izboljšanju mikrobioloških lastnosti glistin *L. terrestris* in v tleh po dodatku različnih aditivov - organskih odpadkov (pšenične slame, odpadkov iz proizvodnje čaja, tobaka, kravjega gnoja in lupin lešnikov) so pisali Kizilkaya in Hepşen (2007). Encimske aktivnosti (dehidrogenaze, β -glukozidaze, ureaze, alkalne fosfataze in arilfosfataze) so se zvišale po dodatku organskih aditivov, tako v glistinah kot tudi v tleh. Pati in Sahu (2004) sta pokazala, da dodatek elektrofilterskega pepela v deležu 5 % ob prisotnosti deževnika *Drawida willsii* stimulira mikrobno aktivnost (DHA, respiracijo) in se v navedenih količinah lahko uporablja za izboljšanje rodovitnosti kislih tal.

2.7 UPORABA [S,S]-EDDS V POSTOPKU STABILIZACIJE TAL

[S,S] stereoizomer etilendiamindisukcinata [S,S]-EDDS je bil sprva izoliran kot metabolit aktinomicet v tleh (*Amycolatopsis orientalis*) in je torej naravno prisotna sestavina tal; biološko razgradljiv in v nizkih koncentracijah ni strupen - strupenost samega EDDS preizkušena na ribah, je nizka ($EC_{50} > 1000 \text{ mg L}^{-1}$) (Nishikiori in sod., 1984). Mineralizacija [S,S]-EDDS do končne razgradnje traja 28 dni; potrjena pa je razgradljivost kompleksov s Pb, Cd in Zn v aktivnih blatih (Jaworska in sod., 1999). Zaradi svoje učinkovitosti pri ekstrakciji in stabilnosti kompleksov se kljub visoki ceni uporablja pri remediaciji tal, onesnaženimi s različnimi PSK (Nowack in sod. 2006; Pociecha in sod., 2009; Yip in sod., 2010), njegova učinkovitost pa je primerljiva z učinkovitostjo EDTA (Yip in sod., 2010). Izkazalo se je, da je zamenjava EDTA s [S,S]-EDDS možna navkljub nekoliko nižji učinkovitosti in dejstvu, da potrebuje višje pH vrednosti. [S,S]-EDDS v primerjavi z EDTA povzroča manjšo dezintegracijo železovih delcev (Yip in sod., 2010). [S,S]-EDDS je pogosto uporabljen za inducirano fitoekstrakcijo (Kos in sod., 2003; Kos in Leštan, 2003; 2004), ker zaradi kompleksiranja PSK poveča biodostopnost le teh za rastlino in pospeši prenos kovinskih kompleksov iz korenin v nadzemne dele rastlin. Ob dodatku 10 mmol kg^{-1} suhih tal [S,S]-EDDS so rastline v svojih nadzemnih delih akumulirale 1926-krat več Pb, 7,5-krat več Zn in 11-krat več Cd kot v kontrolnih rastlinah, ki jim ni bil dodan kelatni ligand (Kos in Leštan, 2004). Po nam znanih podatkih dosedaj še nihče ni uporabil [S,S]-EDDS pri postopkih stabilizacije onesnaženih tal.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LOKACIJE VZORČENJA

V okviru doktorske naloge smo proučevali vpliv aditivov na različnih vzorcih, en vzorec z lokacije Podklošter (Avstrija) in 3 (poimenovani Mx, My, Mz) z območja Zgornje mežiške doline (Slovenija).

V Podkloštru (Arnoldstein) na avstrijskem Koroškem, v bližini mej s Slovenijo in Italijo, je več kot 500 let obstajala talilnica Pb, od leta 1950 pa so pričeli še s rudarjenjem Zn, Cd in Ge. Talilnico so zaprli leta 1992. Emisija potencialno strupenih elementov, predvsem Pb, Zn in Cd, v manjši meri pa tudi Cu in As, je povzročila onesnaženje področij, ki so se uporabljala za gradnjo stanovanjskih objektov, otroških igrišč, za kmetijstvo (Slika 2) (Friesl-Hanl in sod., 2009).

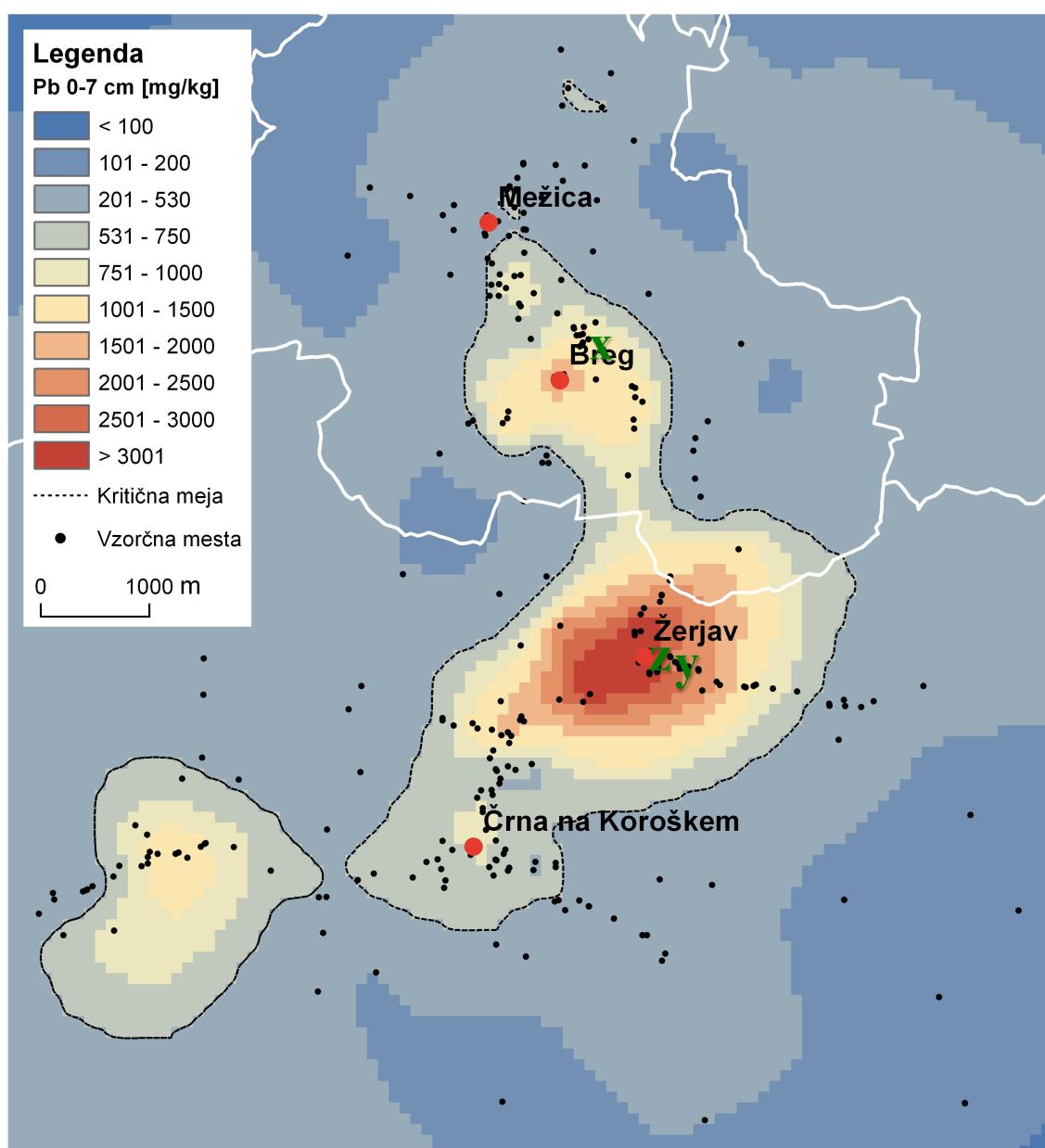


Slika 2: Lociranje kraja Podklošter (črna pika) na avstrijskem Koroškem (siva površina) (Friesl-Hanl in sod., 2009: 583)

Figure 2: Localisation of the site Arnoldstein/Hohentum (black dot) in Carinthia (grey area) in Austria (Friesl-Hanl in sod., 2009: 583)

V Sloveniji je kar nekaj območij, ki so zelo onesnažena s PSK (območje Celja in Mežiške doline sta onesnaženi s Pb, Zn in Cd, Jesenice z Ni in Cr, Šmarje pri Kopru pa s Cu).

Za naše delo smo izbrali tla iz Mežiške doline, kjer so PSK v okolju posledica pretekle tristoletne rudniške, topilniške in kovinsko-predelovalne dejavnosti. Tla v dolini, ki vključuje tudi 6600 ha kmetijskega zemljišča, so onesnažena primarno s Pb in tudi Zn in Cd. Na podlagi predhodnih raziskav vsebnosti posameznih PSK in pH tal, ki jih je opravilo podjetje za okoljske tehnologije in inženiring ENVIT in pregleda terena, smo izbrali tri vzorčne točke (koordinate za vzorec Mx so N46 30 40,7 E14 51 55,5 (parcela 842/1 KO 889), za vzorec My so N46 29 7,58 E14 52 26,47 (parcela 47 KO 900) in za vzorec Mz so N49 06 08,56 E 14 91 03,46 (parcela 46 KO 900); Slika 3).



Slika 3: Lociranje vzorčnih točk (zelene črke) v Mežiški dolini (x za vzorec Mx, y za My in z za Mz); avtor karte: dr. Neža Finžgar, ENVIT; geostatistična obdelava podatkov: dr. Milan Kobal, Gozdarski inštitut Slovenije (2012) (osebna komunikacija)

Figure 3: Localisation of the sampling points (green letters) in Meza Valley (x for Mx sample, y for My and z for Mz); author of the map: dr. Neža Finžgar, ENVIT; geostatistical data analysis: dr. Milan Kobal, Slovenian Forestry Institute (2012) (personal communication)

3.2 VPLIV ADITIVOV NA STABILIZACIJO PSK IN FUNKCIONALNO OBNOVITEV ONESNAŽENIH TAL PO STABILIZACIJI - ZASNOVA POSKUSA

Raziskave smo izvedli v dveh delih; v prvem delu smo testirali vpliv različnih koncentracij hidroksiapatita in Slovakita, izdelanega ravno za namen remediacije tal, na potencialno biodostopnost PSK (Pb, Zn, Cd, Cu) v tleh z lokacije Podklošter. Kationska izmenjevalna

kapaciteta, izražena kot število molov pozitivnega naboja adsorbiranega na enoto mase, ($\text{mmol}_\text{e} 100 \text{ g}^{-1}$ tal), hidroksiapatita je znašala $7,2 \text{ mmol}_\text{e} 100 \text{ g}^{-1}$ in Slovakita $91,5 \text{ mmol}_\text{e} 100 \text{ g}^{-1}$; pH hidroksiapatita je bil 7,8 in Slovakita 8,7; vsebnost karbonatov v Slovakitu pa 47 %. Dodajali smo svežim tlem ($< 5 \text{ mm}$) iz Podkloštera 1 %, 2,5 % in 5 % (w/w) Slovakita (IPRES, Bratislava, Slovaška), presejanog na $250 \mu\text{m}$, in iste količine hidroksiapatita (tri-kalcium fosfata, Riedel-de Haën). Odstotek dodanega aditiva se nanaša na suho težo tal. Enake količine neremediranih (kontrolnih) in remediranih tal (v katera smo dodali aditive) smo zatehtali v polipropilenske posode (300 mL), navlažili do 100 % poljske kapacitete in inkubirali v temi en mesec pri konstantni temperaturi 14°C . Vlažnost tal smo redno preverjali in uravnnavali po potrebi. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah. Po izteku inkubacijskega časa smo določili potencialno biodostopnost PSK v remediranih in neremediranih tleh s pomočjo različnih selektivnih kemijskih ekstrakcij (ekstrakcije s DTPA, EDTA, amonoacetatom in kalcijevim kloridom). Na podlagi dobljenih rezultatov smo izbrali najučinkovitejšo koncentracijo obeh aditivov.

V drugem delu poskusa smo po istem postopku kot v prvem delu tlem dodali 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita. Uporabili smo 7,5 kg suhih kontrolnih tal in ustrezno količino remediranih tal ter jih enakomerno porazdelili v plastične kolone (višine 40 cm, premera 16 cm, Slika 4), jih navlažili do 100 % poljske kapacitete in inkubirali en mesec v temi pri konstantni temperaturi 14°C .



Slika 4: Priprava kontrolnih in stabiliziranih tal v kolonah; faza vlaženja tal do 100 % poljske kapacitete.
Figure 4: Preparation of non-remediated soils and remediated soils; the stage of soil moisturing until 100% of field capacity is achieved.

3.3 VPLIV DEŽEVNIKOV NA BIODOSTOPNOST PSK IN FUNKCIONALNO OBNOVITEV ONESNAŽENIH TAL PO STABILIZACIJI- ZASNOVA POSKUSA

Dve vrsti deževnikov, ki niso bili izpostavljeni PSK, *Dendrobaena veneta* in *Lumbricus terrestris*, smo naročili pri www.riesenwurm.de (Ueckermünde, Nemčija). Deževnike smo hrаниli v temi pri konstantni temperaturi (14°C) in relativni vlažnosti (80 %). Pri našem delu smo uporabili zrele primerke obeh vrst, s katerih smo z vodo sprali ostanke zemlje in jih postavili na navlaženo papirnato brisačo v petrijevke (po tri primerke *D. veneta* in en primerek *L. terrestris* na petrijevko). Deževnike vrste *D. veneta* smo inkubirali 3 dni pri $T = 14^{\circ}\text{C}$, deževnike vrste *L. terrestris* pa 4 dni pri $T = 14^{\circ}\text{C}$ z namenom, da izpraznijo vsebino črevesja. Papirnate brisače smo menjevali dnevno, da bi se izognili koprofagiji (zaužitju iztrebkov). Deževnike smo ob koncu inkubacije oprali, pozorno obrisali s papirnato brisačo in stehtali.

Pripravili smo čiste plastične posode (premer 6 cm, višina 16 cm) s perforiranim dnem, ki smo jih pokrili s finim sitom (zaradi zagotavljanja dobre prezračenosti in pogojev vlaženja ter preprečevanja pobega deževnikov). Stehtali smo 265 g zračno suhih kontrolnih in remediranih tal (iz Podkloštera) ter jih navlažili do 80 % poljske kapacitete. Deset primerkov *D. veneta* (s povprečno težo $1,2 \pm 0,5$ g) ali 3 primerke *L. terrestris* (s povprečno težo $3,6 \pm 0,9$ g) smo dodali v vsako poskusno posodo in jih 22 dni (*L. terrestris*) oz. 39 dni (*D. veneta*) inkubirali v temi pri konstantni temperaturi (14°C) in relativni vlažnosti (80 %). Tla smo redno vlažili, s čimer smo zagotavljali vzdrževanje poljske kapacitete tal (80 %). Po izteku inkubacijskega časa smo iz procesiranih tal odstranili deževnike, tla premešali in homogenizirali; v tleh smo določili encimske aktivnosti, nato pa smo tla zračno posušili za nadaljne analize.

3.4 VPLIV ADITIVOV NA STABILIZACIJO PSK PO DODATKU Na_3EDDS IN HRANIL (MELASE)

Na podlagi predhodnih raziskav onesnaženosti tal s PSK, ki jih je v Mežiški dolini opravilo podjetje ENVIT d.o.o., ter dodatnega pregleda terena (določanja dostopnih vzorčnih mest, vzorčenja po globinah, določanja koncentracij PSK v tleh (< 2 mm) s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektrometrije (XRF) oz. z uporabo X - žarkovnega indikatorja ter določanja pH v suspenziji tal z $0,01$ M CaCl_2 v razmerju 1:2 (v/v)) smo izbrali najustreznejšo točkovzorec M_x (Slika 5). Po optimizaciji posameznih parametrov remediacijskega procesa smo v nadaljni poskus vključili še dva vzorca (M_y in M_z); tla smo presejali skozi 5 mm sito in zračno posušili.



Slika 5: Določanje pH vrednosti (levo) in vsebnosti PSK s XRF metodo (desno) v talnih vzorcih na terenu
Figure 5: Determination of pH value (left) and PTM concentrations with XRF method (right) in soil samples in the field

V začetnem (small scale) poskusu spiranja tal smo stehtali po 50 g zračno suhih tal (vzorec Mx) v 300 mL polipropilenske posode s perforiranim dnom, ki smo jih pokrili s fino mrežico. Tla smo spirali s 50 mL pralne raztopine, ki je vsebovala 2,5, 5, 10 in 15 mmolov tri-natrij-[S,S]-etilendiamindisukcinata (Na_3EDDS) kg^{-1} suhih tal. Raztopino, ki se je spirala iz tal, smo 24 h recirkulirali s pomočjo peristaltične črpalke (pretok 2 mL min^{-1}) in raztopini med postopkom dodali še 20 mL vode. Pri poskusu smo uporabili [S,S]-stereoizomer etilendiamindisukcinata (Enviomettm C140, Innospec, Velika Britanija). Po kemijski sestavi je Enviomettm C140 tri- natrijeva sol [S,S]- etilendiamin-N,N-dijantarne kisline, $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_8$, s koncentracijo 37,3 %, $M = 358,19 \text{ g mol}^{-1}$ in gostoto $1,325 \text{ g mL}^{-1}$. Koncentraciji Pb in Cd smo izmerili v sprani raztopini (po 24 h). Na podlagi dobljenih vrednosti, celokupne koncentracije kovin v tleh in volumna raztopine smo izračunali delež kovin, odstranjenih iz tal.

Poskus smo nadaljevali z najbolj učinkovitimi koncentracijami Na_3EDDS . Vzorec Mx smo zračno posušili, presejali ($< 5 \text{ mm}$) in stabilizirali s hidroksiapatitom, Slovakitom in kalcijevim polisulfidom; vsak aditiv smo dodajali v koncentraciji 1 %, 2,5 % in 5 % (w/w). Uporabljena hidroksiapatit in Slovakit sta bila enaka kot v prejšnjih poskusih; na novo smo uporabili 30 % CaSx z gostoto $1,22 \text{ g mL}^{-1}$ (Polisenio, Lugo, Italija). Enake količine remediranih tal (zatehte, ki ustrezajo 60 g suhih tal brez aditivov), v katera smo primešali aditive, smo zatehtali v polipropilenske posode (300 mL) s perforiranim dnom, prekritih finim sitom. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah. Tla smo navlažili z vodo (volumen, ki odgovarja 105 % zadrževalne kapacitete tal) ali z raztopino Na_3EDDS (5 in 10 mmol kg^{-1}

suhih tal), pripravljeno v volumnu vode, ki ustreza 105 % zadrževalne (poljske) kapacitete tal. S peristaltično črpalko smo raztopino črpali preko posod s talnimi vzorci; raztopino smo prečrpavali 24 h (Slika 6). Nasičene vzorce smo inkubirali v temi pri vlažnosti 80 % in temperaturi 17 ± 1 °C. Tla smo dvakrat tedensko premešali; vlažnost tal smo preverjali in uravnnavali po potrebi (na min 70 % zadrževalne kapacitete tal). Po enem mesecu inkubacije smo vzorce posušili ter v presejanih talnih vzorcih (< 2 mm) določili pH vrednost in potencialno biodostopnost PSK (ekstrakcija s amonoacetatom).



Slika 6: Postopek nasičenja različno remediranih talnih vzorcev.

Figure 6: Process of saturating soil samples, remediated with different additives and their concentrations

Na podlagi rezultatov smo izbrali najustreznejši aditiv in koncentracijo, pri kateri je bil učinek imobilizacije PSK najizrazitejši, ter koncentracijo raztopine Na_3EDDS . V nadaljnem poskusu smo želeli še podrobneje raziskati vpliv izbranega aditiva (5 % (w/w) hidroksiapatita), 10 mM $\text{Na}_3\text{EDDS kg}^{-1}$ ter dodatka hranila (5 % melase) na imobilizacijo oz. potencialno biodostopnost PSK. Melasa je stranski proizvod predelave sladkorne pese (50 % suhe snovi melase tvori saharoza, 30 % pa nesaharozne snovi - mineralnega porekla, ter organske z dušikom ali brez njega) (Jevtić- Mučibabić in sod., 2011). V raziskavo smo poleg vzorca Mx (787 mg kg^{-1} Pb) vključili še dva talna vzorca, My in Mz, ki sta vsebovala bistveno več PSK (1883 mg kg^{-1} in 4433 mg kg^{-1} Pb, respektivno).

Uporabili smo 300 mL plastične posode, v katere smo dodali po 50 g suhih tal, neodvisno od načina tretiranja. Prvi set vzorcev (izveden v treh ponovitvah) smo zgolj navlažili z vodo (105 % poljske kapacitete); v drugi seriji smo vzorce stabilizirali z dodatkom 5 % (w/w) apatita ter navlažili z vodo (105 % poljske kapacitete); tretja obravnavava je vključevala dodatek 5 % melase ter 10 mM $\text{Na}_3\text{EDDS kg}^{-1}$ suhih tal, raztopljenih v volumnu vode, ki ustreza 105 % poljske kapacitete. V četrtri seriji vzorcev smo tla stabilizirali s 5 % (w/w) dodatkom hidroksiapatita, 5 % melase ter 10 mM $\text{Na}_3\text{EDDS kg}^{-1}$ suhih tal, raztopljenega v volumnu vode, ki je ustreza 105 % poljski kapaciteti. Tekočino

smo 24 ur prečrpavali preko vzorca s pomočjo peristaltične črpalke (2 mL min^{-1}). Melaso smo dodačali po 24 h, saj smo ugotovili, da je takrat največ Pb vezanega za Na₃EDDS. Tla smo nato inkubirali v temi, pri $17\pm1^\circ\text{C}$ in vlažnosti 80 %, vlažnost vzorcev redno preverjali, ter po enem mesecu vzorce posušili, presejali skozi 2 mm sito in jih ustrezno analizirali.

3.5 OSNOVNE PEDOLOŠKE ANALIZE

3.5.1 Tekstura tal

Teksturo oz. mehansko analizo tal za uvrščanje v tri osnovne teksturne razrede (peščena, glinasta in ilovnata tla) smo določili s pomočjo sedimentacijske metode (ISO 11277, 1998). V plastenko smo zatehtali 10 g zračno suhih tal (2 mm), jih prelili s 25 mL 0,4 N Na- pirofosfata ter pustili stati preko noči. Naslednji dan smo vzorce 4 ure stresali na stresalniku, potem suspenzijo prenesli na sito z velikostjo por 0,2 mm ter izpirali z deionizirano vodo (dH₂O) toliko časa, da so se na situ obdržali delci, večji od 0,2 mm (grob pesek). Ostanek na situ smo prenesli v izparilnico, sušili 1 uro pri 105°C , vzorec ohladili v eksikatorju in ga stehtali. Preostalo suspenzijo smo prenesli v valj in ga dopolnili z dH₂O do meritne oznake 1 L; zamašen valj smo stresali 3 minute. Po 3 min smo valj postavili na mizo in po 44 sekundah odpipetirali prvo frakcijo oz. prvih 10 mL vzorca iz globine 10 cm. Pri tem smo zajeli delce, manjše od 0,05 mm oz. grobi in fini melj ter glino. Vzorec smo dali v izparilnico in jo postavili v peščeno kopel ter jo segrevali toliko časa, da je izparela vsa voda. Preostanek smo sušili pri 105°C , ohladili v eksikatorju ter stehtali. Valj smo nato ponovno stresali 3 min, po 4 min in 27 sec smo odpipetirali 10 mL vzorca iz globine 10 cm (v suspenziji so bili delci manjši od 0,02 mm- fini melj in glina) ter ponovili postopek s sušenjem vzorca. Valj smo ponovno stresali 3 min in po 7 h in 35 min odpipetirali 10 mL vzorca iz globine 10 cm, s čimer smo zajeli delce manjše od 0,002 mm (glinene delce); postopek sušenja smo ponovili. Na podlagi dobljenih mas posamezne frakcije smo izračunali deleže peska, melja in gline ter s pomočjo teksturnega trikotnika določili teksturni razred (osnovni razredi so: peščena, glinasta in ilovnata tla, ki so nadalje razdeljena še v posamezne teksturne razrede - skupno jih je 14) posameznih talnih vzorcev. Meritve tekture tal je opravil laboratorij Centra za pedologijo in varstvo okolja (CPVO).

3.5.2 pH vrednost

pH talnih vzorcev smo določali po standardu ISO 10390 (2005), s pomočjo steklene elektrode v 1:5 (v/v) suspenziji tal in 0,01 M kalcijevega klorida. Natančno določeno količino zračno suhih in presejanih tal (< 2 mm) smo z meritno žličko (7,5 mL) prenesli v 50 ml polipropilenske posode. Tla smo prelili z 0,01 M raztopine CaCl₂ (v razmerju 1:5 v/v), ki smo jo pripravili z raztopljanjem 1,47 g CaCl₂·2H₂O v 1 L dH₂O. Vzorce smo 5

min stresali na stresalniku pri 200 obratih min^{-1} in jih pustili počivati v odprtih posodah 20 ur. Neposredno pred meritvijo smo vzorce ročno dobro pretresli, nato pa v suspenziji izmerili pH s pomočjo vnaprej umirjenega pH metra.

3.5.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta tal (CEC- cation exchange capacity)

Zračno suha tla smo presejali skozi 2 mm sito, stehtali 10 g in prelili s 100 mL raztopine 1M amonoacetata, vzorec premešali ter ga pustili stati preko noči. Naslednji dan smo vzorce 1 uro stresali na stresalniku. Suspenzijo smo prefiltrirali in v filtratu izmerili vsebnost Ca in Mg z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS) ter Na in K na plamenskem emisijskem spektrometru. Izmenljivo kislost v tleh smo določili po Melichovi metodi, modificirani po Peechu. Zračno suha tla ($< 2 \text{ mm}$) smo stehtali (10 g) in prelili s 100 mL ekstrakcijske raztopine (0,5 M BaCl_2 in 0,055 M trietanolamina pri $\text{pH } 8,0 \pm 0,02$). Vzorec smo premešali, pustili stati preko noči ter naslednji dan po 1 uri stresanja filtrirali. Odpipetirali smo 20 mL, dodali dve kapljici mešanega indikatorja bromkrezol in metilrdeče in titrirali z 0,1 M HCl do rahlo vijoličaste barve. Vzporedno smo naredili slepi vzorec ter iz uporabljenega volumna kisline za talni izvleček in slepi vzorec izračunali vsebnost H^+ ionov ($\text{mmol}_\text{c} 100\text{g}^{-1}$ tal). CEC predstavlja vsoto izmenljivih kationov (bazično delujocih Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ in Na^+ , ter kislo delajočih kationov, med katerimi je najpomembnejši H^+ , pa tudi Al^{3+} , ki lahko povzroči nastanek H^+) in je odvisna od deleža gline, vsebnosti organske snovi ter železovih, manganovih in aluminijevih oksidov; običajno je v območju med 20 in 40 $\text{mmol}_\text{c} 100 \text{ g}^{-1}$ tal (Grčman in Zupan, 2010). Meritve izmenjevalne kapacitete tal je opravil laboratorij CPVO.

3.5.4 Organska snov, C/N razmerje in rastlinam dostopni fosfor

Organsko snov v tleh smo določili s pomočjo Walkley- Black metode, ki temelji na oksidaciji organske snovi v raztopini kromove in žveplene kisline. Zračno suha tla (2 mm) smo zatehtali (odvisno od vsebnosti organske snovi - od 0,05 g za humozna tla do 2 g za tla z manj kot 1 % humusa) v 200 mL bučko. Vzorec smo prelili z 10 mL 1 N kalijevega dikromata in z bučko rahlo pretresli. Nato smo dodali 20 mL koncentrirane žveplove kisline in narahlo mešali 1 min, s čimer smo zagotovili temeljiti kontakt reagentov s tlemi. Vzorec smo pustili stati 20 min. Po 20 min smo bučko dopolnili do 20 mL z dH_2O . Odpipetirali smo 20 mL vzorca, dodali 1 mL 85 % fosforne kisline in 0,2 g Na- fluorida; za tem smo dodali 3 kapljice difenilamina, narahlo premešali in suspenzijo titrirali z raztopino 0,5 N fero-amonsulfata. Pripravili smo tudi slep vzorec oz. kontrolo (vzorec brez tal). Na podlagi volumna sulfata, porabljenega za prazen vzorec in za preiskovani vzorec, ter faktorja F (faktor F pa je odvisen od zatehte vzorca: za 0,05 g je 13,4; za 0,1 g je 6,7; za 0,2 g je 3,35; za 0,5 g je 1,34; za 1 g je 0,67; za 2 g je 0,335) smo izračunali vsebnost organske snovi v %.

Vsebnost celokupnega dušika in ogljika smo določili z uporabo C/N analizatorja Vario MAX CN; za potrebe analize smo stehtali po 1 g zračno suhega vzorca (presejanega < 2 mm) ter ga vstavili neposredno v analizator. Na podlagi dobljenih vrednosti celokupnega ogljika in dušika smo izračunali vsebnost, izraženo v % suhe snovi (s. s.).

Lahko dostopni fosfor smo določali skupaj s kalijem in sicer po amon-laktatni (AL) metodi Egner-Riehm-Dominga. V prvem delu smo ekstrahirali P in K s pomočjo AL-ekstrakcijske raztopine, ki je po sestavi $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ amonlaktat in $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ocetna kislina ($\text{pH}=3,7$). V drugem delu smo določili P kolorimetrično, K pa plamensko fotometrično. V reagentno plastenko smo stehtali 5 g vzorca tal (< 2 mm), prelili s 100 mL ekstrakcijske AL raztopine, zaprli in za 2 uri postavili na stresalnik. Ekstrakt smo prefiltrirali, pri čemer smo prvi del filtrata zavrgli. V ekstraktu smo P (10 mL) določili z razvijanjem modre barve z amonmolibdatom (1 mL) in redukcijskim sredstvom (1 mL) ter dodali še 15 mL vode in dobro premešali. Razvila se je modra barva kot posledica nastajanja fosfor-molibdatnega kompleksa; po 10 min po razvitju barve smo v vzorcih merili intenzivnost modre barve s spektrofotometrom (pri 580 nm). Standarde za umeritveno krivuljo smo pripravili na enak način kot talne vzorce.

Meritve organske snovi, C/N ter lahko dostopnega fosforja je opravil laboratorij Centra za pedologijo in varstvo okolja (CPVO).

3.6 ZADRŽEVALNA (POLJSKA) KAPACITETA TAL

Poljska kapaciteta tal je odvisna od velikosti talnih delcev ter vsebnosti organske snovi v tleh. Poljsko kapaciteto talnih vzorcev oz. količino vode, ki jo tla zadržijo v naravnih pogojih po namakanju in gravitacijskem precejanju smo določili tako, da smo v plastični kozarec (premer 5,5 cm, višina 6 cm) s perforiranim dnem, ki smo ga praznega stehtali, odmerili suha tla, do cca. 1 cm pod vrhom kozarca in si zapisali težo. Kozarce smo postavili na stojalo in jim dodajali vodo po kapljicah. Postopek vlaženja smo prekinili, ko je voda začela izhajati iz dna kozarca; kozarce smo pokrili s perforirano prozorno folijo in jih pustili stati naslednjih 24 h. Po enem dnevu smo kozarce s tlemi stehtali in iz zateht suhih ter namočenih tal izračunali poljsko kapaciteto tal.

3.7 VSEBNOST KOVIN

3.7.1 Določanje celokupnih vsebnosti kovin

Celokupne vsebnosti kovin v vzorcih smo določili po standardu ISO 11466 (1995). Zračno suhe talne vzorce smo najprej zmleli in potem presejali čez $160 \mu\text{m}$ sito. V 50 mL reakcijske posode smo stehtali 0,5 g talnega vzorca in ga prelili z 12 mL raztopine

zlatotopke: mešanice 37 % klorovodikove (HCl) in 65 % dušikove (HNO_3) kisline v razmerju 3:1 (vol). Vzorce smo kuhalili 30 min v mikrovalovni pečici in jih potem gravimetrično filtrirali (velikost por 2 μm), ter vzorce z dH_2O (deionozirano vodo) razredčili do skupnega volumena 50 mL.

Koncentracije kovin v vzorcih smo določili z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS), z uporabo mešanice zraka in acetilena. Za preverjanje učinkovitosti uporabljenih metod (QA/QC protokol) smo uporabili standardne referenčne materiale za medlaboratorijsko primerjavo (Wepal 2003.1 in Wepal 2005.1.1, HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Avstrija). Meje kvantifikacije Pb/Zn/Cu/Cd so znašale 0,1/0,01/0,03/0,02 mg L^{-1} .

Za določanje vsebnosti PSK direktno v tleh smo na terenu uporabljali prenosni aparat za rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF, Delta DS-4000, Olympus Innov-x, USA). Faktor, ki odraža razmerje med XRF in AAS meritvami za Pb znaša $(\text{mg L}^{-1})_{\text{XRF}} \times 0,779$.

3.7.2 Sekvenčna ekstrakcija kovin

Sekvenčne ekstrakcije so zanimive, ker povezujejo mobilnost kovin z oceno tveganja, definirajo porazdeljenost PSK med različnimi talnimi frakcijami in ločijo PSK na podlagi njihove fizikalno-kemijske povezanosti z drugimi komponentami tal, mobilnosti in biodostopnosti (Mulligan in sod., 2001). Porazdeljenost kovin med različnimi talnimi frakcijami smo določili z modificirano ekstrakcijsko shemo po Tessierju (Leštan in sod., 2003). Z različnimi ekstrakcijskimi raztopinami smo v zaporednih ekstrakcijskih postopkih izločali iz tal kovine, vezane na različne talne frakcije. Lahko topno frakcijo (I. sekvenco) smo ekstrahirali iz 1 g zračno suhih tal, zmletih in presejenih skozi 250 μm sito, z 10 mL dH_2O in stresanjem pri 400 obratih min^{-1} . Vzorce smo potem centrifugirali (pri 2500 obratih min^{-1} , 30 min) in supernatante odpipetirali v polipropilenske plastenke. Izmenljivo frakcijo kovin smo določili tako, da smo preostale talne vzorce po prvi ekstrakciji prelili z 10 mL 10 M raztopine $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ in stresali 2 ur, nato smo vzorce centrifugirali in odlili supernatant (II. sekvenca). Tretjo sekvenco oz. kovine, vezane na karbonate, smo določili z ekstrakcijo kovin iz preostalih talnih vzorcev iz II. sekvence z 10 mL 1 M NH_4OAc (pH 5). Vzorce smo stresali na stresalniku 5 ur, nato centrifugirali in odpipetirali supernatant. V IV. sekvenci (kamor uvrščamo kovine, vezane na železove in manganove okside) smo vzorcem dodali 20 mL 0,1 M $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ (pH 2), vzorce stresali 12 ur, nato pa ponovili postopek s centrifugiranjem in ločevanjem supernatanta. V nadaljevanju smo, da bi ločili V. sekvence oz. kovin, vezanih na organsko snov, vzorce prelili s 3 mL 0,02 M HNO_3 ter jih namestili v vodno kopel (85 °C). Vzorcem smo nato počasi (po 1 mL) dodajali 5 mL 30 % H_2O_2 ter jih sagrevali tako dolgo, da je ves H_2O_2 izhlapel. Nato smo dodali 15 mL 1 M raztopine NH_4OAc v 6 % HNO_3 ter vzorce stresali 30 min, jih centrifugirali in odlili

supernatant. Preostale vzorce smo s postopnim izpiranjem prenesli v posode za razklop z zlatotopko (VI. sekvenca oz. preostale kovine). Vzorce smo prelimi z 9 mL HCl in 3 mL HNO₃ ter jih kuhalo 30 min v mikrovalovni pečici. Dobljene raztopine smo gravimetrično filtrirali skozi filtre z velikostjo por 2,5 µm ter vzorce z dH₂O razredčili do skupnega volumna 50 mL. Po ločevanju vsake sekvence so vzorci spirani z dH₂O (prelimi smo jih z 10 mL dH₂O, stresali na stresalniku 10 min, centrifugirali, supernatant pa zavrgli).

3.8 EKSTRAKCIJSKI TESTI

3.8.1 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z 0,01 M CaCl₂

Za oceno fitodostopnosti kovin smo izvedli ekstrakcijo z 0,01 M CaCl₂. Raztopina je narejena tako, da ne povzroča raztopljanja karbonatov v tleh in posledičnega sproščanja vanje vezanih kovin, sprosti pa delež kovin, vezanih na Fe- in Mn-okside, ki sicer organizmom niso dostopni (Novozamsky in sod., 1993). Ekstrakcijsko raztopino 0,01 M CaCl₂ smo pripravili tako, da smo 1,470 g CaCl₂·2H₂O raztopili v 1L deionizirane vode. V 250 mL polipropilenske posode smo stehtali 5 g zračno suhih tal (< 2 mm) in jih prelimi s 50 mL 0,01 M CaCl₂ (pH 5,30–6,00). Posode smo 3 ure stresali na stresalniku pri hitrosti 120 obratov min⁻¹. Po končanem stresanju smo vzorce 10 min centrifugirali pri 3000 obr. min⁻¹. Koncentracije kovin (Pb, Cu, Cd in Zn) v vzorcih smo določili z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS), z uporabo mešanice zraka in acetilena.

3.8.2 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z 1M amonoacetatom (NH₄OAc)

Izmenljive kovine v tleh, ki so hkrati fitodostopne, smo določili z ekstrakcijo z 1 M amonoacetatom (Kalra in Maynard, 1991). Acetati imajo višjo kompleksirajočo sposobnost kot kloridi in nitrati ter učinkovito preprečujejo ponovno adsorpcijo pri ekstrakciji (Hooda, 2010). 1 M ekstrakcijsko raztopino NH₄OAc smo pripravili tako, da smo v približno 800 mL deionizirane vode raztopili 77,08 g amonoacetata in z ocetno kislino uravnnavali pH raztopine na vrednost 7, potem smo merne posode dopolnili do 1 L z deionizirano vodo. Pet g zračno suhih tal, presejanih čez 2 mm sito, smo prelimi z 50 mL ekstrakcijske raztopine NH₄OAc in jih 1 uro pri sobni temperaturi stresali na stresalniku pri hitrosti 150 obr. min⁻¹. Po končanem stresanju smo suspenzije vakuumski filtrirali (Whatman, velikost por 2,5 µm) in v filtratu izmerili koncentracije kovin (Pb, Cu, Cd in Zn), z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS), z uporabo mešanice zraka in acetilena.

3.8.3 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z DTPA

Biodostopen del kovin v tleh smo tudi določili z uporabo ekstrakcije z

dietilentriaminpentaocetno kislino (DTPA). Lindsay in Norvell (1978) sta razvila metodo, ki je sicer prvotno namenjena določanju mikronutrientov kovin, kot so Zn, Fe, Mn in Cu v karbonatnih tleh in je bila kasneje uporabljana za določanje indeksa biodostopnosti neesencialnih kovin (Cd, Cr, Pb, Ni) (Wong in sod., 2001; Antoniadis in sod., 2007; Menzies in sod., 2007; Owojori in sod., 2010). Ekstrakcija omogoča tudi sproščanje dela kovin vezanih na Fe- in Mn- okside, ki so sicer nedostopni organizmom.

Za pripravo 10 L ekstrakcijske raztopine smo v približno 200 mL deionizirane vode (dH_2O) raztopili 149,2 g TEA (reagent grade p.a.), 19,67 g DTPA in 14,7 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, nato pa nivo dopolnili do volumna 9 L. Po potrebi smo uravnavali pH vrednost raztopine na $7,30 \pm 0,05$ z razredčeno solno kislino (HCl , 1:1 N). Ekstrakcijsko raztopino smo dopolnili do skupnega volumna 10 L. Deset g zračno suhih in presejanih tal ($< 2 \text{ mm}$) smo stehtali v 125 mL plastične posode in prelimi z 20 mL ekstrakcijske raztopine, potem jih skupaj stresali 2 uri na stresalniku pri $120 \text{ obr. min}^{-1}$. Suspenzijo smo gravimetrično filtrirali (Whatman, velikost por $2,5 \mu\text{m}$) in v filtratu izmerili koncentracije kovin (Pb, Cu, Cd in Zn), z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS), z uporabo mešanice zraka in acetilena.

3.8.4 Določanje biodostopnosti kovin z ekstrakcijo z EDTA

Ocenio mobilnosti kovin v tleh oz. njihovega potenciala, da se sprostijo v okolje, zaradi česa bi se onesnaženje razširilo, smo določali z »izpiralnim testom« oz. ekstrakcijo z 0,05 M EDTA (Kosson in sod., 2002). Za pripravo ekstrakcijske raztopine, 0,05 M EDTA smo raztopili 18,61 g EDTA v 1 L deionizirane vode. Stehtali smo 0,8 g zračno suhih in presejanih tal ($< 2 \text{ mm}$) in jih prelimi z 80 mL ekstrakcijske raztopine EDTA. Suspenzija mora imeti pH vrednost $7,5 \pm 0,05$, zato smo jo po potrebi uravnavali s kislino (HNO_3 , 2M) ali bazo (KOH , 1M). Posode z vzorci smo 48 ur stresali na rotacijskem stresalniku pri 20 obr. min^{-1} . Vzorce smo nato vakuumsko filtrirali (Whatman, velikost por $2,5 \mu\text{m}$) in v filtratu izmerili koncentracije kovin (Pb, Cu, Cd in Zn) z uporabo atomske absorpcijske spektrometrije (Varian AA240FS), z uporabo mešanice zraka in acetilena.

3.9 ENCIMSKI TESTI

3.9.1 Dehidrogenazna aktivnost

Dehidrogenazno aktivnost smo določili po metodi Thalmann (1968), ki temelji na redukciji trifeniltetrazolijevega klorida (TTC) v trifenilformazan (TPF). 5 gramov svežih tal smo stehtali v 60 mL reakcijske epruvete, prelimi s 5 mL raztopine TTC in premešali. Zaprte epruvete smo inkubirali 24 h v temi pri 37°C . Spleti vzorec smo pripravili na isti način, le brez tal. Razviti TPF smo izlužili z dodajanjem 40 mL acetona in ponovnim inkubiranjem

v temi (2 h, 30 °C). Epruvete smo v intervalih pretresli. Po poteku inkubacijskega časa smo talne suspenzije filtrirali (skozi Whatmanov folter z velikostjo po 2 µm) in spektrofotometrično izmerili TPF v filtratu pri valovni dolžini 546 nm. Rezultate smo izračunali kot razviti TPF (μg) g^{-1} suhih tal in jih podali kot povprečno vrednost pet meritev s standardno deviacijo.

3.9.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost

Določanje aktivnosti kislih in bazičnih fosfomonoesteraz smo izvedli po metodi Tabatabaia in Bremnerja (1969). En gram svežih tal smo stehtali v 250 mL erlenmajerice in jih prelili z 0,25 mL toluena, 4 mL univerzalnega modificiranega pufra (MUB s pH vrednostjo 6,5 za kisle oz. pH 11 za bazične fosfataze) ter 1 mL p- nitrofenilfosfatne raztopine (0,115 M). Zaprte vzorce smo stresali 1 uro pri 37 °C; po inkubaciji smo vzorcem dodali 1 mL 0,5 M CaCl₂ ter 4 mL 0,5 M NaOH. Vzorce smo nemudoma gravimetrično filtrirali preko Whatmanovega filtra z velikostjo por 2 µm. Nastali p-nitrofenol v vzorcih smo spektrofotometrično določili pri valovni dolžini 400 nm glede na slepi vzorec in pripravljeno umeritveno krivuljo. Kontrole smo pripravili po enakem postopku, le da smo pred filtracijo dodali še 1 mL p-nitrofenilfosfatne raztopine (15 mM). Rezultate smo izražali kot nastali p- nitrofenol (μg) g^{-1} suhih tal in jih podali kot povprečno vrednost petih meritev s standardno deviacijo.

3.9.3 β - glukozidazna aktivnost

Določanje β - glukozidazne aktivnosti v tleh smo izvedli na podlagi nastajanja p- nitrofenola po inkubaciji tla (1 h pri 37 °C) s p- nitrofenil glukozidom (PNG) kot substratom (Eivazi in Tabatabai, 1988). En gram svežih tal smo odmerili v 50 mL erlenmajerico; prelili s 0,25 mL toluena, 4 mL modificiranega pufra (MUB, pH 6,5) in 1 mL PNG ter po mešanju inkubirali 1h na 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 1 mL 0,5 M raztopine CaCl₂ in 4 mL Tris pufra (pH 12) ter premešali in suspenzijo prefiltrirali skozi Whatmanov filter (2 µm). Intenzitetu barve oz. nastali p- nitrofenol smo izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 400 nm glede na slepi vzorec in pripravljeno umeritveno krivuljo. Rezultate smo izražali kot nastali p- nitrofenol (μg) g^{-1} suhih tal in jih podali kot povprečno vrednost petih meritev s standardno deviacijo.

3.10 SUBSTRATNO (GLUKOZNO) INDUCIRANO DIHANJE

Komercialno opremo OxiTop Control (WTW, Wilheim, Germany) smo uporabljali za določanje s substratom (z glukozo) inducirane dihanja (SIR) v svežih tleh. Tla, uporabljana v poskusih (količina, ki odgovarja 100 g suhih tal), smo odmerili v steklene posode in navlažili do 90 % poljske kapacitete. V plastični kozarec smo odmerili cca. 20

mL 25 % NaOH, ga postavili v stekleno posodo z stehtanimi tlemi in posode zaprli s posebnimi plastičnimi nastavki za merjenje tlaka. Inkubacija je potekala 24 h pri 20 °C. SIR smo izmerili manometrično, z alkalno (25 % NaOH) absorpcijo CO₂, ki je nastal v času inkubacije (Zimakowska-Gnoinska in Bech, 2000); rezultati so podani v µmol proizvedenega CO₂ v 1 g tal po 24 h inkubacije pri 20 °C kot povprečne vrednosti štirih meritev s standardno deviacijo.

3.11 UBM TEST

Za oceno oralne biodostopnosti PSK v človeški organizem smo izvedli t. i. UBM test (UBM procedure ..., 2012; Wragg in sod., 2011). Protokol vsebuje dva vzporedna postopka ekstrakcije in simulira kemijske procese, ki se odvijajo v ustih, želodcu in črevesju, z uporabo sintetičnih prebavnih raztopin in upoštevanjem zadrževalnih časov.

UBM postopek simulira človeški gastro- intestinalni trakt skozi 3 različne frakcije: usta (5 min), želodec (1 h) in črevesje (4 h). Za vsak talni vzorec pridobimo dve biodostopni frakciji: prvo po izteku želodčne faze in drugo na koncu črevesne faze. Tekom prvega procesa ekstrakcije, ki simulira le želodčno fazo, presejane (< 250 µm) suhe talne vzorce (0,6 g) prelijemo z 9 mL ratopine sline (pH 6,5±0,5). Po 10 s ročnem stresanju vzorcev, dodamo še 13,5 mL želodčne raztopine (pH 1,1±0,1) in pH raztopine v vzorcih uravnamo na vrednost 1,2±0,05 s 37 % HCl ali 1 M NaOH. Vzorce inkubiramo 1 h pri 37 °C pri rotacijskem mešanju (simulacija peristaltike). Po izteku inkubacije preverimo pH vrednost; v kolikor je v območju 1,2-1,5, nadaljujemo s postopkom, v kolikor pH vrednost ni ustrezna, postopek ponovimo od začetka. Za določanje želodčne frakcije suspenzije z ustrezno pH vrednostjo centrifugiramo (15 min pri 4 500 g). Odpipetiramo supernatant, dodamo 0,5 mL HNO₃ (67 %) in vzorec do izvajanja meritev koncentracije PSK s pomočjo AAS hranimo pri temperaturi pod 4 °C. Za simulacijo črevesne faze uporabimo vzporedno pripravljene vzorce za določanje želodčne frakcije, ki jim dodamo 27 mL črevesne raztopine (pH 7,4±0,2) in 9 mL žolčne raztopine (8,0±0,2) ter pH suspenzij uravnamo na 6,3±0,5. Vzorce 4 h inkubiramo na rotacijskem mešalu v vodni kopeli s temperaturo 37 °C. Po izteku inkubacije suspenzije centrifugiramo in do opravljanja meritev PSK hranimo pri temperaturi pod 4 °C.

Oralno dostopnost PSK lahko izrazimo kot razmerje med izluženo koncentracijo PSK v želodčni oz. črevesni fazi in pseudototalno koncentracijo PSK, določeno v ekstrakciji z zlatotopko. Vsak vzorec smo izvedli v treh ponovitvah, pripravili smo tudi slepi vzorec.

3.12 RAZGRADNJA Na₃EDDS

V plastične kozarce (premer 7 cm, višina 9,5 cm) smo stehtali po 15 g zračno suhih tal

vzorca Mx, presejanih skozi 5 mm sita, pri čemer smo določenemu številu vzorcev dodali 5 % glukoze in 2 % amonijevega nitrata; istemu številu vzorcev smo dodali 5 % melase (Tovarna sladkorja Sunoko, Vrbas, Srbija; vsebnost saharoze 49,7 %, pH=7,45). Vsakemu izmed vzorcev smo dodali še 10 mmol kg⁻¹ Na₃EDDS, raztopljenega v volumnu vode, ki ustreza 105 % poljske kapacitete tal. Vzorce brez dodanih hranil smo tretirali z 10 mmol kg⁻¹ Na₃EDDS, raztopljenem v volumnu, ki je ustreza 80 % oz. 105 % poljski kapaciteti. Vzorce smo inkubirali 42 dni, ves čas inkubacije smo preverjali koncentracijo Pb v vzorcih z namenom ugotavljanja, koliko Pb se mobilizira z Na₃EDDS, oz. kako hitro se Na₃EDDS razgradi. Vzorcem smo po določenem času inkubacije dodali 100 mL dH₂O, jih stresali 30 min pri 170 obr. min⁻¹, centrifugirali (15 min, 3 500 obr. min⁻¹) in na koncu prefiltrirali (Whatman 2,5 µm). Koncentracije Pb smo merili s pomočjo AAS.

3.14 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

Statistično značilne razlike med rezultati, dobljenimi v remediranih in neremediranih tleh ter primerjavo rezultatov pred inkubacijo deževnikov in po njej smo določili z Duncanovim testom ($p < 0,01$) v programu Statgraphics 4.0.

Rezultate, dobljene z analizami stabiliziranih tal (Podklošter), z istimi količinami različnih aditivov (s 5 % w/w hidroksiapatita in 5 % w/w Slovakita) smo primerjali s kontrolo. Statistično značilne razlike med rezultati stabiliziranih tal in kontrole smo označili z velikimi tiskanimi črkami (A, B, C); v kolikor razlik nismo opazili smo napisali iste črke (A, A, A). V kolikor je posamezni rezultat vseboval značilnosti dveh, medsebojno statistično različnih rezultatov, smo to označili s kombinacijo črk (AB). Rezultate pridobljene po inkubaciji deževnikov, smo primerjali na isti način in statistično značilne razlike označili na isti način z uporabo majhnih črk (a, b, c) ali kombinacij črk. Mežiška tla smo statistično posebej obravnavali in smo zaradi tega uporabili tudi majhne črke (a, b, c) oz. kombinacijo črk, da bi določili statistično značilne razlike med različno obravnavanimi tlemi (I., II., III. in IV.). Vse vrednosti kemijskih in bioloških testov so objavljene kot povprečne vrednosti treh oz. petih meritev. Spearman-ov korelacijski koeficient je preračunan med kemijskimi (pH tal, kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) tal, biodostopnost tal določena v ekstrakcijah z dietilendiaminpentaocetno kislino (DTPA), etilendiamintetraocetno kislino (EDTA), amononijevim acetatom in kalcijevim kloridom ter s sekvenčno ekstrakcijo (vsota vodotopne in izmenljive talne frakcije)) in biološkimi parametri (z glukozo inducirano dihanje (S.I.R.), kisle in bazične fosfataze, β - glukozidaze in dehidrogenaze) v kontrolnih tleh in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % Slovakita (w/w). Spearman-ov koeficient je izračunan v programu SPSS 15. Da je $p < 0,05$ (oz. 0,01) pomeni, da je korelacija statistično značilna pri stopnji 0,05 (oz. 0,01) oz. da z manj kot 5 % tveganjem lahko zavrnemo ničelno hipotezo o nepovezanosti spremenljivk.

4 REZULTATI

V tabelah in grafih so posamezna tla prikazana z okrajšavami: črka označuje tla, arabska številka utežnostni odstotek dodanega aditiva in rimska številka pa različna obravnavanja (velja le za mežiška tla).

Preglednica 3: Seznam okrajšav analiziranih talnih vzorcev
Table 3: List of abbreviations of analysed soil samples

Tla iz Podkloštra	Mežiška tla
K- kontrolna tla, brez dodatka aditiva	Mx/My/Mz- kontrolna mežiška tla
A- tla, stabilizirana s hidroksiapatitom	Različna tretiranja tal:
S- tla, stabilizirana z Slovakitom	I- voda (105 % poljske kapacitete tal)
K/A/S- Lt- tla, v katerih smo inkubirali deževnike vrste <i>L. terrestris</i>	II- 5 % hidroksiapatita, voda (105 % poljske kap.)
K/A/S- Dv- tla, v katerih smo inkubirali deževnike vrste <i>D. veneta</i>	III- 5 % melase in 10 mmol kg ⁻¹ Na ₃ EDDS (v volumnu vode od 105 % polj. kapacitete) IV- 5 % hidroksiapatita, 5 % melase in 10 mmol kg ⁻¹ Na ₃ EDDS (v volumnu vode od 105 % polj. kapacitete)

4.1 OSNOVNE PEDOLOŠKE ZNAČILNOSTI TAL PRED STABILIZACIJO IN PO NJEJ

V talnih vzorcih pred remediacijo in po njej oz. različnih talnih obravnavah ter pred inkubacijo deževnikov in po njej smo opravili meritve splošnih pedoloških lastnosti.

4.1.1 Tekstura tal

Tekstura tal je utežno razmerje med mineralnimi delci tal glede na njihovo velikost: največji so delci peska (2-0,05 mm), delci melja so veliki od 0,05-0,002 mm, medtem ko so glinasti delci najmanjši (< 0,002 mm) ter se obnašajo kot koloidi (Zupan in sod., 2008). Tla z ugodno teksturo vsebujejo vse frakcije z dovolj velikimi deleži, npr. ilovica (8-25 % gline, 28-50 % melja, 25-50 % peska), v njih so združene vse ugodne lastnosti posameznih frakcij (Brady in Weil, 2008).

Kontrolna tla iz Podkloštra so bila ilovnata (I), z dodajanjem različnih koncentracij aditivov (A in S) kot tudi z inkubacijo deževnikov se njihov teksturni razred ni spremenil. Lastnosti ilovnatih tal so počasno do srednje hitro vpijanje vode, dobra prepustnost, zmerna stopnja zadrževanja vode, dostopne rastlinam, so srednje primerna za obdelovanje, zelo podvržena eroziji in srednje rodovitna (Grčman in Zupan, 2010). Dodatek 5 % w/w

Slovakita je malenkostno znižal vsebnost gline, vsebnost gline pa se je nekoliko zvišala v tleh, remediranih s 5 % hidroksiapatita po inkubaciji deževnikov. Mežička tla smo uvrstili med meljasto ilovnata (Mx), ilovnata- meljasto ilovnata (My) ter ilovnata (Mz).

Pri pripravi kontrolnih in stabiliziranih tal smo iz tal odstranili vse velike delce (kamenje in druge primese) nad 5 mm.

Preglednica 4: Tekstura kontrolnih tal (iz Podkloštra) in tal, remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD.

Table 4: Soil texture in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 1, 2,5 and 5 % (w/w) hydroxyapatite and Slovakite, respectively, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*), as well as in non-amended Mežica's soils. The results are presented as means of three replicates ± SD.

	Pesek (%)	Melj (%)	Glina (%)	Teksturni razred
K	42,4±0,1	44,3±0,6	13,4±0,6	I
A1	42,9±2,6	43,4±2,0	13,7±0,7	I
A2,5	40,4±1,1	44,5±1,4	15,0±0,4	I
A5	43,2±1,5	42,2±2,0	14,5±0,8	I
S1	43,1±0,4	43,4±0,5	13,6±0,3	I
S2,5	43,7±1,1	43,1±1,0	13,2±0,2	I
S5	44,0±0,9	45,1±0,6	10,9±0,3	I
<i>L. terrestris</i>				
K	45,4±1,5	41,0±1,5	13,6±0,2	I
A5	40,4 ±1,3	44,2±1,0	15,4±0,4	I
S5	41,5 ±0,3	47,5±0,8	11,0±1,1	I
<i>D. veneta</i>				
K	43,6±0,4	43,4±0,6	13,1±0,2	I
A5	39,9±0,3	43,6±0,1	16,5±0,3	I
S5	45,7±1.0	43,1±0,9	11,1±0,2	I
Tla- Mežica				
Mx	29,5	53,4	17,1	MI
My	37,3	50,2	12,5	I-MI
Mz	38,5	46,9	14,6	I

4.1.2 pH vrednost

Kislost tal oz. pH tal, izražena kot aktivnost ali koncentracija H^+ ionov, prisotnih v talni raztopini, je glavna spremenljivka, ki vpliva na kemijske in biološke talne lastnosti. Močno vpliva na dostopnost tako hranil kot nevarnih snovi (tudi PSK) v korenine ter na aktivnost talnih mikroorganizmov (Brady in Weil, 2008). Glede pH vrednosti tla lahko razdelimo na: zmero alkalna (7,3-8,0), nevtralna (6,6-7,2), zmero kisla (5,6-6,5), kisla (4,6-5,5) in močno kisla (< 4,5). Glede na raziskave onesnaženosti tal RS v obdobju med 1989 in 2007, je povprečna pH vrednost naravnih tal v Sloveniji znašala $5,8 \pm 1,1$ (Zupan in sod., 2008).

Tla iz Podkloštra so bila zmero kisla (6,0-6,1); dodatek aditivov je povzročil dvig pH tal, učinek je bil najbolj očiten pri dodatku Slovakita. Dodajanje hidroksiapatita kontrolnim tlem v različnih koncentracijah je povzročil dvig pH vrednosti le pri dodatku 5 % w/w hidroksiapatita (6,2-6,3), medtem ko je Slovakit že pri 1 % w/w bistveno zvišal pH (6,9); porast je bil najizrazitejši pri dodatku 5 % w/w (pH 7,4). Prisotnost deževnikov (*L. terrestris* in *D. veneta*) je v vseh uporabljenih tleh (K, A5 in S5) izrazito znižal pH tal.

Kontrolna mežiška tla so bila v glavnem nevtralna (My in Mz) ali zmero alkalna (Mx) (Preglednica 5). Dodatek aditivov (A, S in CaSx) tlu Mx (pH 7,2) v tri različne koncentracije 1 %, 2,5 % in 5 % (w/w) ter v kombinaciji z vodo, 5 mM kg⁻¹ Na₃EDDS in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS (za vsak aditiv in za vsako koncentracijo posebej) je v glavnem povzročil zvišanje pH vrednosti tal; najizrazitejši porast pH smo zabeležili po dodatku Slovakita (pH 7,6-8,1) pri čemer smo najvišji pH izmerili pri koncentraciji 5 % in dodatku 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS. Hidroksiapatit je prav tako zvišal pH vrednost tal, a nekoliko manj učinkovito kot Slovakit (7,3-7,5). Najvišji pH smo ponovno izmerili pri dodatku 5 % hidroksiapatita in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS; dodatek CaSx ni povzročil značilne spremembe pH tal, edini značilen dvig pH smo izmerili pri dodatku 5 % CaSx (7,7) (rezultati niso prikazani). Pri različnih talnih obravnavah mežiških tal je dodatek melase in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS, ter melase, hidroksiapatita ter 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS vsakič povzročil dvig pH vrednosti, medtem ko je dodatek hidroksiapatita zvišal pH le pri My in Mz tleh (Pregl. 5).

Preglednica 5: pH vrednost v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5% (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, ter v mežiških tleh po različnih talnih obravnavanj.

Table 5: pH value in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and Slovakite, respectively, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*), as well as in Mežica's soils, after different soil treatments.

	K	A5	S5	Mx	My	Mz
pH					pH	
Brez deževnikov	6,0-6,1	6,2-6,3	7,4	I	7,3	6,9
<i>L. terrestris</i>	5,1	5,8	7,2	II	7,3	7,1-7,2
<i>D. veneta</i>	5,0	5,8	7,3	III	7,4-7,5	7,7
				IV	7,4-7,5	7,6-7,7

4.1.3 Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC)

Kationska izmenjevalna kapaciteta je parameter, s katerim izražamo sposobnost tal za izmenljivo vezavo kationov v tleh, pri čem se zadržujejo tako koristne kot tudi nevarne snovi v tleh. Nasprosto velja, da je pri višji CEC tal v tleh prisotna višja koncentracija kovin, ki jih tla lahko zadržujejo brez potencialnih nevarnosti (Grčman in Zupan, 2010).

Po dodatku aditivov smo zabeležili porast CEC v primerjavi s kontrolo, ki je bil bolj izrazit v tleh, remediranih z dodatkom 5 % w/w Slovakita (Preglednica 6). Deževniki so povzročili zvišanje CEC v kontrolnih tleh, v A5 tleh je *L. terrestris* zvišal CEC, v S5 tleh pa je *D. veneta* povzročil znižanje CEC. Mežiška tla so imela približno iste vrednosti CEC (Preglednica 6).

Preglednica 6: Kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovaka pred in po inkubaciji deževnikov (*L. terrestris* in *D. veneta*) ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med CEC v remediranimi in kontrolnimi tlemi, majhne črke pa statistično značilne razlike med CEC tleh brez deževnikov in tleh po inkubaciji s deževniki (Duncan, $p < 0,01$).

Table 6: Cationic exchange capacity (CEC) in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 1, 2,5 and 5 % (w/w) hydroxyapatite and Slovakite, respectively, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*), as well as in Mežica's soils. The results are presented as means of three replicates ± SD. Different big letters denote statistically significant differences between CEC before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between CEC in soils before and after exposure to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

	Brez deževnikov	<i>L. terrestris</i>	<i>D. veneta</i>
CEC (mmol _c 100 g ⁻¹)			
K	^{Aa} 14,5±0,2	^c 17,1±0,1	^b 16,7±0,1
A1	13,8±0,3		
A2,5	13,5±0,2		
A5	^{Ba} 17,0±0,1	^b 18,0±0,3	^a 16,9±0,1
S1	17,2±0,7		
S2,5	22,3±0,3		
S5	^{Ca} 28,0±0,5	^a 28,8±0,0	^b 27,1±0,2
Mx	33,1		
My	36,6		
Mz	29,3		

4.1.4 Organska snov, C/N razmerje in rastlinam dostopni fosfor

Delež organske snovi v tleh je razmeroma majhen (2-10 %), vendar bistveno vpliva na fizikalne, kemijske in biološke lastnosti tal, predvsem v površinski plasti. Organska snov izvira iz ostankov rastlinskega in živalskega materiala, ki ga v tleh preoblikujejo (humificirajo) mikroorganizmi in se razgrajuje pod vplivom temperature, vlažnosti in okoljskih talnih pogojev (The State of ..., 2012).

Tla predstavljajo drugi največji rezervoar ogljika, takoj za oceani. Globalno naj bi bilo okoli 2400×10^{15} g ogljika uskladiščenega v talnih profilih kot organska snov, kar je približno dvakrat več, kot v celotni vegetaciji in atmosferi.

Dušik je najpomembnejše hranilo v tleh, ki pa ga je najtežje nadzorovati. Kljub temu, da ima bistven pomen za sodobno kmetovanje, lahko predstavlja tudi resno grožnjo za okolje (onesnaženje podtalnice, eutrofikacija površinskih vod, nastanek kislega dežja, tanjšanje

ozonske plasti) ter za zdravje človeka in živali (zastrupitev z nitrati, metemoglobinemija, razvoj raka). Dušik je v tleh v glavnem prisoten kot del organskih molekul; je zelo dinamičen element, ki je podvržen tako biokemijskim kot kemijskim transformacijam (dušikov cikel) (Pierzynski in sod., 2005; Brady in Weil, 2008).

Na hitrost razgradnje organske snovi vpliva vsebnost hranil v tleh, predvsem dušika, ter razmerje ogljika in dušika v tleh (Grčman in Zupan, 2010). Razmerje C/N je za večino tal relativno konstantno (12:1), kar pomeni da je nivo organske snovi deloma določen z vsebnostjo N, dostopnega za asimilacijo v humus (Brady in Weil, 2008).

Fosfor je esencialni element, ki je takoj za dušikom drugi po pomembnosti glede svojega vpliva na produktivnost in zdravje kopenskih in vodnih ekosistemov. V tleh je običajno prisoten v zelo majhnih količinah, ki pogosto niso lahko dostopne; pomanjkanje P lahko povzroči degradacijo tal. Po drugi strani z namenom zvišanja količine esencialnega fosforja v tleh ljudje pogosto dodajamo prevelike količine fosfatnih gnojil, kar s spiranjem tal privede do resne ogroženosti vodnih ekosistemov (eutrofikacija površinskih vod). (Brady in Weil, 2008). Komposti, organski odpadki ter živalska gnojila vsebujejo v primerjavi s komercialnimi gnojili relativno nizke koncentracije fosforja (med 0,1 in 3 %); pri slednjih je neustrezno predvsem razmerje med dušikom in fosforjem (N:P), zaradi česa lahko pride do prevelike uporabe P v primeru, ko se takšni organski viri P uporabljajo tudi za izpolnjevanje zahtev pridelkov po dušiku (Pierzynski in sod., 2005).

V našem poskusu remediacija ni značilno vplivala na vsebnost organske snovi. Tudi deževniki niso bistveno spremenili deleža organske snovi, razen v primeru inkubacije *Z. terrestris* v kontrolnih tleh (zvišanje OS) in v tleh, remediranih s 5 % w/w Slovakita (znižanje OS). Vrednosti razmerja C/N so bile v območju 8,3-10,2 pri kontrolnih in remediranih tleh (K, A5 in S5) in se je le značilno znižal (od začetnih 10,2) po dodatku Slovakita (8,3). Deževniki so večinoma povzročili znižanje C/N, tako v kontrolnih kot v remediranih tleh. Dodatek hidroksiapatita je povzročil pričakovano zvišanje fosfata, dostopnega rastlinam, največje pa po dodatku 5 % w/w hidroksiapatita; od začetne vrednosti $3,8 \pm 0,8$ se je koncentracija P_2O_5 povzpela na $572,3 \pm 6,8$ (Preglednica 7). Slovakit ni značilno vplival na vsebnost fosfatov. Deževniki so zvišali koncentracijo fitodostopnega fosforja v obeh remediranih tleh (A5 in S5), *D. veneta* pa bolj učinkovito v primeru tal S5.

Med mežiškimi tlemi je izstopal vzorec My z bistveno večjo vsebnostjo organske snovi in fosforja (Preglednica 7).

Preglednica 7: Organska snov, C/N in P₂O₅ v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih z 1, 2,5 in 5 % (w/w) hidroksiapatita in 1, 2,5 in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* ter v mežiških tleh. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med rezultati v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med rezultati tal brez deževnikov in tal po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01).

Table 7: Organic matter, C/N and P₂O₅ in non-amended soil and soils amended with 1, 2,5 and 5 % (w/w) hydroxyapatite and Slovakite, respectively, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*), as well as in Mežica's acid and alkaline soils. The results are presented as means of three replicates ± SD. Different big letters denote significant differences between the results before and after remediation, small letters denote statistically significant difference between results before and after soil exposure to earthworms (Duncan, p < 0,01).

	Brez deževnikov	<i>L. terrestris</i>	<i>D. veneta</i>
Organska snov (%)			
K	^{Aab} 3,7±0,2	^b 4,0±0,0	^a 3,3±0,0
A1	3,6±0,3		
A2,5	3,7±0,2		
A5	^{Aa} 3,6±0,1	^a 3,4±0,1	^a 3,5±0,0
S1	3,7±0,3		
S2,5	3,5±0,1		
S5	^{Ba} 3,1±0,1	^b 2,7±0,1	^a 3,2±0,1
Mx	9,1		
My	16,2		
Mz	6,9		
C/N			
K	^{Aa} 10,2±0,6	^b 8,7±0,2	^b 7,7±0,2
A1	9,0±0,7		
A2,5	9,2±0,8		
A5	^{Aa} 9,1±0,4	^b 7,9±0,2	^b 8,2±0,2
S1	9,9±1,0		
S2,5	9,8±0,3		
S5	^{Ba} 8,3±0,5	^b 6,4±0,1	^a 7,8±0,2
P₂O₅ (mg 100 g⁻¹)			
K	^{Aa} 3,8±0,8	^a 3,2±0,1	^a 4,1±0,1
A1	233,0±6,2		

se nadaljuje

nadaljevanje

	Brez deževnikov	<i>L.terrestris</i>	<i>D.veneta</i>
P_2O_5 (mg 100 g ⁻¹)			
A2,5	421,0±3,6		
A5	^{Ba} 572,3±6,8	^b 723,2±4,7	^b 725,0±16,5
S1	5,8±0,8		
S2,5	5,9±0,5		
S5	^{Aa} 5,3±0,3	^b 7,6±0,6	^c 14,3±0,8
Mx	5,7		
My	163,7		
Mz	80		

4.1.5 Zadrževalna (poljska) kapaciteta tal

Zadrževalna (poljska) kapaciteta tal je količina vode, ki se lahko obdrži v kapilarnih prostorih v tleh po pronicanju vode v globlje plasti tal. Odvisna je od velikosti talnih delcev ter vsebnosti organske snovi v tleh. Peščena tla imajo zelo nizko zadrževalno kapaciteto, medtem ko imajo glinena tla visoko. Zadrževalna kapaciteta tal oz. količina vode, ki jo tla zadržijo v naravnih pogojih po namakanju in gravitacijskem precejanju, je za vzorec Mx znašala 0,6596 mL g⁻¹, za My 0,468 mL g⁻¹, za Mz pa 0,5452 mL g⁻¹ tal.

4.2 VSEBNOST PSK V TLEH

4.2.1 Celokupne vsebnosti PSK v tleh določene z zlatotopko

Celokupne vrednosti kovin smo primerjali z vrednostmi kovin, predpisanih v Uredbi o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (Ur. L. RS, 68/96). V Uredbi so predpisane normativne vrednosti za 10 kovin: mejne imisijske vrednosti (predstavljajo naravno ozadje ali takšno obremenitev, pri kateri se ne poslabšuje kakovost podtalnice in rodovitnost tal), opozorilne vrednosti (pomeni pri določenih vrstah rabe verjetnost negativnih učinkov na zdravje ljudi in okolja) in kritične vrednosti (pomeni, da tla niso primerna za pridelavo rastlin za ljudi ali živali oz. filtriranje vode).

Koncentracije Pb so bile pred remediacijo in po njej (stabilizacija v bistvu ne spremeni celokupno koncentracijo PSK) nad kritično vrednostjo, Zn in Cd med opozorilno in kritično oz. nad kritično za My in Mz, Cu večinoma pod mejno vrednostjo. Deževniki niso značilno spremenili koncentracije Pb in Zn, koncentracija Cu se je zvišala pod vplivom deževnikov v kontrolnih tleh, medtem ko je koncentracija Cd v tleh v glavnem upadla

zaradi vplivov deževnikov, ne glede na tretma tal.

Preglednica 8: Celokupne koncentracije PSK v kontrolnih tleh (Podklošter in Mežica) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakite, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami iste kovine v remediranih tleh in v kontroli, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji s deževniki (Duncan, p < 0,01).

Table 8: Pseudototal metal concentrations in non-amended soil (Arnoldstein and Mezica) and soils amended with 5% (w/w) hydroxyapatite and Slovakite, respectively, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). The results are presented as means of three replicates ± SD. Different big letters denote statistically significant differences between same metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, p < 0,01).

	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
K	^{Bab} 790,0±11,8	^{Ba} 489,4±6,3	^{Aa} 60,0±0,5	^{Ab} 6,3±0,4
K- Lt	^b 833,4±31,5	^a 500,8±5,6	^b 65,9±0,4	^{ab} 5,8±0,1
K- Dv	^a 738,3±30,1	^a 527,5±31,9	^{ab} 62,3±2,9	^a 5,4±0,2
A5	^{Aa} 735,9 ± 9,1	^{Ab} 455,6±13,1	^{Aa} 56,7±1,7	^{Ab} 6,5±0,2
A- Lt	^a 750,5±19,9	^b 431,1±9,1	^b 61,4±1,1	^a 5,3±0,1
A- Dv	^a 718,5	^a 375,4	^a 53,7	^a 5,1
S5	^{Aa} 723,8±14,3	^{Aa} 450,4±6,5	^{Aa} 57,0±1,4	^{Ab} 5,9±0,2
S- Lt	^a 688,1±15,6	^a 439,9±25,9	^a 60,1±3,9	^a 4,9±0,3
S- Dv	^a 701,1	^a 423,7	^a 55,0	^a 4,8
Mx	786,8±28,6	425,9±6,0	24,2±0,7	4,6±0,4
My	1883,2±34,1	1039,3±17	40,4±1,4	13,8±0,3
Mz	4432,9±93	2762,5±55,5	58,4±3,9	28,2±0,6

Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale 0,1/0,01/0,03/0,02 mg L⁻¹

4.2.2 Celokupne vrednosti PSK v tleh določene z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo

Zaradi enostavne izvedbe in hitrosti določanja PSK, s katerim se izognemo postopku priprave vzorca za analizo (dekompozicija in separacija vzorca), je rentgenska fluorescenčna spektrometrija (XRF) posebej primerna za uporabo na terenu (Hooda, 2010).

Izbrane točke v Mežiški dolini smo vzorčili po različnih globinah. Koncentracije PSK smo izmerili s pomočjo XRF-a (X- žarkovnega indikatorja) v presejanih talnih vzorcih (< 2

mm). Koncentracija Pb je za končno izbrane vzorce znašala $1022\pm214 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mx, $1889\pm132 \text{ mg kg}^{-1}$ za My in $5381\pm249 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mz; koncentracija Zn je znašala $532\pm8 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mx, $1069\pm30 \text{ mg kg}^{-1}$ za My in $3278\pm75 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mz; koncentracija Cd je izmerjena $7\pm4 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mx, $29\pm0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ za My in $20\pm0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ za Mz. Spodne meje zaznave XRF za določene PSK znašajo: $< 5 \text{ mg kg}^{-1}$ za Pb in Zn ter $< 10 \text{ mg kg}^{-1}$ Cd.

4.2.3 Frakcionacija PSK v tleh

Z namenom določiti PSK frakcij v tleh in ločevati PSK glede njihovih fizikalno-kemijskih povezanosti z drugimi talnimi komponentami, mobilnosti in biodostopnosti, smo pri našem delu uporabili modificirano 6-stopenjsko Tessierjevo sekvenčno ekstrakcijsko shemo (Leštan in sod., 2003). V različnih talnih vzorcih smo določili 6 frakcij oz. sekvenc - vodotopno (I. sekvenca) in izmenljivo frakcijo (II. sekvenca) ter frakcijo, vezano na karbonate (III. sekvenca), Fe- in Mn-okside (IV. sekvenca), organsko snov (V. sekvenca) in rezidualno frakcijo (VI. sekvenca).

Pb je v kontrolnih tleh prevladoval vezan na organsko snov, nekoliko manjši delež je bil vezan na karbonate (III) in Fe- in Mn- okside (IV) ter v rezidualni frakciji (VI). Dodatek hidroksiapatita (A5) je povzročil statistično značilno ($p < 0,01$) povišanje koncentracije Pb zgolj v organski frakciji (V). Dodatek Slovakita (S5) je povzročil značilen upad koncentracij Pb v vodotopni (I) in izmenljivi (II) frakciji. Oba deževnika sta povzročila statistično značilno ($p < 0,01$) povišanje koncentracije Pb v izmenljivi frakciji (II) in frakciji organske snovi (V), ter znižanje v vodotopni (I) frakciji. Izkoristek Pb v K, A5 in S5 tleh je bil 87 %, 76 % in 85 % za tla brez deževnikov, 78 %, 101 % in 102 % po inkubaciji *L. terrestris* ter 102 %, 105 % in 100 % po inkubaciji *D. veneta*.

Najvišjo koncentracijo **Zn** v K tleh smo zabeležili v rezidualni frakciji (VI), nato v organski (V), najnižja pa v vodotopni (I) frakciji. Dodatek aditivov (A5 in S5) je vplival na bistven upad koncentracije Zn v izmenljivi frakciji (II); upadel je tudi v vodotopni (I), ter rezidualni (VI) frakciji. Dodatek hidroksiapatita je povzročil porast Zn v organski (V) frakciji, Slovakita pa v karbonatni (III). Deževniki so vplivali na znižanje koncentracije rezidualnega Zn in zvišanje organsko vezanega Zn; povzročili so porast izmenljivega Zn (II) v K in A tleh ter vodotopnega Zn (I) le v primeru kontrolnih tal. V S5 tleh sta obe vrsti deževnikov vplivali na statistično značilen ($p < 0,01$) upad vodotopnega in karbonatnega Zn (Preglednica 9). Izkoristek Zn je v K, A5 in S5 tleh znašal 96 %, 87 % in 92 % za tla brez deževnikov, 87 %, 91 % in 85 % po inkubaciji z *L. terrestris* ter 78 %, 104 % in 92 % po inkubaciji z deževniki *D. veneta*.

Koncentracija **Cu** v kontrolnih tleh je bila največja v rezidualni frakciji (VI), nato v organski (V) in frakciji vezani na Fe- in Mn- okside (IV). Dodatek aditivov ter inkubacija

deževnikov ni vplivala na vsebnost Cu. Bistveno znižanje koncentracije Cu smo zabeležili zgolj v frakciji, vezani na organsko snov po inkubaciji deževnikov vrste *D. veneta* za vse tri tipe uporabljenih tal. Izkoristek Cu je v K, A5 in S5 tleh znašal 91 %, 88 % in 88 % za tla brez deževnikov, 69 %, 68 % in 68 % po inkubaciji *L. terrestris* ter 68 %, 75 % in 75 % po inkubaciji *D. veneta*.

Največji del **Cd** je bil prisoten v izmenljivi (II) in karbonatni (III) frakciji ter vezan na Fe- in Mn- okside (IV). Dodatek aditivov je statistično značilno ($p < 0,01$) znižal koncentracijo Cd v izmenljivi (II) frakciji in jo bistveno zvišal v frakciji vezani na Fe- in Mn- okside (IV). Oba deževnika sta v kontrolnih tleh značilno znižala koncentracijo Cd v IV, V in VI frakciji; v A5 tleh smo zabeležili bistven upad Cd v III, IV in V frakciji, medtem ko je v S5 tleh statistično značilno ($p < 0,01$) znižal koncentracijo Cd v II, III in IV frakciji, še posebej izrazito v tleh kjer smo inkubirali deževnike vrste *L. terrestris*. Izkoristek Cd v K, A5 in S5 tleh je znašal 127 %, 115 % in 125 % za tla brez deževnikov, 61 %, 66 % in 79 % po inkubaciji *L. terrestris* ter 68 %, 66 % in 69 % po inkubaciji *D. veneta*.

Preglednica 9: Frakcionacija Pb, Zn, Cu in Cd v kontrolnih tleh (Podklošter) in v tleh remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatiita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, $p < 0,01$).

Table 9: Fractionation of Pb, Zn, Cu and Cd in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

	I*	II	III	IV	V	VI
Pb (mg kg ⁻¹)						
K	2,2 \pm 0,3 _{Aa}	10,3 \pm 0,5 _{Aa}	163,9 \pm 6,6 _{Aa}	135,9 \pm 24,2 _{Aa}	308,0 \pm 18,0 _{Aa}	65,6 \pm 1,9 _{Ab}
K-Lt	1,3 \pm 0,2 _b	21,6 \pm 0,5 _b	5,7 \pm 1,9 _b	178,6 \pm 2,0 _a	389,2 \pm 10,3 _b	53,9 \pm 0,7 _{ab}
K-Dv	1,4 \pm 0,1 _b	21,2 \pm 2,7 _b	162,1 \pm 41,1 _a	160,0 \pm 22,0 _a	367,4 \pm 3,0 _b	38,7 \pm 12,7 _a
A	1,5 \pm 0,3 _{Ba}	3,1 \pm 0,5 _{Ca}	12,3 \pm 0,4 _{Ba}	1,7 \pm 0,4 _C	488,0 \pm 9,0 _{Ba}	53,0 \pm 2,5 _{Ba}
A-Lt	1,0 \pm 0,3 _a	8,4 \pm 1,2 _b	9,1 \pm 0,1 _{ab}	LOQ	689,5 \pm 32,5 _b	51,4 \pm 0,1 _a
A-Dv	1,1 \pm 0,1 _a	8,2 \pm 0,3 _b	11,1 \pm 1,8 _{ab}	LOQ	694,6 \pm 43,1 _b	40,9 \pm 2,2 _b

se nadaljuje

nadaljevanje

	I*	II	III	IV	V	VI
Pb (mg kg⁻¹)						
S	1,1±0,2 Ba	4,6±0,6 Ba	168,0±3,9 Aa	73,8±8,5 Ba	310,1±9,7 Aa	61,5±3,0 Aa
S-Lt	LOQ	8,2±0,1 b	181,7±12,0 a	104,9±3,7 a	375,7±13,3 b	34,0±8,9 b
S-Dv	1,5±0,3 a	7,6±0,2 b	161,6±15,7 a	83,3±22,4 a	401,4±24,9 b	44,8±7,6 b
Zn (mg kg⁻¹)						
K	2,7±0,1 Aa	54,4±0,8 Aa	41,4±2,4 Aa	55,9±3,0 Aa	74,7±2,7 Aa	241,1±6,9 Aa
K-Lt	4,1±0,1 b	65,6±1,8 b	26,0±10,8 a	50,0±0,3 ab	87,6±2,6 b	203,5±4,8 b
K-Dv	4,1±0,1 b	70,5±0,9 c	27,2±5,5 a	44,6±31,1 b	78,1±1,1 a	187,7±10,8 b
A	1,3±0,5 Ba	6,0±0,2 Ba	21,0±0,3 Ba	33,1±1,4 Ba	113,0±8,6 Ba	223,2±4,9 Ba
A-Lt	0,4±0,1 a	8,5±0,3 b	18,3±0,7 b	35,7±4,4 a	142,0±5,7 b	188,1±6,1 b
A-Dv	0,3±0,1 a	9,6±0,5 c	21,1±0,3 a	31,1±2,3 a	143,4±5,3 b	184,9±3,2 b
S	0,7±0,0 Ba	0,8±0,2 Ca	51,3±1,5 Ca	59,7±1,9 Aa	77,6±1,1 Aa	224,5±2,6 Ba
S-Lt	0,1±0,0 b	1,0±0,1 a	40,5±2,5 b	58,3±3,8 a	87,2±1,90 ab	187,0±6,6 b
S-Dv	0,2±0,1 b	0,9±0,1 a	40,1±2,0 b	61,6±16,6 a	97,7±10,0 b	188,7±3,4 b
Cu (mg kg⁻¹)						
K	0,3±0,0 A	0,7±0,0 A	0,9±0,0 Aa	1,1±0,3 Aa	15,6±0,3 Aa	36,0±0,8 Aa
K-Lt	LOQ	LOQ	0,5±0,0 b	1,1±0,0 a	14,1±0,7 b	30,1±0,4 b
K-Dv	LOQ	LOQ	0,8±0,0 a	0,9±0,1 a	12,1±0,5 c	28,4±1,2 b
A	0,3±0,0 A	0,7±0,0 A	0,7±0,0 Ba	0,6±0,0 B	15,4±0,1 Aa	32,2±0,9 Ba
A-Lt	LOQ	LOQ	0,6±0,0 b	LOQ	14,0±1,3 ab	27,0±0,6 b

se nadaljuje

nadaljevanje

	I*	II	III	IV	V	VI
Cu (mg kg^{-1})						
A-Dv	LOQ	LOQ	$0,7\pm0,1$ ^a	LOQ	$12,9\pm0,4$ ^b	$26,5\pm0,4$ ^b
S	$0,3\pm0,0$ ^A	$0,9\pm0,0$ ^{Ba}	$1,0\pm0,0$ ^{Aa}	$0,8\pm0,1$ ^B	$14,0\pm0,1$ ^{Bc}	$32,9\pm0,5$ ^{Ba}
S-Lt	LOQ	$0,3\pm0,0$ ^b	$0,9\pm0,1$ ^{ab}	LOQ	$11,9\pm0,3$ ^a	$27,9\pm1,0$ ^b
S-Dv	LOQ	$0,5\pm0,0$ ^c	$0,8\pm0,0$ ^b	LOQ	$12,8\pm0,1$ ^b	$27,3\pm1,0$ ^b
Cd (mg kg^{-1})						
K	$0,5\pm0,0$ ^A	$2,3\pm0,0$ ^{Aa}	$1,9\pm0,1$ ^{Aa}	$1,6\pm0,1$ ^{Aa}	$0,7\pm0,1$ ^A	$1,0\pm0,1$ ^A
K-Lt	LOQ	$2,1\pm0,1$ ^b	$1,2\pm0,7$ ^a	$0,3\pm0,0$ ^b	LOQ	LOQ
K-Dv	LOQ	$2,2\pm0,0$ ^{ab}	$1,3\pm0,1$ ^a	LOQ	LOQ	LOQ
A	$0,4\pm0,3$ ^A	$1,0\pm0,1$ ^{Ba}	$1,0\pm0,0$ ^{Bc}	$1,8\pm0,1$ ^{Ba}	$2,4\pm0,0$ ^{Ba}	$0,9\pm0,1$ ^A
A-Lt	LOQ	$0,5\pm0,0$ ^b	$0,5\pm0,0$ ^a	$0,6\pm0,2$ ^b	$1,9\pm0,3$ ^b	LOQ
A-Dv	LOQ	$0,6\pm0,0$ ^b	$0,7\pm0,1$ ^b	$0,4\pm0,0$ ^b	$1,7\pm0,1$ ^b	LOQ
S	$0,37\pm0,04$ ^A	$0,7\pm0,0$ ^{Cc}	$2,7\pm0,0$ ^{Cb}	$1,8\pm0,1$ ^{Ba}	$0,6\pm0,0$ ^{Ab}	$1,2\pm0,2$ ^A
S-Lt	LOQ	$0,5\pm0,1$ ^a	$2,3\pm0,1$ ^a	$0,7\pm0,1$ ^a	$0,3\pm0,1$ ^a	LOQ
S-Dv	LOQ	$0,6\pm0,0$ ^b	$2,0\pm0,2$ ^a	LOQ	$0,5\pm0,1$ ^{ab}	LOQ

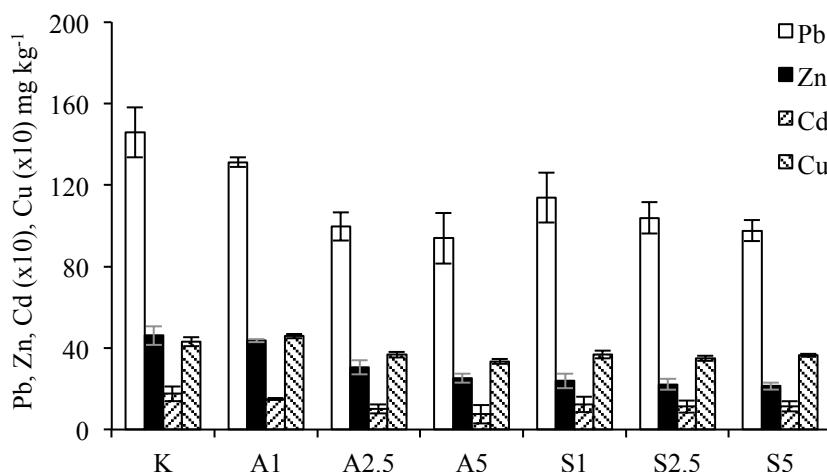
Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale $0,1/0,01/0,03/0,02 \text{ mg L}^{-1}$

* I vodotopna; II izmenljiva; III karbonatna; IV vezana na Fe in Mn- okside; V vezana na organsko snov; VI rezidualna frakcija.

4.3 MOBILNOST IN BIODOSTOPNOST PSK V TLEH

4.3.1 Določanje biodostupnosti PSK z metodo DTPA

Biodostopnost PSK (Pb, Zn, Cd, Cu) se je v tleh iz Podkloštra, tretiranih v začetnem poskusu, po dodatku aditivov znižala, najbolj očitno pri dodatku 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita (Slika 7).



Slika 7: Potencialna biodostupnost kovin v kontrolnih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s hidroksiapatitom in Slovakitom (vsaki v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w) določena v DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.

Figure 7: Metal potential bioaccessibility in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with hydroxyapatite and Slovakite (1 %, 2,5 % and 5 % w/w, respectively), assessed by DTPA extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD.

Po naših rezultatih sodeč je dodatek aditiva (A5 in S5) na splošno vplival na upad koncentracije PSK v tleh, izluženih z DTPA, razen v primeru Cu, kjer nismo zabeležili sprememb. Po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* je vedno prišlo do zvišanja koncentracije Cu; koncentracija Zn se je statistično značilno ($p < 0,01$) zvišala po inkubaciji deževnikov v kontrolnih tleh in tleh A5. Svinec se je po inkubaciji deževnikov statistično značilno zvišal le v primeru tal S5; kadmij pa v kontrolnih tleh (Preglednica 10).

Preglednica 10: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* po DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih tleh in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, $p < 0,01$).

Table 10: Metal concentrations in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*), obtained by DTPA extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

	Pb (mg kg⁻¹)	Zn (mg kg⁻¹)	Cu (mg kg⁻¹)	Cd (mg kg⁻¹)
K	^{Aa} 228,6 \pm 25,3	^{Aa} 57,8 \pm 4,9	^{Aa} 3,6 \pm 0,3	^{Aa} 2,0 \pm 0,2
K-Lt	^a 252,8 \pm 6,7	^b 79,1 \pm 1,1	^b 6,1 \pm 0,2	^b 2,5 \pm 0,0
K-Dv	^a 260,1 \pm 9,8	^b 80,7 \pm 1,1	^b 6,2 \pm 0,2	^b 2,5 \pm 0,1

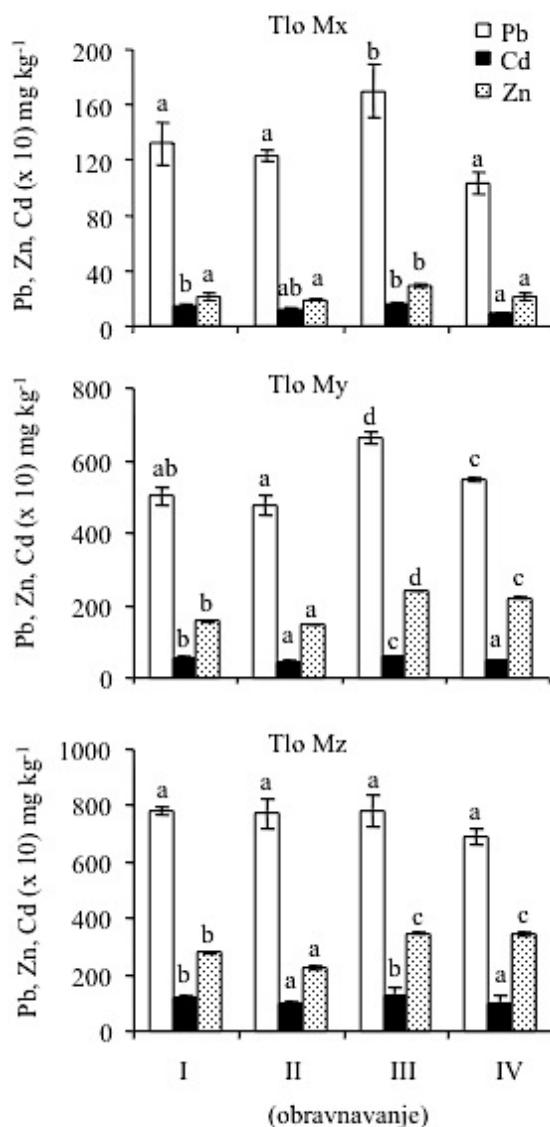
se nadaljuje

nadaljevanje

	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
A	^{Ba} 115,4±13,1	^{Ba} 31,1±3,9	^{Aa} 3,2±0,3	^{Ba} 1,0±0,1
A-Lt	^a 138,5±4,4	^b 39,1±1,5	^b 5,3±0,1	^a 1,1±0,0
A-Dv	^a 141,4±1,6	^b 40,0±0,6	^b 5,3±0,1	^a 1,1±0,0
S	^{Ba} 105,2±12,3	^{Ba} 26,2±4,1	^{Aa} 2,9±0,3	^{Ba} 1,2±0,2
S-Lt	^{ab} 130,3±7,3	^a 27,4±1,12	^b 4,4±0,1	^a 1,4±0,1
S-Dv	^b 140,8±3,1	^a 28,4±1,1	^b 4,5±0,2	^a 1,4±0,0

Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale 0,1/0,01/0,03/0,02 mg L⁻¹

Različne obravnave mežiških tal so povzročile porast koncentracij Pb le po dodatku melase in Na₃EDDS (III obravnava) v Mx in My tlu; koncentracija Cd je statistično značilno ($p < 0,01$) upadla po dodatku hidroksiapatita (II in IV obravnava); koncentracija Zn je upadla po dodatku hidroksiapatita (II), medtem ko se je po dodatku melase v obeh primerih (III in IV) povišala (Slika 8).

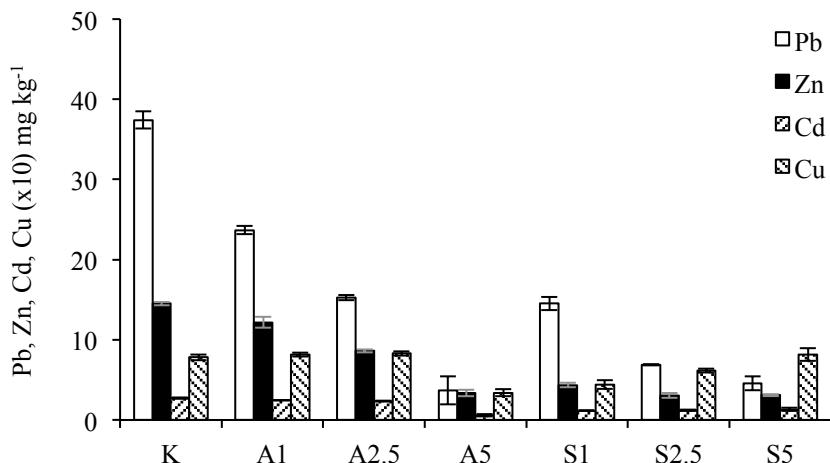


Slika 8: Potencialna biodostopnost kovin v mežiških tleh po različnih talnih obravnavanjih po DTPA ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v različno obravnavanih tleh (Duncan, $p < 0,01$).

Figure: Metal potential bioaccessibility assessed by DTPA extraction in Mežica's soils, after four different treatments, obtained by DTPA extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different letters denote statistically significant differences between the metal concentration in soil after four different soil treatment (Duncan, $p < 0,01$).

4.3.2 Določanje biodostopnosti PSK z metodo NH₄OAc

Za razliko od ekstrakcije z DTPA so bile koncentracije PSK v tleh iz Podkloštra v začetnem poskusu, pridobljene z ekstrakcijo z amonijevim acetatom, bistveno nižje (Slika 9). Zabeležili smo tudi pričakovani upad koncentracije PSK po dodatku aditivov (hidroksiapatita in Slovakita); učinkovitost je rasla z naraščanjem dodanih aditivov.



Slika 9: Potencialna biodostopnost kovin v kontrolnih tleh (Podklošter) in tleh remediranih s hidroksiapatirom in Slovaktom (vsaki v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w), določena v ekstrakciji s NH_4OAc . Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD.

Figure 9: Metal potential bioaccessibility in non- amended soil (Arnoldstein) and soils amended with hydroxyapatite and Slovakite (1 %, 2,5 % and 5 % w/w, respectively), assessed by NH_4OAc extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD.

Dodatek aditivov (A5 in S5 tla) je povzročil pričakovan upad koncentracije vseh PSK, določenih v ekstrakciji z NH_4OAc , razen Cu; predvsem pri koncentraciji Pb, Zn in Cd v A5 tleh so bila znižanja izrazita. Inkubacija deževnikov je v vseh primerih povzročila upad koncentracij Cu in Cd; koncentracija Zn je rahlo upadla v A5 in S5 tleh, ne pa tudi v kontroli; vsebnost Pb se ni spremenjala, le v primeru S-Dv tleh, ko smo zabeležili upad (Pregl. 11).

Preglednica 11: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh, remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovaka, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* po NH_4OAc ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih oz. različno obravnavanih tleh in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, $p < 0,01$).

Table 11: Metal concentrations in non-amended soil and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*) obtained by NH_4OAc extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non- exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$)

	Pb (mg kg⁻¹)	Zn (mg kg⁻¹)	Cu (mg kg⁻¹)	Cd (mg kg⁻¹)
K	^{Aa} 35,8±0,5	^{Aa} 18,1±2,8	^{Aa} 0,8±0,0	^{Aa} 2,3±0,0
K-Lt	^a 32,7±0,4	^a 16,6±0,3	^b 0,3±0,0	^b 1,3±0,0

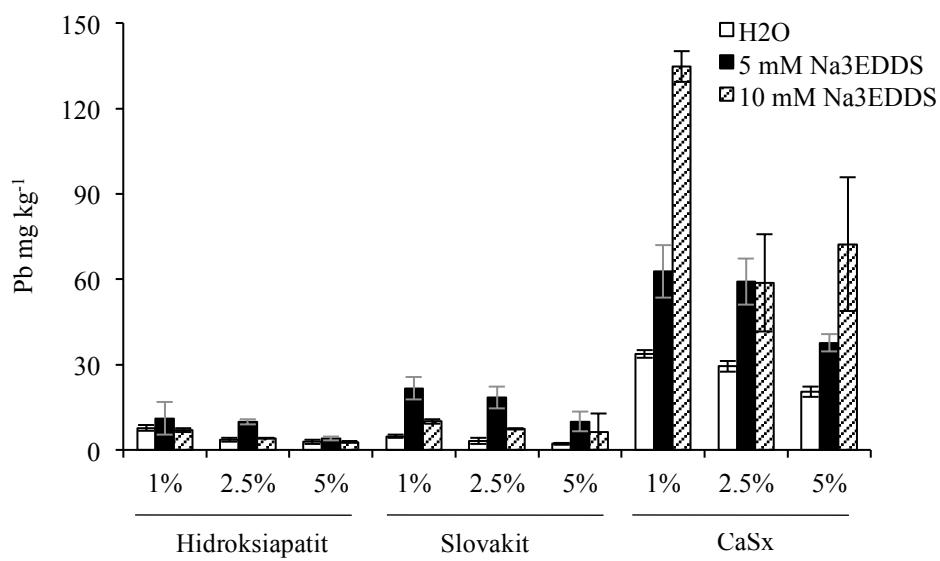
se nadaljuje

nadaljevanje

	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
K-Dv	^a 42,3±16,2	^a 18,8±3,5	^b 0,3±0,1	^b 1,4±0,1
A	^c a2,0±0,3	^B a3,7±0,1	^A a0,8±0,2	^c a0,4±0,0
A-Lt	^a 2,0±0,2	^b 3,1±0,0	LOQ	LOQ
A-Dv	^a 2,2±0,1	^b 3,2±0,0	^b 0,2±0,0	^b 0,1±0,0
S	^B a5,2±0,1	^B a3,6±0,1	^A a1,0±0,0	^B a0,9±0,0
S-Lt	^a 4,8±0,1	^b 3,0±0,0	^b 0,5±0,0	^b 0,4±0,0
S-Dv	^b 4,1±0,2	^b 2,7±0,2	^b 0,5±0,0	^c 0,3±0,0

Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale 0,1/0,01/0,03/0,02 mg L⁻¹

Z namenom izbire najstreznejših aditivov in njihovih najučinkovitejših koncentracij za znižanje biodostopnosti kovin ter tudi koncentracije Na₃EDDS smo v začetnem poskusu z mežiškimi tlemi merili le Pb, saj je bilo to onesnažilo v tleh prisotno v najvišjih koncentracijah. Kalcijev polisulfid se pri zniževanju biodostopnosti Pb ni izkazal kot učinkovit; hidroksiapatit in Slovakit sta največje znižanje biodostopnega Pb povzročila pri dodatku 5 % (w/w), v kombinaciji z namakanjem tal z 10 mM Na₃EDDS; hidroksiapatit je bil nekoliko učinkovitejši pri zniževanju biodostopnosti (Slika 10).

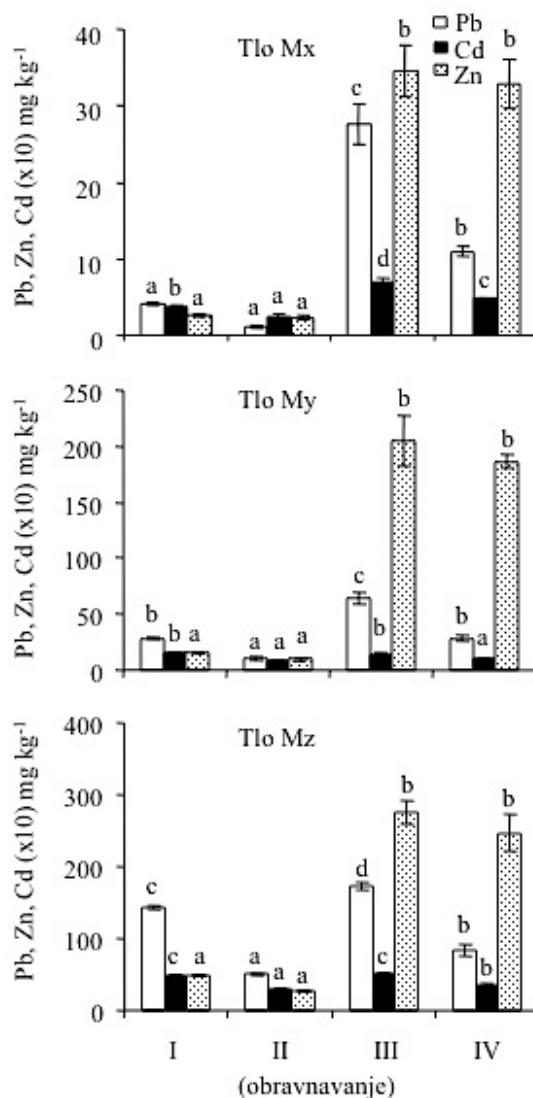


Slika 10: Potencialna biodostopnost Pb v tleh Mx, stabiliziranih s hidroksiapatitom, Slovakitom in kalcijevim polisulfidom (v količinah 1 %, 2,5 % in 5 % w/w vsaki), določena z ekstrakcijo s NH₄OAc. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh meritev ± SD.

Figure: Pb potential bioaccessibility in soils Mx amended with hydroxyapatite, Slovakite and calcium polysulfide (1 %, 2,5 % and 5 % w/w) assessed by NH₄OAc extractions. The results are presented as means

of three replicates \pm SD.

Pri različnih obravnavanjih mežiških tal (Mx, My in Mz) je prišlo predvsem do pričakovanega znižanja koncentracije Pb in Cd po dodatku 5 % hidroksiapatita (II) v vseh treh tleh; koncentraciji Pb in Zn sta se statistično značilno ($p < 0,01$) zvišali po dodatku melase (III, IV obravnavanje) v Mx in My tleh, Cd pa le v primeru Mx tla (Slika 11).



Slika 11: Potencialna biodostopnost kovin v mežiških tleh po različnih talnih obravnavanjih po NH_4OAc ekstrakciji. Rezultati so predstavljeni kot povpreče treh ponovitev \pm SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v različno obravnavanih tleh (Duncan, $p < 0,01$).

Figure 11: Metal potential bioaccessibility assessed by NH_4OAc extraction in Mežica's soils, after four different treatments. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different letters denote statistically significant differences between the metal concentration in soil after four different soil treatment (Duncan, $p < 0,01$).

4.3.3 Določanje biodostopnosti PSK z metodo CaCl₂

Podobno kot v ekstrakciji z NH₄OAc smo z 0,01 M CaCl₂ dobili bistveno nižje koncentracije PSK v tleh iz Podkloštra kot z DTPA (začetni poskus). Koncentracije Pb, Zn, Cu in Cd so v kontrolnih tleh znašale 4,2, 6,8, 2,9 in 1,1 mg kg⁻¹. Po dodatu 1 %, 2,5 % in 5 % Slovakita so se koncentracije vseh PSK v glavnem znižale pod mejo zaznave, ne glede na koncentracijo dodanega aditiva. V tleh remediranih s hidroksiapatitom so se koncentracije Pb in Zn najizraziteje znižale po dodatu 5 % hidroksiapatita (<0,1 mg kg⁻¹, 0,6 mg kg⁻¹) in 5 % Slovakita (<0,1 mg kg⁻¹, 0,3 mg kg⁻¹); koncentracija Cu se značilno zvišala po dodatu 5 % hidroksiapatita (4,3 mg kg⁻¹), medtem ko se koncentracija Cd po dodatu hidroksiapatita ni značilno spremenila (rezultati niso prikazani).

Preglednica 12: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh, remediranih s 5 % hidroksiapatita in 5 % Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* določene v ekstrakciji s CaCl₂. Rezultati so predstavljeni kot povpreče treh ponovitev ± SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, p < 0,01).

Table 12: Metal concentrations in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*) obtained by CaCl₂ extraction. The results are presented as means of three replicates ± SD. Different big letters denote statistically significant differences between the metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, p < 0,01).

	Pb (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
K	^a 1,1±0,2	^{Aa} 17,4±0,4	^A 0,6±0,1	^{Ab} 1,2±0,0
K-Lt	^b 3,1±0,5	^b 30,0±0,5	LOQ	^a 0,9±0,0
K-Dv	^a 1,9±0,3	^c 32,3±0,3	LOQ	^a 1,0±0,1
A	LOQ	^{Ba} 1,3±0,0	^A 0,5±0,0	^B 0,7±0,0
A-Lt	1,2±0,2	^c 2,4±0,1	LOQ	LOQ
A-Dv	LOQ	^b 2,1±0,0	LOQ	LOQ
S	LOQ	^{Ca} 0,3±0,2	^A 0,6±0,0	LOQ
S-Lt	^a 1,6±0,3	^a 0,5±0,1	LOQ	LOQ
S-Dv	^{ab} 0,8±0,8	^a 0,3±0,1	LOQ	LOQ

Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale 0,1/0,01/0,03/0,02 mg L⁻¹

Dodatek aditivov je povzročil predvsem upad koncentracij Pb in Zn, izluženih z raztopino 0,01 M CaCl₂. Po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta* se je koncentracija Cu in Cd v vseh uporabljenih tleh statistično znižala (p < 0,01), v A5 in S5 celo pod mejo zaznave. Deževniki so v kontrolnih tleh in A5 tleh povzročili porast koncentracije Zn,

ekstrahirane s CaCl_2 , medtem ko je koncentracija Pb zvišana le v primeru inkubacije z *L. terrestris*. V S5 tleh se je koncentracija Pb pod vplivom deževnika zvišala; Zn pa je ostal nespremenjen (Preglednica 12).

4.3.4 Določanje mobilnosti PSK z metodo EDTA

V začetnem poskusu po dodajanju hidroksiapatita in Slovakita tlem v koncentracijah 1 %, 2,5 % in 5 % (w/w) nismo zabeležili značilnih sprememb nobene izmed analiziranih PSK (Pb, Zn, Cu in Cd) po ekstrakciji z EDTA (rezultati niso prikazani).

Rezultati ekstrakcije z EDTA so pokazali, da ni prišlo do bistvenih sprememb v koncentraciji Pb po dodatku aditivov; koncentracije Zn in Cd so se po dodatku 5 % w/w Slovakita zvišale; Zn po dodatku 5 % w/w hidroksiapatita znižal. Po inkubaciji deževnikov nismo zabeležili značilnih sprememb v koncentraciji PSK, razen porasta koncentracije Pb in Cu v kontrolnih tleh; znižanje Zn v S5 tleh in vsepovsod zvišanje koncentracije Cd, pri čemer je bila začetna vrednost vedno pod mejo zaznave ($< 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) (Preglednica 13).

Preglednica 13: Koncentracije kovin v kontrolnih tleh in v tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*, določene v ekstrakciji z EDTA. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v remediranih, majhne črke pa statistično značilne razlike med koncentracijami kovin v tleh brez deževnikov in v tleh po inkubaciji deževnikov (Duncan, $p < 0,01$).

Table 13: Metal concentrations in non-amended soil (Arnoldstein) and soils amended with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after exposure to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*) obtained by EDTA extraction. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the metal concentration before and after remediation, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

	Pb (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})	Cu (mg kg^{-1})	Cd (mg kg^{-1})
K	^A ^a 546,3 \pm 27,9	^{AB} ^a 130,1 \pm 4,8	^A 15,5 \pm 0,7	LOQ
K-Lt	^b 628,6 \pm 17,6	^a 150,7 \pm 14,6	^b 19,2 \pm 0,7	^a 4,2 \pm 0,3
K-Dv	^b 608,4 \pm 5,9	^a 129,3 \pm 1,8	^b 18,5 \pm 1,0	^a 3,7 \pm 0,5
A	^A ^a 521,0 \pm 12,2	^A ^a 113,2 \pm 6,0	^A 15,4 \pm 1,1	LOQ
A-Lt	^a 533,7 \pm 23,7	^a 124,1 \pm 3,4	^a 16,3 \pm 0,2	^a 3,6 \pm 0,4
A-Dv	^a 565,0 \pm 29,5	^a 129,8 \pm 8,2	^a 17,9 \pm 1,9	^a 4,1 \pm 0,8
S	^A ^a 531,7 \pm 33,2	^B ^b 140,3 \pm 8,5	^A 16,3 \pm 0,2	LOQ
S-Lt	^a 531,7 \pm 20,1	^a 89,5 \pm 1,3	^a 16,5 \pm 0,4	^a 2,8 \pm 0,1
S-Dv	^a 527,5 \pm 57,7	^a 87,9 \pm 3,7	^a 17,1 \pm 2,2	^a 3,1 \pm 1,0

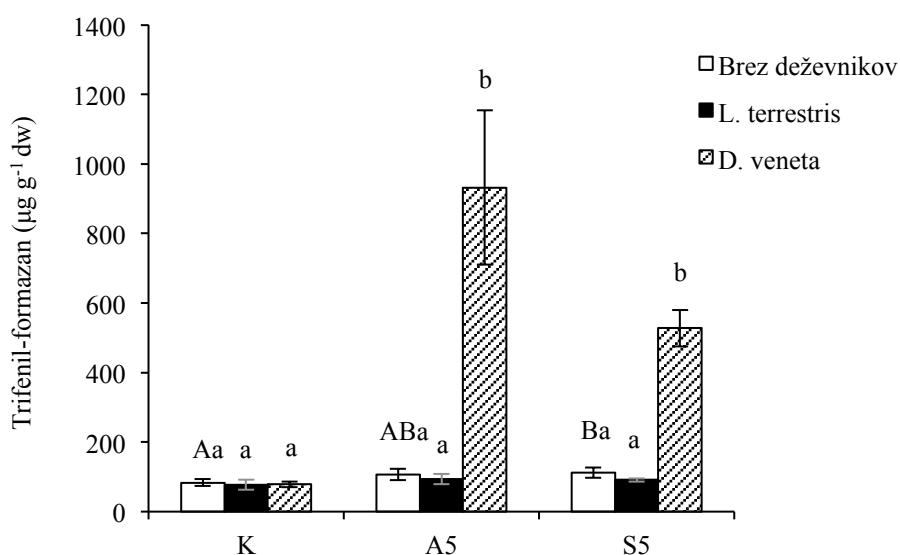
Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cu/Cd so znašale $0,1/0,01/0,03/0,02 \text{ mg L}^{-1}$

4.4 ENCIMSKE AKTIVNOSTI V TLEH

Encimi imajo različno poreklo in se nahajajo v različnih talnih delih. Dehidrogenaze (DHA) so znotrajcelični encimi za vso mikrobno biomaso; nahajajo se v vseh živih organizmih. Z merjenjem DHA v tleh lahko določimo celotno celično dihanje in ocenimo celotno mikrobno aktivnost v tleh (Alvarenga in sod., 2009). Fosfomonoesteraze so eni najpomembnejših encimov v tleh, saj katalizirajo fosfomonoester v anorganski fosfor, ki ga potem lahko prevzamejo rastline (Nannipieri in sod., 2011). β -glukozidaze so vključene v saharifikacijo celuloze oz. en izmed ključnih encimov v kroženju ogljika v tleh (de Mora in sod., 2005).

4.4.1 Dehidrogenazna aktivnost

Vrednosti dehidrogenazne aktivnosti so po remediaciji v vzorcih statistično značilno ($p < 0,01$) narasle. V kontrolnih tleh deževniki niso povzročili spremembe dehidrogenazne aktivnosti, medtem ko je v remediranih tleh (A5 in S5) prišlo do bistvenega zvišanja aktivnosti dehidrogenaze po inkubaciji vrste *D. veneta*, vrsta *L. terrestris* ni vplivala na spremembo dehidrogenazne aktivnosti remediranih tal (Slika 12).



Slika 12: Dehidrogenazna aktivnost v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo remediranih in kontrolnih tal, majhne črke pa statistično značilne razlike med dehidrogenazno aktivnostjo tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov za kontrolna in remedirana tla (Duncan, $p < 0,01$).

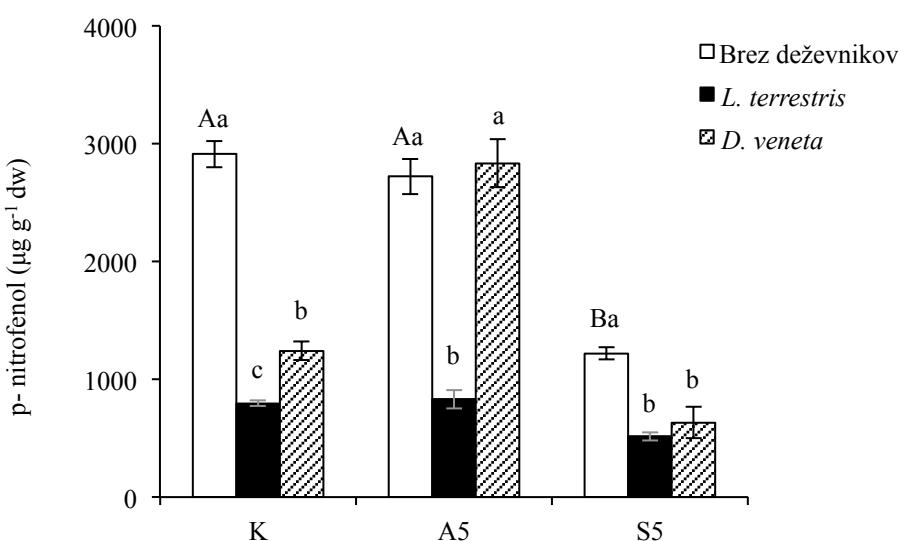
Figure 12: Dehydrogenase activity in non- remediated soils (Arnoldstein) and soils remediated with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after being exposed to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). Results are presented as means of five replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the dehydrogenase activity in non- remediated and remediated

soils, small letters denote statistically significant difference between dehydrogenase activity in non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

4.4.2 Fosfatazna (fosfomonoesterazna) aktivnost

4.4.2.1 Kisle fosfataze

Pri spremjanju aktivnosti kislih fosfataz smo opazili da je ta upadla po dodatku 5 % w/w Slovakita. Vrsta *L. terrestris* je vedno vplivala na statistično značilno ($p < 0,01$) znižanje aktivnosti kislih fosfataz, medtem ko je vrsta *D. veneta* povzročila znižanje njihove aktivnosti le v primeru kontrolnih in S5 tal; v A5 tleh je ostala nespremenjena (Slika 13).



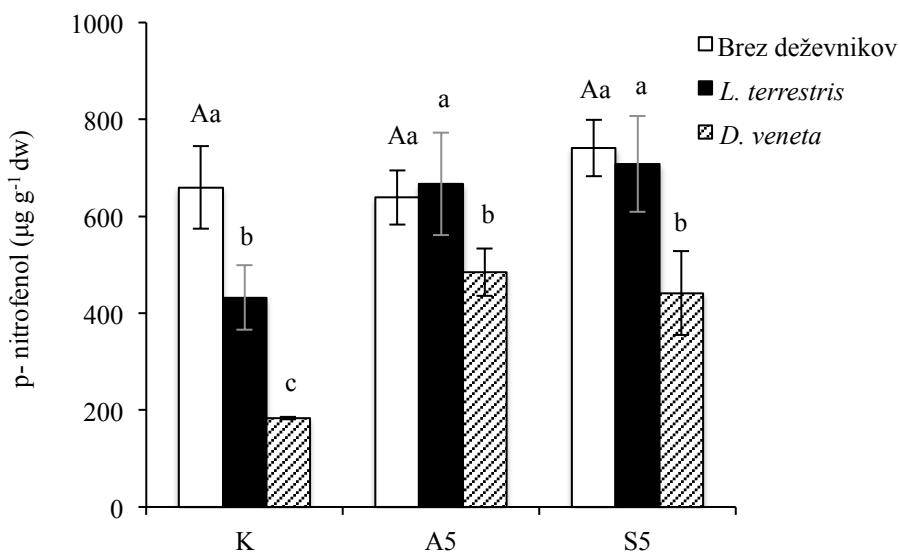
Slika 13: Aktivnost kislih fosfataz v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo remediranih in kontrolnih tal, majhne črke pa statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, za kontrolna in remedirana tla (Duncan, $p < 0,01$).

Figure 13: The activity of acid phosphatase in non-remediated soils (Arnoldstein) and soils remediated with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after being exposed to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). Results are presented as means of five replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the phosphatase activity in non-remediated and remediated soils, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

4.4.2.2 Bazične fosfataze

Dodatek aditivov ni vplival na spremembo aktivnosti bazičnih fosfataz. Vrsta *L. terrestris* je povzročila znižanje aktivnosti bazične fosfataze le v primeru kontrolnih tal, drugod ni povzročil spremembe; vrsta *D. veneta* je vseskozi povzročala znižanje aktivnosti bazičnih

fosfataz, najbolj očitno v kontrolnih tleh (Slika 14).

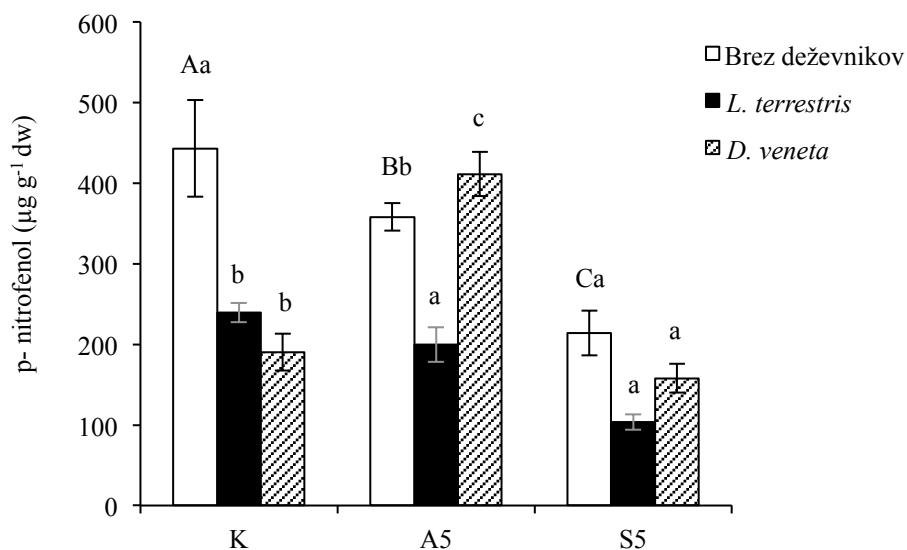


Slika 14: Aktivnost bazičnih fosfataz v neremediranih tleh (Podklošter) in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med fosfatazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, tako v kontrolnih kakor v remediranih tleh (Duncan, $p < 0,01$).

Figure 14: The activity of alkaline phosphatase in non-remediated soils and soils remediated with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after being exposed to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). Results are presented as means of five replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the phosphatase activity in non-remediated and remediated soils, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

4.4.3 β -glukozidazna aktivnost

Remediacija tal oz. dodatek hidroksiapatita in Slovakita v količini 5 % (w/w) je vplival na znižanje aktivnosti β -glukozidaz. Vrsta *L. terrestris* je povzročila znižanje aktivnosti β -glukozidaze v kontrolnih tleh in A5, medtem ko je vrsta *D. veneta* v kontrolnih tleh znižala β -glukozidazno aktivnost, v A5 pa zvišala (v S5 je ostala nespremenjena) (Slika 15).

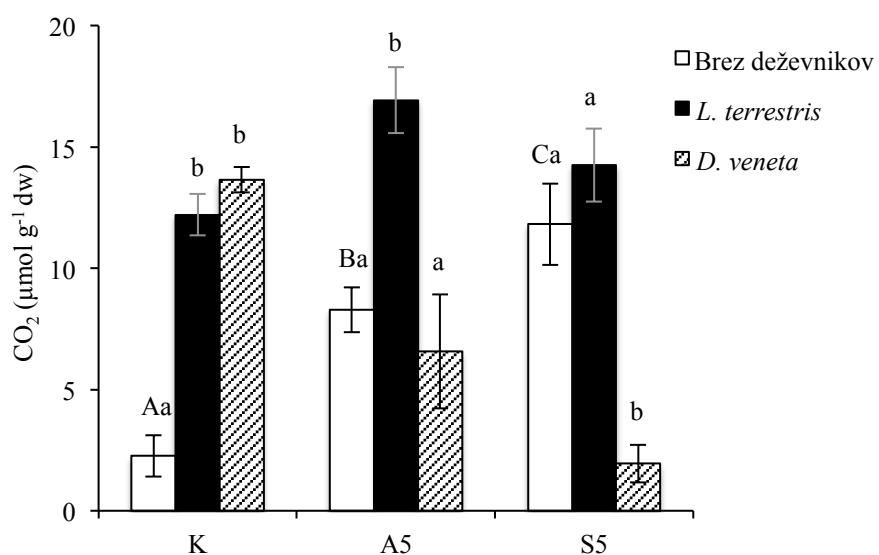


Slika 15: Aktivnost β - glukozidaz v neremediranih tleh in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med β - glukozidazno aktivnostjo v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med β - glukozidazno aktivnostjo v tleh brez deževnikov in po inkubaciji deževnikov, tako v kontrolnih kakor v remediranih tleh (Duncan, $p < 0,01$).

Figure 15: β - glucosidase activity in non-remediated soils and soils remediated with 5 % (w/w) hydroxyapatite and 5 % (w/w) Slovakite, before and after being exposed to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). Results are presented as means of five replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the results in non-remediated and remediated soils, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

4.5 SUBSTRATNO (GLUKOZNO) INDUCIRANO DIHANJE

Z glukozo inducirano dihanje se je zvišalo pri dodatku obeh aditivov. Vrsta *L. terrestris* je vplivala na zvišanje z glukozo induciranega dihanja v kontrolnih tleh in tleh, stabiliziranih s 5 % w/w hidroksiapatita; v S5 tleh nismo zabeležili sprememb. Vrsta *D. veneta* je v kontrolnih tleh vplivala na statistično značilen ($p < 0,01$) porast inducirane dihanja; v S5 je povzročila statistično značilno znižanje; v A5 tleh pa ni povzročila sprememb (Slika 16).



Slika 16: Z substratom inducirano dihanje v neremediranih tleh in tleh, remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita, pred in po inkubaciji deževnikov *L. terrestris* in *D. veneta*. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih ponovitev \pm SD. Velike črke označujejo statistično značilne razlike med dihanjem v remediranih in kontrolnih tleh, majhne črke pa statistično značilne razlike med dihanjem v tleh brez deževnikov in po inkubaciji s deževniki, tako za kontrolna kakor za remedirana tla (Duncan, $p < 0,01$).

Figure 16: Substrate (glucose) induced respiration in non-remediated soils and soils remediated with 5% (w/w) hydroxyapatite and 5% (w/w) Slovakite, before and after being exposed to earthworms (*L. terrestris* and *D. veneta*). Results are presented as means of five replicates \pm SD. Different big letters denote statistically significant differences between the results in non-remediated and remediated soils, small letters denote statistically significant differences between non-exposed soils and soils exposed to earthworms (Duncan, $p < 0,01$).

4.6 BIODOSTOPNOST PSK IZ TAL PO ORALNEM VNOSU

Nevarnost, ki jo predstavlja zaužitje s PSK onesnaženih tal, je odvisna od količine PSK, ki lahko postanejo dostopne za potencialno absorpcijo ali njihove količine, ki lahko vstopi v krvni obtok (Hooda, 2010). Tveganje lahko ocenimo s pomočjo *in vivo* in *in vitro* testov. *In vivo* testi se izvajajo na živalih in so ekonomsko zahtevni, dolgotrajni in etično vprašljivi. *In vitro* testi sicer ne morejo predstaviti celotnega fiziološkega procesa, ki kontrolira absorpcijo hrani oz. onesnažil v prebavnem traktu (GI) ali njihovega raztopljanja iz tal, so pa še vedno zelo uporabni pri določanju potencialnih vplivov zaužitih tal, onesnaženih s PSK, na človekovo zdravje (Hooda, 2010). „Unified BARGE method“ (UBM) metoda vključuje začetno frakcijo slino in posnema pogoje v želodčni in črevesni fazi, pri temperaturi 37 °C (telesna T). Korelacije med rezultati *in vivo* in *in vitro* poskusov so pokazale, da je UBM v dobrini meri analogen z rezultati *in vivo* testov (Wragg in sod., 2011).

Rezultate UBM testa smo razdelili v dve skupini - v rezultate koncentracij kovin, izmerjenih v ekstraktih želodčne (Preglednica 13) in ekstraktih črevesne faze (Slika 17). V

želodčni frakciji smo izmerili veliko višje koncentracije PSK kot v črevesni. Koncentracije PSK, določene v želodčni frakciji, se niso značilno razlikovale med različnimi talnimi obravnavanji (Preglednica 14). Biodostopnost PSK (izražena v % celokupne koncentracije PSK) je bila v želodčni frakciji v zaporedju Cd > Pb > Zn za tla My in Mz, ne glede na različna talna obravnavanja; v Mx tleh je bila biodostopnost Pb nekoliko večja od Cd. Maksimalne vrednosti biodostopnosti PSK v želodčni frakciji so določene v Mz, najbolj onesnaženih tleh ($Pb_{max} 97,5 \pm 3,5 \%$, $Zn_{max} 47,6 \pm 0,7 \%$, $Cd_{max} 97,8 \pm 1,7 \%$). V črevesni fazi je bila določena biodostopnost PSK v glavnem v naslednjem zaporedju Cd > Pb > Zn; po dodatku melase (III in IV obravnavanje) smo izmerili razmeroma višje koncentracije Zn - biodostopnost Zn je bila višja od biodostopnosti Pb in Cd (My) oz. Pb (Mz); v Mx so bile koncentracije PSK v glavnem pod mejo zaznave (LOQ). Maksimalne vrednosti biodostopnosti PSK v črevesni frakciji smo določili v Mz kontrolnem vzorcu (Pb - $12,6 \pm 5,9 \%$, Zn - $8,7 \pm 1,8 \%$, Cd - $57,5 \pm 1,4 \%$).

Preglednica 14: Koncentracije kovin v mežiških tleh (Mx, My in Mz) po različnih talnih obravnavanjih (I, II, III, IV), pridobljene v želodčni frakciji testa UBM. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD. Velične črke označujejo statistično značilne razlike med koncentracijami kovin po različnih talnih obravnavanjih (Duncan, $p < 0,01$).

Table 14: Metal concentrations in Mežica's soils (Mx, My and Mz) after four different soil treatment (I, II, III and IV) obtained by UBM extraction in stomach phase. The results are presented as means of three replicates \pm SD. Different letters denote statistically significant differences between the metal concentration measured in different treated soils (Duncan, $p < 0,01$).

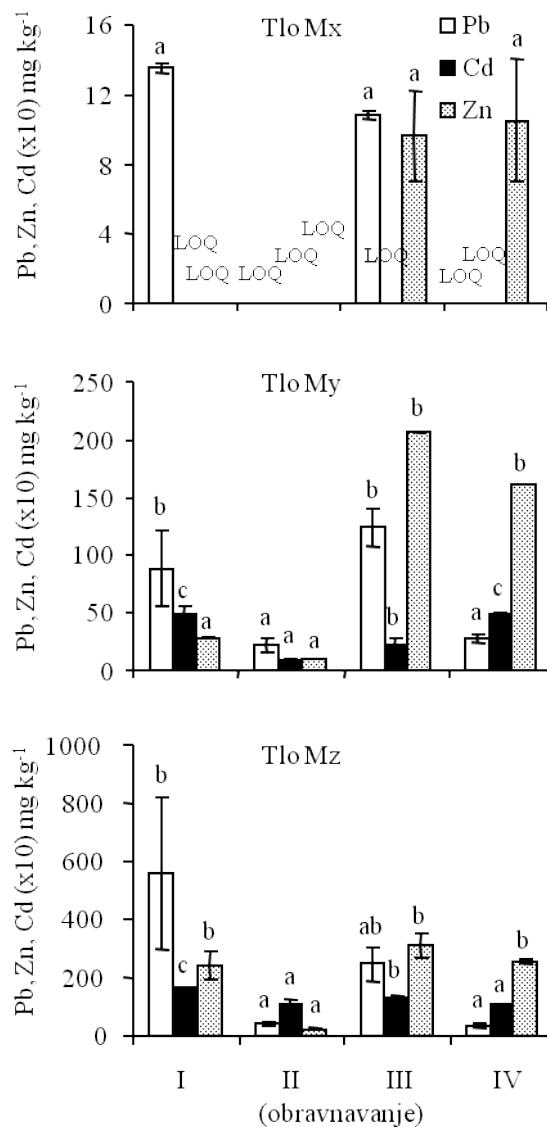
	Pb mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Cd mg kg ⁻¹
Mx			
I	649,0 \pm 12,0 ^a	105,2 \pm 4,6 ^b	3,4 \pm 0,1 ^a
II	622,4 \pm 6,4 ^a	102,6 \pm 0,4 ^b	3,5 \pm 0,0 ^a
III	609,4 \pm 26,9 ^a	79,7 \pm 3,9 ^a	3,4 \pm 0,0 ^a
IV	632,7 \pm 11,9 ^a	84,7 \pm 6,5 ^a	3,4 \pm 0,1 ^a
My			
I	1505,4 \pm 27,9 ^a	478,3 \pm 30,9 ^a	12,2 \pm 0,3 ^b
II	1575,2 \pm 111,0 ^a	467,4 \pm 12,5 ^a	11,7 \pm 0,1 ^{ab}
III	1523,3 \pm 66,6 ^a	484,7 \pm 15,2 ^a	12,0 \pm 0,2 ^{ab}
IV	1492,8 \pm 22,9 ^a	442,1 \pm 1,0 ^a	11,5 \pm 0,1 ^a
Mz			
I	4320,4 \pm 155,0 ^b	1313,9 \pm 19,3 ^b	27,1 \pm 0,2 ^a
II	4010,9 \pm 20,3 ^{ab}	1269,4 \pm 14,8 ^{ab}	27,6 \pm 0,5 ^a

se nadaljuje

nadaljevanje

	Pb mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹	Cd mg kg ⁻¹
Mz			
III	3974,2±88,6 ^a	1170,3±46,4 ^{ab}	27,4±0,7 ^a
IV	3831,4±155,3 ^a	1143,4±91,5 ^a	27,3±0,5 ^a

Meje zaznave (LOQ) za Pb/Zn/Cd so znašale 0,1/0,01/0,02 mg L⁻¹



Slika 17: Koncentracija PSK v kontrolnih tleh in v različno tretiranih mežiških tleh po UBM ekstrakciji- črevesna faza. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev ± SD. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med rezultati v kontrolnem tlu in v različno tretiranih tleh (Duncan, p < 0,01).

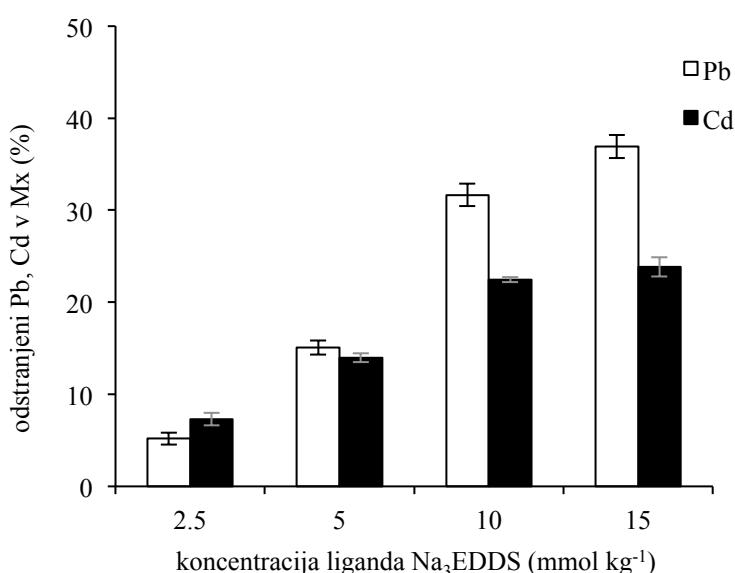
Figure 17: PTK concentration in non- remediated soil and in different treated soils from obtained by UBM extraction- gastro intestinal phase. Results are presented as means of three replicates ± SD. Different letters

denote statistically significant differences between the results in different treated soils (Duncan, $p < 0,01$).

Dodatek hidroksiapatita je v črevesni frakciji statistično značilno ($p < 0,01$) znižal oralno biodostopno koncentracijo PSK v tleh; dodatek Na₃EDDS in melase je očitno mobiliziral PSK ter končni učinek remediacije (IV obravnavanje) ni bil statistično značilno drugačen ($p < 0,01$) od stabilizacije s hidroksiapatitom oz. se je celo poslabšal (biodostopni Zn v My in Mz tleh po IV tretmanu) (Slika 17).

4.7 SPIRANJE TAL (MEŽIŠKA TLA)

Učinkovitost Na₃EDDS za odstranjevanje oz. mobiliziranje PSK (Pb in Cd) iz mežiških tal Mx smo določili s spiranjem tal. Uporabljene so bile 4 različne količine Na₃EDDS za spiranje tal (2,5, 5, 10 in 15 mmol kg⁻¹ suhih tal); višje koncentracije Na₃EDDS so povzročile izpiranje večjih količin kovin (Slika 18).



Slika 18: Odstranjeni Pb in Cd iz vzorca Mx po spiranju z uporabo štirih različnih koncentracij Na₃EDDS. Rezultati so predstavljeni kot povprečje treh ponovitev \pm SD ($n = 3$).

Figure 18: Removal of soil Pb and Cd after soil leaching using four different concentrations of Na₃EDDS. Error bars represent standard deviation from the mean value ($n = 3$).

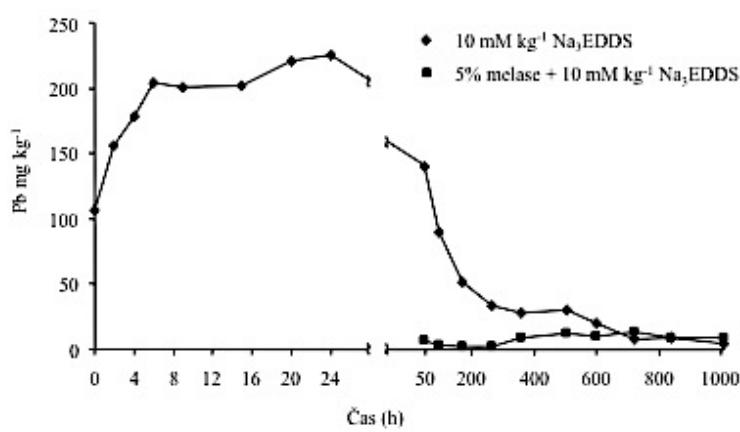
4.8 RAZGRADNJA Na₃EDDS

Vpliv vlage na razgradnjo Na₃EDDS smo preverjali tako, da smo natačno določeno količino Na₃EDDS raztopili v volumnu vode, ki ustreza 80 % oz. 105 % zadrževalne kapacitete tal, jih dodali tlem Mx in ugotovili, da je bolj učinkovita razgradnja Na₃EDDS (določena s koncentracijo mobilnega oz. sproščenega Pb) pri večji vlažnosti (npr. po 48 h je pri nižji vlažnosti tal koncentracija Pb 160 mg kg⁻¹, pri višji 140 mg kg⁻¹; po 240 h je v tleh z nižjo vlažnostjo koncentracija Pb 159,0 mg kg⁻¹, pri višji vlažnosti tal pa 52,0 mg kg⁻¹).

¹), ter da po 20 dneh učinek razgradnje postane približno enak v obeh primerih. V nadalnjih poskusih smo uporabljali volumen vode, ki ustreza 105 % zadrževalne kapacitete tal.

Z namenom čim bolj učinkovite razgradnje Na₃EDDS smo talnemu vzorcu Mx dodajali tudi hranila (poleg 10 mM Na₃EDDS kg⁻¹ smo dodali 5 % melase oz. 2 % NH₄NO₃ in 5 % glukoze). V talnemu vzorcu z melaso je bila po 24 h izmerjena koncentracija svinca 6,7 mg kg⁻¹, medtem ko je koncentracija Pb v vzorcu z dodanim amonijevim nitratom in glukozo znašala po istem času 192 mg kg⁻¹. Šele po 15 dneh so bile izmerjene koncentracije Pb v obeh vzorcih približno enake. Zaradi zelo učinkovitega vpliva na razgraditev Na₃EDDS (Slika 19) smo se odločili, da v nadalnjem poskusu dodajamo tlem le 5 % melase in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS. Melasa je stranski proizvod predelave sladkorne pese; 50 % suhe snovi melase tvori saharoza, 30 % pa ne-saharozne snovi, ki so lahko mineralnega porekla, ter organske z dušikom ali brez njega. Za fermentativne tehnologije je najpomembnejša vsebost dušika, ki ga mikroorganizmi lahko asimilirajo (okrog 50 % N) (Jevtić- Mučibabić in sod., 2011)

Vezavo kovin za Na₃EDDS in njihovo nadaljno mobilizacijo smo spremljali z merjenjem koncentracije Pb v talnih vzorcih (Mx), ki smo jim na začetku dodali 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS. Najvišja koncentracija mobiliziranega Pb je bila po 24 h inkubacije, zato smo v nadaljnem poskusu izbrali isti čas (24 h po dodatku Na₃EDDS) za dodajanje melase tlem. Razgradnjo Na₃EDDS smo kontrolirali do 42 dnevnih inkubacij. Ob tem je razgradnja bolj ali manj kontinuirano upadala s časom (Slika 19).



Slika 19: Koncentracija Pb v talni raztopini po različnem inkubacijskem času (0- 1008 h) tal tretiranih z 10 mM Na₃EDDS kg⁻¹ raztopljenim v volumnu vode, ki ustreza 105 % zadrževalne kapacitet tal, ter v tleh z melaso in 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS.

Figure 19: Concentration of Pb in the soil solution after different reaction times (0- 1008 h) of soils treated with 10 mmol Na₃EDDS kg⁻¹ water quantity equal to 105 % of soil holding capacity and in soil with molasses and 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vpliv aditivov na biodostopnost PSK in funkcionalno obnavljanje tal

Pri preučevanju učinkovitosti stabilizacije tal smo ugotovili, da je od treh različnih koncentracij hidroksiapatita in Slovakita (1 %, 2,5 % in 5 % w/w), ki smo jih dodali tlem iz Podkloštra, na znižanje potencialno biodostopnih koncentracij Pb, Zn, Cu in Cd (določenih z enostopenjskimi ekstrakcijami z DTPA in NH₄OAc) najučinkoviteje delovala koncentracija 5 % (w/w) (Sliki 7 in 9). Zaradi te ugotovitve smo v raziskavah tla remedirali s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita.

Na splošno se lastnosti kontrolnih in remediranih tal glede na rezultate standardne pedološke analize niso bistveno razlikovale (Preglednici 4 in 7), z izjemo pH vrednosti tal (Preglednica 5), fitodostopnega fosforja (Preglednica 7) in CEC tal (Preglednica 6). Parametri tal, ki bistveno vplivajo na sorpcijsko kapaciteto tal, so se po remediaciji izboljšali; dodatek aditivov (stabilizantov) je povzročil porast pH vrednosti - v rahlo kislih kontrolnih tleh (pH 6,0-6,1) se je pH vrednost po dodatku Slovakita dvignila na 7,4. Zadrževalna kapaciteta tal za PSK raste z zvišanjem pH vrednosti in je maksimalna pri približno nevtralnem pH (Adriano, 2001). Dodatek hidroksiapatita ali fosfatnega minerala je povzročil pričakovano zvišanje rastlinam dostopnega fosforja, medtem ko je dodatek obeh aditivov povzročil dvig kationske izmenjevalne kapacitete. Ta trend je bil opaznejši pri dodatku Slovakita (povišanje za faktor 2), kar lahko pripisemo veliki specifični površini zeolita (Querol in sod., 2006; Shi in sod., 2009) in bentonita.

Kljub nekaterim pomanjkljivostim (pomanjkljiva selektivnost ekstrahirajočih raztopin; operativno definirane koncentracije PSK) so sekvenčne ekstrakcije pogosto uporabljana metoda, ki nam omogoča podajo ocene potencialne mobilnosti in topnosti PSK ter njihove afinitete za talne delce; rezultati sekvenčnih ekstrakcij nam lahko pomagajo tudi pri izbiri, monitoringu in izboljšanju remediacijskih procesov v tleh (Dermont in sod., 2008). Dodatek vseh aditivov je vplival na porazdeljenost PSK v tleh; v kontrolnih tleh brez dodatka aditivov je bila vsebnost Pb, Zn, Cu in Cd v vodotopni in izmenljivi frakciji, ki sicer veljajo za najbolj biodostopne oblike (Leštan in sod., 2008), po vrsti 1,5 %, 11 %, 1,6 % in 33 %. Vemo pa, da sta Pb in Cu v tleh močno vezana na organsko snov, glinene minerale in Fe- in Mn- okside ter da ima pH vrednost tal znaten vpliv na njihovo topnost. Kadmij in Zn se pogosto nahajata skupaj v tleh, Cd je mobilnejši (razen na pH > 7,5), medtem ko se zaradi raztpljanja organskih in mineralnih koloidov biodostopnost Zn lahko zviša tudi v bazičnih pogojih (Kabata-Pendias, 2001; Mulligan in sod., 2001). Dodatek hidroksiapatita je prestavil Pb, Zn in Cd iz izmenljive frakcije ter iz frakcij, vezanih na

karbonate ter Fe- in Mn- okside, v manj mobilne oz. manj dostopne kemijske oblike, izmerjene v organski frakciji (faktor prestavitev 1,6 za Pb, 1,5 za Zn in 3,3 za Cd). Na podlagi stabilnostnih konstant kompleksov kovina-fulvo kislina lahko sklepamo, da imata Cu²⁺ in Pb²⁺ izrazito težnjo za formacijo organskih kompleksov, ki so stabilnejši pri višjih pH vrednostih (Kizilkaya, 2004; Hooda, 2010). Dodatek hidroksiapatita tlem, onesnaženim s Pb, vodi do nastanka hidroksipiromorfita (HP), najstabilnejše spojine svinca (Preglednica 2), ki pa je v črevesju netopna in posledično nenevarna ob naključnem zaužitju onesnaženih tal (Myretzky in Fernandez- Cirelli, 2008). Pri ekstrakciji z 1 M NH₄OAc in 0,1 M NH₂OHxHCl se pri nizkih pH vrednostih (pH 5, pH 2) Pb desorbira s talnih delcev, kar posledično povzroči povišanje koncentracij Pb v talni raztopini, kjer lahko reagira in pri čemer nastaja in seobarja piromorfit. Močni oksidativni pogoji, ki jih dosežemo z ekstrakcijo rezidualnega talnega vzorca s 30 % H₂O₂ pri 85 °C, povzročijo ne le razapljanje organske snovi, ki je prisotna v tleh, temveč tudi nastalega piromorfita. To pa vodi do zaznavanja višjih koncentracij Pb v frakciji, vezani na organsko snov (Preglednica 9) (McBride, ustni pogovor). Ker je bil pH tal po dodatku HA v območju 6,2-6,3, so verjetno bili pri imobilizaciji PSK bolj dominantni procesi ionske izmenjave kovin ter kompleksiranja kovinskih ionov na površini fosfatnih granul, kot obarjanje HP, saj je optimalen pH za nastanek HP po dodatku fosftanih aditivov pH=5, čeprav bo prihajalo do nastajanja HP pri vseh pH < 8, ampak v izjemno manjši meri (Mignardi in sod., 2012).

Koncentracije lahko dostopnega Zn so se po remediaciji znižale; trend je bil učinkovitejši po dodatku Slovakita, katerega karbonatna frakcija je povzročila obarjanje Zn-karbonata. Cd je bil dokaj enakomerno porazdeljen med vsemi talnimi frakcijami, le koncentracija v izmenljivi frakciji je bila nekoliko višja od ostalih. Dodatek hidroksiapatita je povzročil prenestitev Cd v frakcije, vezane na Fe in Mn- okside ter organsko snov; dodatek Slovakita pa precipitacijo Cd-karbonata (Preglednica 9). Spremembe v porazdeljenosti Cu po talnih frakcijah so bile po dodatku obeh aditivov hkrati minimalne (Preglednica 9). Največji del Cu je bil vezan v delno labilno oz. nelabilno kemijsko obliko - na organsko snov ter v rezidualni frakciji tal. Koncentracije Pb, Zn in Cd so upadle v najbolj dostopnih talnih frakcijah, kar je sovpadalo s povečanjem vrednosti pH tal (Preglednici 5 in 9) - topnost kovin je namreč obratno sorazmerna s pH vrednostjo tal (Kumpiene in sod., 2008), pa tudi z višanjem CEC tal (predvsem zaradi zeolitne ter bentonitne sestavine Slovakita) (Shi in sod., 2009).

Celokupna koncentracija PSK v tleh nam poda zelo omejeno informacijo o kemijski obliki in potencialni usodi PSK kot tudi nevarnosti, ki jo predstavljajo za okolje, zato bi se morala uporabljati le pri določanju mejnih oz. kritičnih koncentracijah PSK (Menzies in sod., 2007). Stabilizacija v bistvu ne spremeni celokupno koncentracijo PSK (Preglednica 8). Pri ocenjevanju onesnaženosti in uspešnosti remediacije tal je nujno potrebno upoštevati tudi potencialno biodostopno in mobilno frakcijo kovin oz. tisti delež celokupne

koncentracije PSK, ki je potencialno nevaren za žive organizme. Univerzalnega testa oz. ekstrakcije, s katero bi lahko ocenili nevarnost onesnažil, prisotnih v tleh, ne obstaja (Sizmur in Hodson, 2009). Enostopenjske ekstrakcije se pogosto uporabljajo, ker so hitre, enostavne, ugodne in podajajo ponovljive rezultate. Kemijske ekstrakcije, ki smo jih uporabljali v naši raziskavi, so prvotno razvili za oceno fitodostopnosti PSK, se pa uspešno uporabljajo tudi za oceno mobilnosti PSK v tleh in njihove posledične dostopnosti živim organizmom. Sprva so se uporabljale ekstrakcije z močnimi kelatnimi ligandi (DTPA in EDTA), potem je napredok instrumentalne tehnike omogočil merjenje znatno nižjih koncentracij PSK, izluženih s šibkejšimi topili (McLaughlin in sod., 2000). Zelo dobre korelacijske povezave so določene med koncentracijo kovin, pridobljeno z ekstrakcijo s šibkejšimi topili in akumulirano koncentracijo v tkivu rastlin za številne kovine (Menzies in sod., 2007). Kelatni ligandi kot sta DTPA in EDTA lahko izlužijo več kovin iz tal, oz. precenijo rastlinam takoj dostopno koncentracijo PSK. Ravno tako sta pogosto uporabljana topila za raziskovanje fizikalno-kemijskih procesov v tleh kot npr. mobilnosti kovin (Menzies in sod., 2007; Peijnenburg in sod., 2007). Pri višjih vrednosti CEC in pH lahko pričakujemo manjše sproščanje PSK iz trdne faze v talno raztopino, tako pri remediranih kot tudi v kontrolnih tleh (Querol in sod., 2006; Shi in sod., 2009). pH vrednost je kritičen faktor, ki lahko napoveduje verjetnost onesnaženja podtalnice, površinskih vod in vstop PSK v prehranjevalno verigo (Brady in Weil, 2008). Ekstrakcije z DTPA, NH₄OAc in CaCl₂ so pokazale, da je potencialna biodostopnost Pb, Zn in Cd upadla po uporabi obeh aditivov v primerjavi s kontrolnimi tlemi (Preglednice 10, 11 in 12). Količina izluženih PSK se je med različnimi uporabljenimi ekstrakcijskimi testi razlikovala, kar potrjujejo tudi prejšnje raziskave (Udovič in sod., 2009), ki hkrati potrjujejo tudi že omenjeno trditev, da je izbira najučinkovitejšega (najprimernejšega) testa za oceno biodostopnosti PSK ter učinkovitosti remediacije onesnaženih tal zelo težavna. V nasprotju z rezultati Madrid in sod. (2006) statistično značilnih sprememb ($p < 0,01$) pri koncentracijah Pb, Zn, Cu in Cd v tleh, izluženih z EDTA po uporabi 5 % (w/w) Slovakita za remediacijo urbanih onesnaženih tal, nismo opazili. To razliko lahko najverjetneje pripisemo dejству, da so tla v omenjeni raziskavi vsebovala večji delež peska kot tla iz Podkloštra, to pa bi lahko vplivalo na boljše izluževanje PSK s kelatnim ligandom EDTA. Sprememb v dostopnosti Cu po stabilizaciji tal s hidroksiapatitom in Slovakitom (Preglednice 10-13) nismo zabeležili, kar je skladno tudi z minimalnimi spremembami v porazdeljenosti Cu med talnimi frakcijami po uporabi aditivov (Preglednica 9).

Okrevanje s PSK onesnaženih tal po dodatku aditivov in posledično izboljšanje njihove kakovosti je potrebno oceniti tako z določanjem kemijskih lastnosti tal kot tudi s pomočjo merjenja obnovljenih funkcij tal s pomočjo ustreznih indikatorjev kakovosti tal (Lee in sod., 2009). Aditivi, ki jih dodajamo onesnaženim tlem, vplivajo na mikrobnou oz. encimsko aktivnost v tleh; to področje je še vedno slabo raziskano in je bilo šele pred kratkim deležno bolj sistematicne pozornosti. Talni encimi so zelo občutljivi na prisotnost

PSK in se zato lahko uporabljajo kot biokemijski indikatorji kakovosti tal, onesnaženih s PSK (Alvarenga in sod., 2009), predvsem zato, ker se lahko določijo in izmerijo preden so spremembe fizikalnih in kemijskih parametrov sploh opazne (Pankhurst in sod., 1995). Vplivi onesnaženosti tal na encimsko aktivnost so kompleksni; odzivi različnih encimov na iste PSK se lahko medsebojno močno razlikujejo (Zhang in sod., 2010). PSK lahko bodisi indirektno zavirajo mikrobnou aktivnost (preko vpliva na mikrobnou populacijo) in/ali direktno - preko vpliva na delovanje zunajceličnih encimov (Lee in sod., 2009). Poleg tega remediacija tal, ki vpliva na encimskou aktivnost v tleh, običajno vpliva tudi na druge fizikalne in kemijske lastnosti tal (Leštan in sod., 2008); med slednjimi sta najpomembnejša pH in CEC (Acosta- Martinez in Tabatabai, 2000; Wang in sod., 2006). Encimske aktivnosti se po uporabi aditivov niso zvišale v pričakovani meri (glede na znižanje potencialne biodostopnosti PSK). Aktivnost kislih fosfataz se je znižala, kar lahko pripisemo zvišanju pH vrednosti tal (za faktor 1,2 pri uporabi Slovakita) - to potrjuje tudi močna negativna korelacija med omenjenima parametrom (Preglednica 15), kar so izpostavili tudi drugi raziskovalci (Acosta- Martinez in Tabatabai, 2000; Wang in sod., 2006). Aktivnost alkalnih fosfataz se ni značilno spremenila, medtem ko se je dehidrogenazna aktivnost rahlo, toda statistično značilno ($p < 0,01$), zvišala po dodatku aditivov (Sliki 12 in 14). Dehidrogenazna aktivnost je pozitivno korelirala s pH in CEC vrednostjo tal (Preglednica 15). Nasprotno se je aktivnost β - glukozidaz, encimov zadolženih za razgradnjo celuloze v glukozi, ki predstavlja pomemben vir energije za mikroorganizme, značilno znižala po uporabi aditivov - za 19 % po remediaciji s hidroksiapatitom in za kar 52 % po remediaciji s Slovakitom (Slika 15). Negativno korelacijsko aktivnosti s pH vrednostjo tal (Preglednica 15) navajajo tudi Garau in sod. (2007), ki iz navedenega zaključujejo, da aktivnost β - glukozidaz inhibira zvišanje pH in CEC vrednosti po remediaciji kislih, onesnaženih tal z rdečim blatom in apnom. Poleg tega je bila aktivnost β - glukozidaz na splošno v pozitivni korelacijski s potencialno biodostopnostjo PSK v tleh (Preglednica 15). β - glukozidaze sodijo med ključne encime, ki so vključeni v kroženje ogljika v tleh; mikroorganizmi v onesnaženih tleh potrebujejo več ogljika kot tisti v neonesnaženih, predvsem za potrebe obnovitve in preživetja (Kandeler in sod., 1996). Po stabilizaciji tal s hidroksiapatitom in Slovakitom se je biodostopni delež PSK znižal, okoljski pogoji za talne mikroorganizme so se izboljšali, istočasno pa se je znižala tudi potreba mikroorganizmov po C. V neonesnaženih kmetijskih tleh sta apnenje tal in posledično zvišanje pH tal imela nasproten učinek, saj sta povisala aktivnost β -glukozidaz (Acosta- Martinez in Tabatabai, 2000). Dehidrogenaze so znotrajcelični encimi; so oksidoreduktaze, ki so prisotne le v živih, intaktnih celicah, merjenje njihove aktivnosti pa se uporablja za vrednotenje aktivnosti aktivne mikrobine populacije v tleh (Garau in sod., 2007; Alvarenga in sod., 2009). Rezultati naših raziskav so pokazali, da je dehidrogenazna aktivnost negativno korelirala z biodostopnostjo PSK (posebej določenih v DTPA ekstrakciji), kar je skupaj z določeno močno korelacijo med DHA in pH ter tudi CEC tal (Preglednica 15) dokazalo metabolično obnovitev tal (Garau in sod., 2007; Lee in

sod., 2009).

Bazalno in s substratom inducirano dihanje v tleh sta pogosto uporabljana testa za oceno strupenosti PSK za talne organizme (Brookes, 1995). Nizka stopnja z glukozo induciranega dihanja v kontrolnih onesnaženih tleh kaže na slabo funkcionalno stanje tal, ki pa se lahko izboljša z dodatkom aditivov (Slika 16). Upad dihanja je lahko posledica zavirane mikrobne rasti zaradi slabih pogojev v onesnaženih tleh (Lee, 2002); porast induciranega dihanja v tleh (do 5,2-kratnika) po dodatku aditivov je bilo v negativni korelaciji s potencialno biodostopnostjo PSK ter je močno koreliralo s pH in CEC vrednostjo tal (Preglednica 15). V literaturi lahko najdemo različne rezultate, ki potrjujejo spremenljivost v odzivu encimov na soodvisne talne parametre, na katere vpliva tako onesnaženost tal (Zhang in sod., 2010), kakor tudi remediacija tal z različnimi aditivi (Acosta-Martinez in Tabatabai, 2000; Garau in sod., 2007).

Preglednica 15: Koreacijski koeficient med kemijskimi (pH vrednost tal, kationska izmenjevalna kapaciteta (CEC) in potencialna biodostopnost PSK, določena z ekstrakcijami s dietilentriaminpentaoacetno kislino (DTPA), etilendiamintetraacetno kislino (EDTA), NH₄OAc, CaCl₂ in sekvenčno ekstrakcijo (vsota vodotopne (I) in izmenljive (II) frakcije)) in mikrobiološkimi (z glukozo inducirano dihanje (S.I.R.), kisle fosfataze (Kisle PA), bazične fosfataze (Bazične PA), β- glukozidaze (β- Glu) in dehidrogenaze (DHA)) lastnostmi neremediranih tal in tal remediranih s 5 % (w/w) hidroksiapatita in 5 % (w/w) Slovakita.

Table 15: Correlation coefficients (*r*) between chemical (soil pH, soil cation exchange capacity (CEC) and PTM bioaccessibility assessed by diethylenediamine pentaacetic acid (DTPA), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), ammonium acetate (NH₄OAc), CaCl₂ and sequential (sum of water soluble and exchangeable fractions) extractions) and microbial (soil glucose-induced respiration (S.I.R.), acid phosphatase (acid PA), alkaline phosphatase (alkaline PA), β- glucosidase (β- Glu) and dehydrogenase (DHA) activity) characteristics in non-amended soil and soils amended with 5 % (w/w) hydroxiapatite and Slovakite, respectively.

		S.I.R.	Kisle PA	Bazične PA	β- Glu	DHA
pH		0,876**	-0,975**	0,017	-0,923**	0,804**
CEC		0,937**	-0,967**	0,067	-0,883**	0,617
DTPA	Pb	-0,728*	0,65	0,05	0,733*	-0,933**
	Zn	-0,795*	0,783*	-0,017	0,833**	-0,933**
	Cd	-0,477	0,45	0,383	0,6	-0,767*
	Cu	-0,753*	0,700*	LOQ	0,817**	-0,95**
EDTA	Pb	-0,51	0,2	0,017	0,217	-0,1
	Zn	0,268	-0,4	0,45	-0,417	0,267
	Cd	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ
	Cu	0,418	-0,367	0,2	-0,25	0,683*
NH ₄ OAc	Pb	-0,481	0,37	0,437	0,462	-0,504

se nadaljuje

nadaljevanje

		S.I.R.	Kisle PA	Bazične PA	β - Glu	DHA
NH ₄ OAc	Zn	-0,854**	0,617	-0,1	0,700*	-0,683*
	Cd	-0,527	0,4	0,45	0,417	-0,417
	Cu	0,368	-0,617	0,067	-0,5	0,45
CaCl ₂	Pb	0,5	1,000**	0,5	-0,5	-0,5
	Zn	-0,854**	0,917**	LOQ	0,900**	-0,900**
	Cd	-0,754	0,771	0,829*	0,886*	-0,657
Sekvenčna	Cu	0,252	-0,259	0,293	-0,427	0,293
	Pb	0,923**	-0,869**	0,454	-0,869**	0,699
	Zn	-0,375	0,247	0,166	0,366	-0,586
	Cd	-0,869**	0,746**	-0,539*	0,814**	-0,807**
	Cu	-0,776	0,699**	-0,565*	0,776**	-0,670**

** p < 0,01
* p < 0,05

5.1.2 Vpliv biotičnih faktorjev na učinkovitost stabilizacije in kakovost tal

V naši raziskavi smo deževnikom izpostavili relativno majhne količine tal, zato je bil vpliv njihove aktivnosti (izdelovanje rogov in proces prehranjevanja ter depozicije črevesne sluzi in izločkov kožnih žlez) maksimalen. Deževniki lahko spremenijo fizikalne in kemijske lastnosti tal z izdelavo rogov in predelovanjem tal (bioturbacijo) (Wen in sod., 2004; Udovič in Leštan, 2007; Udovič in sod., 2007). Prisotnost deževnikov v vseh treh tleh (K, A5 in S5) je značilno znižala pH vrednosti tal (maksimalno za faktor 1,2) (Preglednica 5). Lazcano in sod. (2008) so dokazali, da do znižanja pH vrednosti lahko privede razgradnja organske snovi v tleh, ki jo deževniki s svojo aktivnostjo še pospešijo. Takrat se sprostita CO₂ in organske kisline, nastajati pa pričnejo fulvo in huminske kisline. Deževniki sčasoma povzročijo povišanje pH vrednosti tal (Sizmur in sod., 2011d); to lahko pripišemo izločanju kalcijevih spojin v okolje, ki izhajajo iz apnenih žlez (Ma in sod., 2002), ali pa izločanju alkalnega urina (Salmon, 2001). Različni vplivi deževnikov na pH vrednost tal so lahko posledica medvrstnih razlik pri proizvodnji glistin (Edwards, 2004). Čeprav je dokazano, da pH vrednost tal primarno določa del celokupne koncentracije PSK, ki se bo raztopila v talni raztopini (Yu in sod., 2005), navedeni vplivi deževnikov na pH tal kažejo, da zgolj spremembe v pH vrednosti niso edini mehanizem, ki vpliva na biodostopnost PSK v tleh.

Deževniki so vplivali tudi na zvišanje vsebnosti hranil (N in P) v tleh ter posledično

izboljšali oskrbo rastlin z njimi (Preglednica 7). Velike količine dušika lahko pridejo v tla skozi biomaso deževnikov, saj je večji del dušika v tkivu deževnika vezanega na proteine, vsebnost proteinov v deževnikih pa znaša 60-80 %. C:N razmerje se je po inkubaciji deževnikov zmanjšalo, najverjetneje zaradi porabe ogljika v procesu dihanja. Povišanje koncentracije dostopnega fosforja bi bilo lahko posledica povišanja fosfatazne aktivnosti, encimov deževnikov, ali pa mikrobne aktivnosti v tleh (Edwards in Bohlen, 1996).

Deževniki vplivajo na biodostopnost PSK ter njihovo porazdeljenost med različnimi talnimi frakcijami (Wen in sod., 2004; 2006; Udovič in Leštan, 2007; Udovič in sod., 2007). Z raziskavami smo dokazali, da deževniki nasprosto vplivajo na zvišanje biodostopnosti Pb in Zn v vseh treh tleh (K, A5, S5). Sekvenčna ekstrakcija je pokazala, da je aktivnost obeh vrst deževnikov vplivala na značilno zvišanje Pb in Zn (do 63 % za Pb in do 38 % za Zn) v izmenljivi frakciji (Leštan in sod., 2008), frakciji ki je najbolj mobilna in dostopna rastlinam (Wen in sod., 2004) (Preglednica 9). Vodotopna koncentracija Zn se je povišala le v kontrolnih tleh po inkubaciji deževnikov. Očiten je bil tudi vpliv deževnikov na organsko frakcijo tal, pri čemer je v približno isti meri prišlo do zvišanja koncentracije Pb in Zn, vezanih na organsko snov (maksimalno za faktor 1,4). Kovine, vezane na organsko snov, lahko sčasoma postanejo biodostopne, kar so dokazali Cheng in Wong (2002). Deževniki lahko z mešanjem iztrebkov v tla pospešijo kompleksiranje kovin in organske snovi ter na ta način povečajo dostopno koncentracijo kovin (Sizmur in sod., 2011d). Pri Cu in Cd smo zabeležili izrazite razlike v izkoristku sekvenčne ekstrakcije v kontrolnih in remediranih tleh pred inkubacijo deževnikov in po njej. Te so znižale zanesljivost primerjanja in statističnega vrednotenja pridobljenih rezultatov. Izkoristek smo računali iz vsote posameznih izkoristkov vsake stopnje sekvenčne ekstrakcije glede na celokupno koncentracijo kovin (določeno z zlatotopko), zaradi česar je napaka v končnem izkoristku ustreznost narasla.

Z enostopenjskimi ekstrakcijami (DTPA, CaCl_2) smo določili povečano biodostopnost Pb in Zn po inkubaciji deževnikov, kar sovпадa z rezultati Cheng in Wong (2002), Ma in sod. (2002) Zorn in sod. (2005), ter s tem potrdili rezultate sekvenčne ekstrakcije. V ekstrakciji z DTPA smo izmerili tudi višjo potencialno biodostopnost Cu po inkubaciji deževnikov, kar kažejo tudi rezultati Udovič in Leštan (2010). Koncentracija Cd, ekstrahirana z kelatnimi ligandi DTPA in EDTA, je bila nasprosto višja po inkubaciji deževnikov; ekstrakcija z NH_4OAc je pokazala nasprotijoče si rezultate oz. upad koncentracije Cd po inkubaciji deževnikov, ekstrahirana koncentracija Cd s CaCl_2 pa je bila v glavnem pod mejo zaznave ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$). Ker vsaka kemijska ekstrakcija poteka pod različnimi kemijskimi pogojmi (pH raztopine, čas trajanja ekstrakcije, vsebnost raztopin ipd.) je rezultate teh ekstrakcij zelo težko interpretirati (Sizmur in Hodson, 2009). Zaključki na podlagi le ene ekstrakcije nas lahko pripeljejo do zavajajočih interpretacij dolgoročnega učinka stabilizacije na biodostopnost PSK v tleh. Različne PSK imajo različne škodljive

vplive na okolje, kar tudi otežuje oz. onemogoča izbiro le enega, idealnega ekstrakcijskega testa za določanje njihovega vpliva na okolje in zdravje ljudi. Rezultati v Preglednicah 5-13 jasno kažejo, da je pomembno upoštevati razlike med posameznimi vrstami deževnikov, uporabljenih za oceno njihovega vpliva na fizikalne in kemijske lastnosti tal. Udovič in sod. (2007) so pri raziskovanju vpliva deževnika na PSK v tleh, ki so bila v postopku spiranja, dokazali, da imajo deževniki iz različnih ekoloških skupin oz. različne vrste deževnika iz iste ekološke skupine (Udovič in Leštan, 2007) različne vplive na biodostopnost ter porazdeljenost PSK v tleh. Za čim boljše razumevanje dolgoročnega učinka stabilizacije oz. vpliva deževnikov kot biotičnega faktorja na usodo PSK v določenih stabiliziranih tleh je zaželeno uporabljati tiste vrste deževnikov, ki so tam naravno res prisotne ali so uporabljene pri oživitvi tega območja (Butt, 1999).

Deževniki s svojo aktivnostjo (prehranjevanje, izdelovanje rogov, izločanje iztrebkov) ter s pogoji v svojem črevesju vplivajo na mikrobno populacijo (Sizmur in Hodson, 2009). Posamezne vrste deževnikov se medsebojno razlikujejo po svojih fizioloških lastnostih (Edwards, 2004), sposobnostjo za izdelavo rogov in posledično po svojem vplivu na kemijske, biološke ter fizikalne lastnosti tal, zaradi česar smo pričakovali različne vplive vrst *L. terrestris* in *D. veneta* na encimske aktivnosti v tleh (Slike 12-16). Vrsta *D. veneta* je imela znaten vpliv na biološko aktivnost v tleh (aktivnost dehidrogenaz in β -glukozidaz), medtem ko je imela vrsta *L. terrestris* načelno inhibitorni ali nevtralni vpliv. Čeprav je vrsta *L. terrestris* značilno zvišala stopnjo dihanja v tleh neodvisno od tipa tal, je vrsta *D. veneta* povisala dihanje v neremediranih tleh in ga inhibirala v tleh, remediranih s Slovakinom. Do povečanja mikrobnega dihanja v tleh lahko prihaja zaradi sproščanja dostopne kemijske oblike ogljika s strani deževnikov; ta vpliv je odvisen od vrste deževnikov in od fizikalno-kemijskih lastnosti tal (McLean in sod., 2006). McLean in sod. (2006) so dokazali tudi, da se mikrobne skupine v tleh sčasoma lahko prilagodijo na prisotne deževnike tako, da se prerazporedijo v manjše, a bolj aktivne skupine. V naši raziskavi je različen vpliv dveh vrst deževnikov očiten pri njihovem vplivu na dehidrogenazno aktivnost - vrsta *L. terrestris* ni vplivala na aktivnost dehidrogenaz, medtem ko je vrsta *D. veneta* statistično ($p < 0,01$) značilno zvišala njihovo aktivnost v remediranih tleh. To je lahko posledica fizioloških razlik med dvema vrstama deževnikov, saj so mikroorganizmi v tleh izpostavljeni specifičnim pogojem črevesja deževnikov, ki lahko spremenijo mikrobeno skupnost v tleh (Drake in Horn, 2007).

Deževniki so izboljšali biološko aktivnost v remediranih tleh in na ta način prispevali k rehabilitaciji tal ter obnovi talnih funkcij. Po drugi strani kompleksne interakcije med različnimi kemijskimi oblikami PSK v tleh in biološkimi sistemi še vedno niso popolnoma razumljene. Interpretacija rezultatov podobnih raziskav bi morala tako v prihodnje imeti bolj indikativno in ne toliko absolutno vlogo pri obravnavanju dolgoročnih učinkov remediacije tal z metodo stabilizacije na kakovost tal.

5.1.3 Možnosti izboljšanja postopka stabilizacije tal s dodajanjem Na_3EDDS in hranil (melase) tlem

S postopkom stabilizacije tal celokupne koncentracije PSK ne spremenimo, temveč izboljšamo status tal z zmanjšanjem mobilne in biodostopne ter potencialno nevarne koncentracije PSK v tleh.

Tri natrijeva sol [S,S]-EDDS (Na_3EDDS) je povzročila mobilizacijo PSK v Mx tleh (celokupna koncentracija Pb $787 \pm 3 \text{ mg kg}^{-1}$) na podlagi kompleksiranja kovin; sprali smo $15,1 \pm 0,8 \%$ Pb in $14,0 \pm 0,5 \%$ Cd pri uporabi 5 mM kg^{-1} Na_3EDDS ter $31,6 \pm 1,2 \%$ Pb in $22,5 \pm 0,3 \%$ Cd s 10 mM kg^{-1} Na_3EDDS . Že pri uporabi 15 mM kg^{-1} Na_3EDDS mobilizacija ni bila več tako učinkovita ($36,9 \pm 1,3 \%$ spranega Pb in $23,8 \pm 1,1 \%$ Cd), predvsem če upoštevamo ceno - 1 tona Na_3EDDS , kot produkt Enviomettm C140 (Innospec, Velika Britanija) stane kar 9680 €. Finžgar in sod. (2004) so ugotovili, da se od $24,7 \pm 2,4 \%$ spranega Pb iz onesnaženih tal po dodatku 10 mM kg^{-1} [S,S]-EDDS v štirih ciklih največ Pb spere v prvem ciklu ($14,5 \pm 2,7 \%$), in sicer iz organske frakcije. Imobilizacija Pb je bila učinkovita in se je zviševala s povečanjem koncentracije uporabljenih aditivov. Dodatek 5 % (w/w) hidroksiapatita je bil najučinkovitejši v kombinaciji z 10 mM kg^{-1} Na_3EDDS , saj je bila koncentracija Pb določena v ekstrakciji s NH_4OAc (Slika 10) 1,5-krat nižja od koncentracije Pb, določene v kontrolnih tleh brez aditivov (Slika 11- I talno obravnavanje); Slovakit je pri isti koncentraciji ter dodatku 10 mM kg^{-1} Na_3EDDS celo zvišal vsebnost Pb - po ekstrakciji z NH_4OAc kar za 1,6-krat v primerjavi s kontrolo (Sliki 10 in 11). V primeru dodatka 5 % (w/w) Slovakita brez Na_3EDDS je bila imobilizacija učinkovitejša; CaSx se je kljub pričakovanjem izkazal kot neučinkovit pri stabilizaciji s PSK onesnaženimi tlemi - 5 % (w/w) aditiva v kombinaciji z vodo je povzročil dvig koncentracije Pb - po ekstrakciji z NH_4OAc za kar 5-krat v primerjavi s kontrolo. Dodatek 10 mM kg^{-1} Na_3EDDS pa je dodatno zvišal izmenljivi Pb, ki je bil kar 17,8-krat višji kot v kontroli (Sliki 10 in 11). Na podlagi omenjenih rezultatov ter rezultatov iz prejšnjih raziskav (Tica in sod., 2011; 2013) smo poskus nadaljevali z dodatkom 5 % (w/w) hidroksiapatita, ki je zaradi svoje slabe topnosti ($K_{sp} 1 \times 10^{-100}$) v prednosti pred topnimi fosfatnimi aditivi, je prijazen do okolja in ne predstavlja tveganja za onesnaženje podtalnice (spiranje P in PSK) ali površinske vode (eutrofikacija) ter lahko sprosti več fitodostopnega fosforja v tleh, s čimer izboljša status hranil v njih (Chen in sod., 2003; Mignardi in sod., 2012).

Učinkovitost dodajanja melase na stabilizirana tla na razgradnjo Na_3EDDS ter vpliv na končni učinek stabilizacije tal smo preverjali z ekstrakcijskimi testi za določanje mobilnosti in potencialne biodostopnosti kovin (DTPA) ter fitodostopnosti kovin (NH_4OAc), pa tudi s testom UBM za določanje oralne biodostopnosti PSK v tleh. Tla, ki smo jih uporabljali v raziskavi, so vsebovala različne začetne koncentracije Pb, Zn in Cd;

Mz so bila glede na vsebnost treh kovin najbolj onesnažena, sledila so My in na koncu Mx tla (Preglednica 8).

Obe ekstrakciji sta pokazali, da mobilnost oz. fitodostopnost kovin pada v zaporedju Cd > Pb > Zn (amonoacetatna ekstrakcija, koncentracija Pb ≈ Zn). Znano je, da Cd zlahka vstopa v prehranjevalno verigo in se hitro prenaša skozi njo. V rastlinah pogosto doseže koncentracije, ki niso strupene za rastline, temveč nevarne za končne prijemnike - ljudi in živali (McLaughlin in sod., 2000; Bolan in sod., 2003). Dodatek hidroksiapatita je načeloma znižal koncentracije vseh treh PSK, določeno z ekstrakcijami z DTPA in NH₄OAc (Sliki 8 in 11). Statistično značilnih razlik nismo zabeležili ($p < 0,01$) pri Pb-DTPA ter Zn- NH₄OAc. Tla so bila nevtralna in so po dodatku melase s pH vrednostjo 7,45 (III. in IV. obravnavanje) dosegla pH v mejah zmerno alkalnih tal (Preglednica 5). Dodatek Na₃EDDS je skupaj z melaso vplival na mobilizacijo in sproščanje več biodostopnih PSK v vseh treh analiziranih tleh (Sliki 8 in 11), najverjetneje zaradi hitre razgradnje kompleksov kovine in EDDS-a. Najbolj očiten je bil vpliv na koncentracijo Zn, še posebej po ekstrakciji z amonoacetatom, ko se je po dodatku melase (III. obravnavanje) koncentracija Zn v primerjavi s kontrolnimi tlemi (I. obravn.) zvišala 13-krat v Mx in My oz. 5,7-krat v Mz. Zn velja za kovino, ki je v tleh prisotna v ionski (prosti ali kompleksirani) obliki talne raztopine in se zlahka mobilizira oz. prestavi v bolj topne oblike (Kabata- Pendias, 2001). Učinek stabilizacije po dodatku 5 % (w/w) hidroksiapatita, 10 mM kg⁻¹ Na₃EDDS in 5 % melase (po 24 h od dodatka aditivov) ni statistično značilno ($p < 0,01$) vplival na znižanje koncentracije kovin v primerjavi s tlemi, ki smo jim dodali le 5 % hidroksiapatita. Koncentracije PSK so bile približno enake, ali celo višje v tleh po IV obravnavanju, določeno z obema omenjenima kemijskima ekstrakcijama (Sliki 8 in 11).

Pri ocenjevanju nevarnosti PSK v tleh za zdravje ljudi je potrebno določiti oralno biodostopno koncentracijo PSK in z njem oceniti uspešnost remediacije (Roussel in sod., 2010). V želodčni fazi smo dobili zelo visoke vrednosti biodostopnosti kovin (v kontrolnih tleh oz. v I. obravnavanju) tal je bila biodostopnost Pb za Mx $82,5 \pm 1,5\%$, za My $79,9 \pm 1,5\%$ in Mz $97,5 \pm 3,5\%$ glede na celokupnu koncentraciju Pb), ki se niso statistično značilno razlikovale med seboj v različnih talnih obravnavanjih (I-IV); to je veljalo tudi za Cd in Zn (Preglednica 14). To lahko pripisemo mobilizaciji PSK, ki se že začne v ustih in zelo nizkemu pH v želodčni frakciji (od 1,2 do 1,5) (Roussel in sod., 2010). V črevesni frakciji smo izmerili precej nižje koncentracije PSK kot v želodčni (Slika 17), najverjetneje zaradi ponovne adsorpcije PSK na talne delce, kompleksiranja s pepsinom ali kemijsko precipitacijo zaradi visoke pH vrednosti ($6,3 \pm 0,5$) v črevesju (Ellickson in sod., 2001). Izmerjene koncentracije PSK v črevesni frakciji so potencialno dostopne za absorpcijo v črevesju, od koder lahko posledično prispejo v krvni obtok. Medsebojno so se koncentracije razlikovale pri različnih talnih obravnavanjih; oralna biodostopnost (% celokupne koncentracije kovin) za Pb, Cd in Zn v kontrolnih tleh je sledila naslednjemu

zaporedju Cd > Pb > Zn, kar so določili tudi Pelfrêne in sod. (2010). Z UBM testom smo potrdili učinkovitost stabilizacije tal tudi s stališča oralne biodostopnosti kovin (po dodatku hidroksiapatita je koncentracija biodostopnih kovin precej padla - koncentracija Pb se je v My tleh znižala 4-, v Mz pa celo 14- krat) (Slika 17). To dejstvo je predvsem pomembno pri Pb, saj je ta v tleh močno vezan v talno matriko in po zaužitju onesnaženih tal predstavlja največjo nevarnost za zdravje ljudi (McLaughlin in sod., 2000). Dodatek melase je povzročil povečanje biodostopnih koncentracij PSK (v skladu z enostopenjskimi ekstrakcijami), ki se v IV. talnem tretmaju, po dodatku aditiva skupaj in melase ter Na₃EDDS niso statistično značilno znižale ($p < 0,01$). To pa ni prispevalo k izboljšanju končnega učinka remediacije (Slika 17).

Pelfrêne in sod. (2010) in Roussel in sod. (2010) so v svojih raziskavah določili pozitivno linearno povezavo med oralno biodostopnimi in celokupnimi koncentracijami kovin, kar lahko kaže na to, da oralno biodostopna koncentracija kovin ponuja bolj realno informacijo o nevarnosti PSK v tleh za zdravje ljudi kot celokupna koncentracija.

5.2 SKLEPI

Z opravljenim raziskovalnim delom smo pozitivno odgovorili na prvo hipotezo, saj je bila stabilizacija uspešna - biodostopnost PSK je učinkovito znižana, kakovost tal nekoliko izboljšana, kar skupaj z ugodno ceno stabilizacije tal (v primerjavi z ostalimi remediacijskimi tehnikami) omogoča njeni uporabo na velikih površinah. Potrdili smo tudi drugo hipotezo, saj je bil vpliv deževnikov na potencialno biodostopnost PSK in funkcionalnost tal očiten, medtem ko je bil odgovor na tretjo hipotezo negativen. Na podlagi opravljenega raziskovalnega dela lahko povzamemo naslednje ugotovitve:

- stabilizacija tal s hidroksiapatitem in Slovakitom se je pokazala kot uspešna metoda remediacije tal, saj je znižala potencialno biodostopnost PSK; Slovakit pa je bil pri istih uporabljenih koncentracijah uspešnejši;
- stabilizacija tal, onesnaženih s PSK, je izboljšala kakovost tal, saj so se funkcije tal obnovile, kar smo ovrednotili s pomočjo meritev fizikalnih, kemijskih in predvsem bioloških indikatorjev kakovosti; dehidrogenaze in β -glukozidaze ter z glukozo inducirano dihanje so se izkazali kot najobčutljivejši parametri za spremembe pH, CEC in potencialne biodostopnosti PSK ter posledično kot primerni potencialni indikatorji za zaznavanje pritiskov na okolje, zdravje in kakovost tal;
- rezultati sekvenčne ekstrakcije (vodotopne in izmenljive frakcije) in ekstrakcije z DTPA so najbolj korelirale z aktivnostjo mikroorganizmov oz. encimsko aktivnostjo, hkrati pa so se te ekstrakcije pokazale kot primerne za oceno učinkovitosti stabilizacije PSK v onesnaženih zmerno kislih ilovnatih tleh;
- nevarnost s PSK onesnaženih tal za zdravje ljudi se je po dodatku stabilizanta hidroksiapatita izrazito zmanjšala;
- deževniki, ki delujejo na tla po remediaciji (biotski faktor), lahko bistveno vplivajo na dolgoročno učinkovitost remediacije; zvišajo lahko dostopnost in mobilnost PSK in s tem zmanjšajo končni učinek remediacije;
- deževniki imajo lahko pozitiven vpliv na biološko aktivnost v remediranih tleh oz. lahko spodbujajo rehabilitacijo in funkcionalnost tal po remediaciji; različne vrste deževnikov so različno vplivale na mikrobeno in encimsko aktivnost v tleh;
- kompleksne interakcije med različnimi kemijskimi oblikami PSK v tleh in biološkimi sistemi še vedno niso popolnoma razjasnjene; interpretacija rezultatov podobnih raziskav bi tako v prihodnje morala imeti prej indikativno kot absolutno

vlogo pri obravnavanju dolgoročnih učinkov remediacije tal;

- učinkovitost stabilizacije tal, onesnaženih s PSK, se po dodatku hidroksiapatita skupaj z Na₃EDDS in melaso ni izboljšala - učinek je bil ali isti kot pri dodajanju hidroksiapatita ali celo manjši.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Antropogeno onesnaževanje tal s potencialno strupenimi kovinami (PSK) sicer traja že tisočletja, a se je v zadnjih petdesetih letih zaradi skokovitega tehnološkega napredka še okreplilo in postal zaskrbljujoče zaradi vplivov, ki jih PSK v višjih koncentracijah predstavljajo tako za okolje kot tudi človekovo zdravje. Onesnaževanje tal je sicer le ena izmed oblik degradacije tal; to je počasen proces, ki pogosto nima trenutnih dramatičnih posledic, povzroča pa kronične, dolgotrajne vplive na okolje, saj se kovine v tleh ne razgradijo temveč v njih vztrajajo desetletja, stoletja ali celo tisočletja. Posledice, ki jih povzročajo PSK na ekosisteme in zdravje ljudi, so v veliki meri odvisne od kemijske oblike kovin; kovine so namreč redko v celoti biodostopne. Tla, onesnažena s PSK, ki so v neposrednem stiku z ljudmi in lahko tako bistveno vplivajo na njihovo zdravje, je potrebno nujno remedirati - mobilizirane, škodljive oblike PSK je potrebno prevesti v nemobilne oblike, ali pa PSK popolnoma odstraniti iz tal.

Stabilizacija tal je obetavna metoda remediacije, ki temelji na dodajanju aditivov (stabilizantov) v onesnažena tla, s čemer se mobilnost in biodostopnost PSK skozi procese obarjanja, sorpcije, ionske izmenjave ali kompleksiranja kovin brez spremnjanja njihove celokupne koncentracije zmanjša. Prednosti stabilizacije v primerjavi z drugimi remediacijskimi tehnikami so njena enostavnost, možnost izvedbe na kraju onesnaženja (*in situ*), velika učinkovitost in nizki ekonomski stroški ($40-65 \text{ \$/m}^3$).

Pri našem raziskovalnem delu smo preučevali učinkovitost stabilizacije tal preko zmanjšanja biodostopnosti kovin in vplivov na funkcionalno obnovitev tal. Poleg fizikalno-kemijskih parametrov smo spremljali tudi vpliv PSK na mikrobiološke ter encimske aktivnosti, ki predstavljajo zelo občutljive biološke indikatorje tal in jih lahko kot take uporabljamo za oceno funkcionalne degradacije tal zaradi onesnaženosti s PSK ter obnavljanja funkcij tal in izboljšanje talne kakovosti med procesi remediacije tal. Stabilizacija tal s hidroksiapatitom in Slovakinom se je pokazala kot uspešna metoda remediacije, saj je znižala potencialno biodostopnost PSK, kar smo dokazali z različnimi ekstrakcijskimi testi (DTPA, EDTA, CaCl_2 , NH_4OAc , UBM) ter s študijo porazdeljenosti kovin po različnih talnih frakcijah (modificirana Tessierjeva sekvenčna ekstrakcijska shema). Slovakin se je pri koncentraciji 5 % (w/w) izkazal kot učinkovitejši izmed obeh aditivov. Funkcionalnost tal se je po stabilizaciji izboljšala; β -glukozidaze, dehidrogenaze in z glukozo inducirano dihanje so se pokazali kot najobčutljivejši parametri za spremembe pH, CEC in potencialne biodostopnosti PSK ter posledično kot primerni indikatorji za zaznavanje pritiskov na okolje, zdravje in kakovost tal.

Po remediaciji tla izpostavimo delovanju različnih okoljskih dejavnikov (biotskih in abiotskih), ki lahko vplivajo na biodostopnost in mobilnost PSK ter tako zmanjšajo končni učinek remediacije. V naši raziskavi so deževniki (biotski faktor) bistveno vplivali na dolgoročno učinkovitost remediacije, saj so zvišali dostopnost in mobilnost PSK in s tem zmanjšali končni učinek remediacije. Sočasno so vplivali na izboljšanje funkcionalnosti tal in spodbudili rehabilitacijske procese. Vpliv deževnikov na procese v tleh po remediaciji z metodo stabilizacije je težko posploševati; pri tovrstnih raziskavah je priporočljivo izvesti nabor različnih kemijskih ekstrakcij ter uporabiti vrste deževnikov, ki so na onesnaženem območju naravno prisotne.

Metodo stabilizacije smo poskušali izboljšati z dodajanjem Na₃EDDS in melase v tla, stabilizirana s hidroksiapatitom. Končni učinek slednjega je bil isti ali celo manjši kot pri dodajanju hidroksiapatita brez kelatnega liganda.

Po našem mnenju bi bilo zaželeno veljavno zakonodajo RS, ki temelji na določanju zgolj celokupnih koncentracij PSK v tleh, dopolniti, saj so PSK v tleh redko v celoti tudi biodostopne. Stabilizacija tal, onesnaženih s PSK, hidroksiapatitom in Slovakitom, se je pokazala kot primerna remediacijska tehnika za zmanjšanje biodostopnosti kovin v onesnaženih tleh, vendar bi bilo nadaljne preučevanje postremediacijskih procesov zaradi celovitejše in realnejše ocene učinkovitosti remediacije nujno.

6.2 SUMMARY

Contamination of soil environment with potentially toxic metals (PTMs) through antropogenic activities has been occurring for centuries but its extent has increased markedly in the last fifty years due to technological developments. Widespread concern has arisen over the adverse effects they might have on human and environmental health. Soil contamination is only one aspect of soil degradation; this process is slow, often without current dramatic consequences. Metals don't undergo microbial or chemical degradation, but persist in soils for a long time, leading to chronic effects in the environment. However, their effect depends on the PTM chemical forms in soil; metals are rarely completely bioavailable i.e. available for absorption into living organisms. These soils, contaminated with PTMs, need urgent remediation i.e. PTMs in the soil need to be transformed into harmless forms or removed.

Stabilization is considered to be a promising soil remediation technique in terms of decreasing PTMs mobility and bioaccessibility by adding various amendments to contaminated soil. Stabilization of metals is based on the reduction of metal mobility and accessibility, either by precipitation, increased sorption, ionic exchange or PTMs complexation, without changing their total concentrations in soil. Advantages of soil stabilization over other remediation techniques are simplicity, *in situ* application, high effectivity and low costs ($40\text{-}65 \text{ \$/m}^3$).

In our study we investigated effectiveness of soil stabilization according to reduced bioaccessibility of PTMs and their impact on soil functional recovery. Beside physico-chemical parameters we also considered effect of PTMs on microbial and enzymatic activity, because these biological indicators are more sensitive and can be used, together with physical and chemical characteristics, for monitoring soil functional degradation due to PTM contamination and soil functional recovery/restoration after a remediation intervention. Soil stabilization with hydroxyapatite and Slovakite amendments was successful in lowering the potential bioaccessibility of PTMs, what we determined by different extraction tests (DTPA, EDTA, CaCl_2 , NH_4OAc , UBM) as well as by modified Tessier's sequential extraction procedure, for determining metla fractionation in soils. Slovakite was more effective at the concentration of 5 % w/w. After stabilization of soil we improved soil functionality as well. β - glucosidase and dehydrogenase activity together with glucose-induced respiration were the most sensitive enzymes to pH, CEC and PTMs potential bioaccessibility changes in the soil, demonstrating their potential as indicators of soil stress, health and quality.

After remediation soils are exposed to various environmental factor (biotic and abiotic), which can eventually influence stabilized PTMs and change their mobility and

bioaccessibility, thus affecting the efficiency of soil remediation in time. In our study earthworms (biotic factor) has significantly influenced the efficiency of soil stabilization-they increased PTMs bioaccessibility and mobility indicating that stabilization effect may decrease over time. At the same time they have improved soil functionality and promoted processes of soil rehabilitation. The earthworms's effects on remediated soils by stabilization method are difficult to generalize; in similar studies it will be preferred to choose earthworm species and extraction tests regarding to the characteristics of contaminated site.

We have tried to improve soil stabilization by adding Na₃EDDS and molasses to already stabilized soils with hydroxyapatite. Final effect wasn't better than effect of stabilization with hydroxyapatite without Na₃EDDS; in the best case it was similar to it.

In our opinion, it will be useful to improve currently valid Slovenian legislation for soil and soil protection, because it is based on total PTMs concentration and rarely are metals in soil completely bioaccessible. Soil stabilization with hydroxyapatite and Slovakite was effective and suitable for soil remediation, because it affected PTMs bioaccessibility in soils by reducing it. Monitoring of postremediation processes should be more investigated in future, because of more complete and more realistic assessment of remediation efficacy.

7 VIRI

- Acosta-Martinez V., Tabatabai M. A. 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils*, 31: 85–91
- Adriano D. C. 2001. Trace elements in terrestrial environments; Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd ed. New York, Springer: 867 str.
- Adriano D. C., Wenzel W. W., Vangronsveld J., Bolan N. S. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, 122: 121-142
- Alpaslan B., Yukselen M. A. 2002. Remediation of lead contaminated soils by stabilization/solidification. *Water Air and Soil Pollution*, 133: 253-263
- Alvarenga P., Palma P., Gonçalves A. P., Fernandes R. M., de Varennes A., Vallini G., Duarte E., Cunha-Queda A. C. 2009. Organic residues as immobilizing agents in aided phytostabilization: (II) Effects on soil biochemical and ecotoxicological characteristics. *Chemosphere*, 74: 1301-1308
- Antoniadis V. C., Tsadilas D., Ashworth D. J. 2007. Monometal and competitive adsorption of heavy metals by sewage sludge-amended soil. *Chemosphere*, 68, 3: 489-494
- Basta N. T., McGowen S. L. 2004. Evaluation of chemical immobilization treatments for reducing heavy metal transport in a smelter-contaminated soil. *Environmental Pollution*, 127: 73–82
- Binet, F., Fayolle, L., Pussard, M., 1998. Significance of earthworms stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 27: 79-84
- Boisson J., Ruttens A., Mench M., Vangronsveld J. 1999. Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part 1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation. *Environmental Pollution*, 104: 225-233
- Bolan N. S., Adriano D. C., Duraisamy P., Mani A., Arulmozhiselvan K. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils I. Effect of phosphate addition. *Plant and Soil*, 250: 83-94
- Bradl H. B., Kim C., Kramar U., Stüben D. 2005. Interactions of heavy metals. V: Heavy metals in the environment. Vol 6. Bradl H. B. (ed.). 1st ed. Neubrucke, Elsevier Academic Press: 28-164
- Brady N. C., Weil R. R. 2008. The Nature and Properties of Soil. 14th ed. New Jersey, Prentice Hall: 975 str.
- Brookes P. C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 269–279
- Brown S., Chaney R., Hallfrisch J., Ryan J. A., Berti W. R. 2004. *In situ* treatments to reduce the phyto- and bioavailability of lead, zinc and cadmium. *Journal of Environmental Quality*, 33: 522–531
- Butt K. R. 1999. Inoculation of earthworms into reclaimed soils: the UK experience. *Land*

- Degradation and Development, 10: 565–575
- Cao R. X., Ma L. Q., Chen M., Singh S. P., Harris W. G. 2003. Phosphate-induced metal immobilization in a contaminated site. Environmetal Pollution, 122: 19-28
- Chen M., Ma L. Q., Singh S. P., Cao R. X., Melamed R. 2003. Field demonstration of *in situ* immobilization of soil Pb using P amendments. Advances in Environmental Research, 8: 93-102
- Chen S., Xu M., Ma Y., Yang J. 2007. Evaluation of different phosphate amendments on availability of metals in contaminated soil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 67: 278-285
- Chen Z. S., Lee G. J., Liu J. C. 2000. The effects of chemical remediation treatments on the extractability and speciation of cadmium and lead in contaminated soils. Chemosphere, 41: 235-242
- Cheng J., Wong M. H. 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. Biology and Fertility of Soils, 36: 72–78
- Chlopecka A., Adriano D. C. 1997. Influence of zeolite, apatite and Fe-oxide on Cd and Pb uptake by crops. The Science of the Total Environment, 207: 195-206
- Coeurdassier M., Scheifler R., de Vaufleury A., Crini N., Saccomani C., Du Mont L. S., Badot P. M. 2007. Earthworms influence metal transfer from soil to snails. Applied Soil Ecology, 35: 302-310
- Contaminants and Remedial Options at Selected Metal-Contaminated Sites. 1995. Washington DC, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development.
- <a href="http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/100026C0.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000000%5C100026C0.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=p%7Cf&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL# (10. november 2012)
- Contin M., Mondini C., Leita L., De Nobili M. 2007. Enhanced soil toxic metal fixation in iron (hydr)oxides by redox cycles. Geoderma, 140: 164-175
- Dandan W., Huixin L., Feng H., Xia W. 2007. Role of earthworm–straw interactions on phytoremediation of Cu contaminated soil by ryegrass. Acta Ecologica Sinica, 27, 4: 1292–1298
- Dermont G., Bergeron M., Mercier G., Richer-Laflèche M. 2008. Metal- contaminated soils: remediation practices and treatment technologies. The Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 12, 3: 188-209

- Devliegher W., Verstraete W. 1995. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: nutrient-enrichment processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 12: 1573-1580
- Dickinson N. M. 2000. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere*, 41: 259-263
- Drake H. L., Horn M. A. 2006. Earthworms as a transient heaven for terrestrial microbes: a review. *Engineering in Life Science*, 6, 3: 261-265
- Drake H. L., Horn M. A. 2007. As the worm turns: The earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology*, 61: 169-189
- Edwards C. A. 2004. *Earthworm Ecology*. 2nd ed. Boca Raton, Florida, CRC Press: 441 str.
- Edwards C. A., Bohlen P. J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. 3rd ed. London, UK, Chapman & Hall: 426 str.
- Ejsackers H. 2010. Earthworms as colonisers: Primary colonisation of contaminated land, and sediment and soil waste deposits. *Science of the Total Environment*, 408: 1759-1769
- Eivazi F., Tabatabai M. A. 1988. Factor affecting glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 22: 891-897
- Ellickson K. M., Meeker R. J., Gallo M.A., Buckley B.T., Lioy P.J. 2001. Oral bioavailability of lead and arsenic from a NIST standard reference soil material. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40: 128-135
- Environmental Assessment of Soil for Monitoring Volume VI: Soil Monitoring System for Europe. 2008. European Commission, JRC Scientific and Technical Reports: 72 str. http://eusoils.jrc.ec.europa.eu/projects/envasso/documents/ENV_Vol-VI_Final2_web.pdf (januar 2010)
- Evangelou M. W. H., Daghan H., Schaeffer A. 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*, 57: 207-213
- Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance (BBodSchV). 1999. <http://www.umweltbundesamt.de/boden-und-altlasten/altlast/web1/berichte/pdf/bbodschv-engl.pdf> (januar 2013)
- Finžgar N., Kos B., Leštan D. 2006. Bioavailability and mobility of Pb after soil treatment with different remediation methods. *Plant, Soil and Environment* 52, 25-34
- Finžgar N., Kos B., Leštan D. Washing of Pb contaminated soil using [S,S] ethylenediamine disuccinate and horizontal permeable barriers. *Chemosphere*, 57, 7: 655-661
- Fleri M. A., Whetstone G. T. 2007 *In situ* stabilisation/solidification: Project lifecycle. *Journal of Hazardous Materials*, 141: 441-456
- Friesl-Hanl W., Platzer K., Horak O., Gerzabek M.H. 2009. Immobilising of Cd, Pb, and Zn contaminated arable soils close to a former Pb/Zn smelter: A field study in Austria over 5 years. *Environmental Geochemistry and Health*, 31: 581-594
- Fruchter J. 2002. *In situ* treatment of chromium-contaminated groundwater. *Environmental*

- Science and Technology, 36, 23: 464A–472A
- Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P., Melis P. 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in a contaminated soil. Geoderma, 142: 47-57
- Geebelen W., Adriano D.C., Lelie D. v.d., Mench, M., Carleer, R., Clijsers H., Vangronsveld J. 2003. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. Plant and Soil, 249: 217-228
- Gray C. W., Dunhan S. J., Dennis P. G., Zhao F. J., McGrath S. P. 2006. Field evaluation of *in situ* remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. Environmental Pollution, 142: 530–539
- Grčman H., Hudnik, V., Lobnik, F., Mihelič, R., Prus, T., Vrščaj, B, Zupan, M. 2004. Tla VI: Narava Slovenije. Zych B., Mihelač Š. (ur.). Ljubljana, Mladinska knjiga: 147-165
- Grčman H., Zupan M. 2010. Praktična pedologija. Center za pedologijo in varstvo okolja.
- Guo G., Zhou Q., Ma L. Q. 2006. Availability and assessment of fixing additives for the *in situ* remediation of heavy metal contaminated soils: A review. Environmental Monitoring and Assessment, 116: 513-528
- Gusiatin Z. M., Klimiuk E. 2012. Metal (Cu, Cd and Zn) removal and stabilization during multiple soil washing by saponin. Chemosphere, 86: 383-391
- Hettiarachchi G, Pierzynski G, Ransom M. 2000. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide. Environmental Science and Technology, 34: 4614-4619
- Hettiarachchi G, Pierzynski G, Ransom M. 2001. *In situ* stabilization of soil lead using phosphorus. Journal of Environmental Quality, 30: 1214-1221
- Hooda P. S. 2010. Trace elements in soils. Chichester, UK, Wiley, A John Wiley and Sons: 596 str.
- ISO 11277. Soil quality - Determination of particle size distribution in mineral soil material - Method by sieving and sedimentation. 1998
- ISO 11466. Soil quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia. 1995
- ISO 10390. Soil Quality – Determination of pH. 2005
- Izvajanje Tematske strategije za varstvo tal- osnutek mnenja Odbora regij. 2012. Evropska Unija, Odbor regij, ENVE-V-026: 13 str.
<http://coropinions.cor.europa.eu/coropiniondocument.aspx?language=sl&docnr=1121&year=2012> (december 2012)
- Jaworska J. S., Schowanek D., Feijtel T. C. J. 1999. Environmental risk assesment for trisodium [S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications. Chemosphere, 38: 3597–3625
- Jevtić-Mučibabić J., Grbić J., Mišljenović N., Koprivica G., Kuljanin T., Radivojević S. 2011. Nitrogen compounds in the molasses. Journal on Processing and Energy in Agriculture, 15, 3: 169-172
- Jimenez M., Horra A. M., Pruzzo L., Palma R. M. 2002. Soil quality: a new index based on

- microbiological and biochemical parameters. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 302–306
- Kabata-Pendias A. 2001. Trace Elements in Soils and Plants. 3rd ed. Boca Raton, Florida, USA, CRC Press: 413 str.
- Kalra Y. P., Maynard D. G. 1991. Methods manual for forest soil and plant analysis. Alberta, Forestry Canada, Northern Forestry Centre: 116 str.
- Kandeler E., Kampichler C., Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soil*, 23: 299-306
- Kizilkaya R. 2004. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering*, 22: 141-151
- Kizilkaya R., Hepşen Ş. 2007. Microbiological Properties in Earthworm Cast and Surrounding Soil Amended with Various Organic Wastes. *Communications in Soil Science and Plant Analyses*, 38: 2861-2876
- Kos B., Grčman H., Leštan D. 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant, Soil and Environment*, 49: 548-553
- Kos B., Leštan D. 2003. Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers. *Environmental Science and Technology*, 37: 624-629
- Kos B., Leštan D. 2004. Soil washing of Pb, Zn and Cd by using biodegradable chelator and permeable barriers and induced phytoextraction by *Cannabis sativa*. *Plant and Soil*, 263: 43-51
- Kosson D. S., Van der Sloot H. A., Sanchez F., Garrabrants A. C. 2002. An integrated framework for evaluating leaching in waste management and utilization of secondary materials. *Environmental Engineering Science*, 19: 159–204
- Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. 2007. Stabilization of Pb- and Cu- contaminated soil using coal fly ash and peat. *Environmental Pollution*, 145, 1: 365-373
- Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. 2008. Stabilization of As, Cr, Pb and Zn in soil using amendments: A review. *Waste Management*, 28: 215-225
- Laperche V., Traina S. J., Gaddam P., Logan T. J. 1996. Chemical and mineralogical characterizations of Pb in a contaminated soil: reactions with synthetic apatite. *Environmental Science and Technology*, 30: 3321-3326.
- Lazcano C., Gómez-Brandón M., Domínguez J. 2008. Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere*, 72: 1013-1019
- Lee S. H., Kim E. Y., Park H., Yun J., Kim J. G. 2011b. *In situ* stabilization of arsenic and metal-contaminated agricultural soil using industrial by-products. *Geoderma*, 161, 1-7
- Lee S. H., Lee J. S., Choi Y. J., Kim J. G. 2009. *In situ* stabilization of cadmium-, lead- and zinc-contaminated soil using various amendments. *Chemosphere*, 77: 1069-1075
- Lee S. H., Park H., Koo N., Hyun S., Hwang A. 2011a. Evaluation of the effectiveness of various amendments on trace metals stabilization by chemical and biological methods. *Journal of Hazardous Materials*, 188: 44-51

- Leštan D. 2002. Ekopedologija: Študijsko gradivo za študente opredelilnega izbirnega študija Ekopedologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 267 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 & Sediment Contamination, 12: 507-522
- Leštan D., Luo C., Li X. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soil: A review. Environ. Pollut, 153: 3-13
- Li H., Shi W.-y., Shao H.-b., Shao M.-a. 2009. The remediation of the lead-polluted garden soil by natural zeolite. Journal of Hazardous Materials, 169: 1106-1111
- Lindsay W. L., Norvell W. A. 1978. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal, 42: 421-428
- Lombi E., Zhao F. J., Zhang G., Sun B., Fitz W., Zhang H., McGrath S. P. 2002. *In situ* fixation of metals in soils using bauxite residue: chemical assessment. Environmental Pollution, 118: 435–443
- Lukkari T., Teno S., Väisänen A., Haimi J. 2006. Effects of earthworms on decomposition and metal availability in contaminated soil: Microcosm studies of populations with different exposure histories. Soil Biology and Biochemistry, 38: 359-370
- Ma Q. Y., Traina S. J., Logan T. J. 1993. *In situ* lead immobilization by apatite. Environmental Science and Technology, 27: 1803-1810
- Ma Y., Dickinson N. M., Wong M. H. 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. Biology and Fertility of Soils, 36: 79-86
- Ma Y., Dickinson N. M., Wong M. H. 2003. Interactions between earthworms, trees, soil nutrition and metal mobility in amended Pb/Zn mine tailings from Guangdong, China. Soil Biology and Biochemistry, 35: 1369-1379
- Madrid F., Romero A. S., Madrid L., Maqueda C. 2006. Reduction of availability of trace metals in urban soils using inorganic amendments. Environmental Geochemistry and Health, 28: 365-373
- Martin T. A., Ruby M. V. 2004. Review of *in situ* remediation technologies for lead, zinc and cadmium in soil. Bioremediation Journal, 14, 3: 35-53
- Massalimov I. A., Vikhareva I. N., Kireeva M. S. 2007. Use of Polysulfides of Alkali and Alkaline-Earth Metals To Obtain Highly Dispersed Sulfur. Russian Journal of Applied Chemistry, 81, 2: 183-187
- McLaughlin M. J., Zarcinas B. A., Stevens D. P., Cook N. 2000. Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analyses, 31: 1661–1700
- McLean M. A., Migge-Kleian S., Parkinson D. 2006. Earthworm invasions of ecosystems devoid of earthworms: Effects on soil microbes. Biological Invasions, 8: 1257-1273
- Menzies N. W., Donn M. J., Kopittke P. M. 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. Environmental Pollution, 145: 121-130
- Mignardi S., Corami A., Ferrini V. 2012. Evaluation of the effectiveness of phosphate

- treatment for the remediation of mine waste soils contaminated with Cd, Cu, Pb, and Zn. *Chemosphere*, 86: 354-360
- Mikanova O. 2006. Effects of heavy metals on some soil biological parameters. *Journal of Geochemical Exploration*, 88: 220-223
- Miretzky P., Fernandez-Cirelli A. 2008. Phosphates for Pb immobilization in soils: a review. *Environmental Chemistry Letter*, 6: 121-133
- Moseley R. A., Barnett M. O., Stewart M. A., Mehlhorn T. L., Jardine P. M., Ginder-Vogel M., Fendorf S. 2008. Decreasing lead bioaccessibility in industrial and firing range soils with phosphate-based amendments. *Journal of Environmental Quality*, 37: 2116-2124
- Mršić N. 1997. Živali naših tal. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 416 str.
- Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. 2001. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: An evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193–207
- Nacionalni program varstva okolja (Program ukrepov na področju varstva tal), 1999. Ur. l. RS, št. 83/1999
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199983&stevilka=3953> (december 2012)
- Nannipieri P., Giagnoni L., Landi L., Renella G. 2011. Role of phosphatase enzymes in soil. V: *Soil Biology*. Vol 26. *Phosphorus in action, Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling*. Büinemann E. K., Oberson A., Frossard E. (eds.). Berlin, Springer: 215-243
- Negim O., Mench M., Bes C., Motelica-Heino M., Amin F., Huneau F., Le Coustumer P. 2012. In situ stabilization of trace metals in copper-contaminated soil using P-spiked Linz-Donawitz slag. *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 847-857
- Nishikiori T., Okuyama T., Naganawa T., Takita T., Hamida M., Takeuchi T., Aoyagi T., Umezawa H. 1984. Production of actinomycetes of (S,S)-N, N'-ethylenediamine-disuccinic acid, an inhibitor of phospholipase C. *The Journal of Antibiotics*, 37, 426–427
- Novozamsky I., Lexmond Th. M., Houba V. J. G. 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51: 47–58
- Nowack B., Schulin R., Luster J. 2010. Metal fractionation in a contaminated soil after reforestation: Temporal changes versus spatial variability. *Environmental Pollution*, 158: 3272–3278
- Oomen A. G., Rompelberg C. J. M., Bruil M. A., Dobbe C. J. G., Pereboom D. P. K. H., Sips A. J. A. M. 2003. Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 281-287
- Oste L. A., Lexmond T. M., van Riemsdijk W. H. 2002. Metal immobilization in soils using synthetic zeolites. *Journal of Environmental Quality*, 31: 813–821
- Overview of progress in management of soil contamination in WCE and some SEE countries (Maps and Graphs). 2012. European Environment Agency (EEA).

- <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/overview-of-progress-in-management-of-soil-contamination-in-wce-and-some-see-countries/> (november 2012)
- Owojori O. J., Reinecke A. J., Rozanov A. B. 2010. Influence of clay content on bioavailability of copper in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 73: 407-414
- Pankhurst C. E., Hawke B. G., McDonald H. J., Kirkby C. A., Buckerfield J. C., Michelsen P., O'Brien K. A., Gupta V. V. S. R., Doube B. M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. Australian Journal of Experimental Agriculture, 35: 1015–1028
- Papa S., Bartoli G., Pellegrino A., Fioretto A. 2009. Microbial activities and trace element contents in an urban soil. Environmental Monitoring and Assessment, 165, 1-4: 193-203
- Park J. H., Bolan N., Megharaj M., Naidu R. 2012. Relative Value of Phosphate Compounds in Reducing the Bioavailability and Toxicity of Lead in Contaminated Soils. Water Air and Soil Pollution, 223: 599-608
- Pati S. S., Sahu S. K. 2004. CO₂ evolution and enzyme activities (dehydrogenase, protease and amylase) of fly ash amended soil in the presence and absence of earthworms (*Drawida willsi* Michaelsen) under laboratory conditions. Geoderma, 118: 289-301
- Patinha C., Reis A. P., Dias C., Cachada A., Adão R., Martins H., Ferreira da Silva E., Sousa A. J. 2012. Lead bioavailability in soils from Portugal's center region with special reference to bioaccessibility. Environmental Geochemistry and Health, 34: 213-227
- Peijnenburg W. J. G. M., Zablotskaja M., Vijver, M. G. 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. Ecotoxicology and Environmental Safety, 67: 163-179
- Pelfrène A., Waterlot C., Mazzuca M., Nisse C., Bidar G., Douay F. 2010. Assessing Cd, Pb, Zn human bioaccessibility in smelter- contaminated agricultural topsoils (northern France). Environmental Geochemistry and Health, 33, 5: 477-493
- Pérez-de-Mora A., Burgos P., Madejón E., Cabrera, F., Jaeckel P., Schloter M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. Soil Biology and Biochemistry, 38: 327-341
- Pérez-de-Mora A., Ortega- Calvo J. J., Cabrera F., Madejón E. 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after »in situ« remediation of aheavy metal-contaminated soil. Applied Soil Ecology, 28: 125-137
- Pierzynski G. M., Sims J. T., Vance G. F. 2005. Soils and environmental quality. 3rd ed. Boca Raton, Taylor & Francis: 569 str.
- PIMS - Phosphate induced metal stabilization. UFA Ventures Inc. 2013.
http://www.ufaventures.com/ufa_ventures/tech_briefs/apatite.html (maj 2013)
- Pociecha M., Sircelj H., Leštan D. 2009. Remediation of Cu-contaminated soil using chelant and EAOP. Journal of Environmental Science and Health Part A, 44: 1136-1143
- Pravilnik o obratovalnem monitoring pri vnosu nevarnih snovi in rastlinskih hranil v tla.

1997. Ur. l. RS, št. 55/1997.
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199755&stevilka=2869> (januar 2013)
- Pravilnik o obremenjevanju tal z vnašanjem odpadkov. 2008. Ur. l. RS, št. 34/2008.
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200834&stevilka=1363> (november 2012)
- Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for protection of soil and amending Directive 2004/35/EC. 2006. Brussels, Commission of the European Communities: 30 str.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0232:FIN:EN:PDF> (10. marec 2010)
- Querol X., Alastuey A., Moreno N., Alvarez-Ayuso E., García- Sánchez A., Cama J., Ayora C., Simón M. 2006. Immobilization of heavy metals in polluted soils by the addition of zeolitic material synthesized from coal fly ash. *Chemosphere*, 62: 171-180
- Report from the Commission of the European Parliament, the Council, the European economic and social committee and the committee of the regions. The implementation of the Soil Thematic Strategy and ongoing activities. 2012. Brussels, European Commission: 15 str.
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2012:0046:FIN:EN:PDF> (september 2012)
- Resolucija o nacionalnem program varstva okolja 2005-2012. 2006. Ur. l. RS, št. 2/2006.
<http://www.uradni-list.si/1/content?id=67017> (december 2012)
- Roussel H., Waterlot C., Pelfreêne A., Pruvot C., Mazzuca M., Douay F. 2010. Cd, Pb and Zn oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by the atmospheric emissions of two lead and zinc smelters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 945–954
- Ruby M. V., Davis A., Link T. E., Schoof R., Chaney R. L., Freeman G. B., Bergstrom P. 1993. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology*, 27: 2870-2877
- Ruby M. V., Davis A., Nicholson A. 1994. *In situ* formation of lead phosphates in soils as a method to immobilize lead. *Environmental Science and Technology*, 28: 646-654
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Eberle S., Sellstone C. M. 1996. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science and Technology*, 30: 422-430
- Ryan J. A., Berti W. R., Brown S. L., Casteel S. W., Chaney R. L., Doolan M., Grevatt P., Hallfrisch J., Maddaloni M., Moseby D., Scheckel K. 2004. Reducing children's risk to soil lead: Summary of a field experiment. *Environmental Science and Technology*, 38: 19a–24a
- Salmon S. 2001. Earthworm excreta (mucus and urine) affect the distribution of springtails in forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 34: 304-310
- Sauvé S., Hendershot W., Allen H. 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter.

- Environmental Science and Technology, 34, 7: 1125-1131
- Schreck E., Foucault Y., Geret F., Pradere P., Dumat C. 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. Chemosphere, 85: 1555-1562
- Shi W., Shao H., Li H., Shao M., Du S. 2009. Progress in the remediation of hazardous heavy metal- polluted soils by natural zeolite. Journal of Hazardous Materials, 170: 1-6
- Sizmur T., Hodson M. E. 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? A review. Environmental Pollution, 157: 1981-1989
- Sizmur T., Palumbo-Roe B., Hodson M. E. 2011c. Impact of earthworms on trace element solubility in contaminated mine soils amended with green waste compost. Environmental Pollution, 159: 1852-1860
- Sizmur T., Palumbo-Roe B., Watts M. J., Hodson M. E. 2011a. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. Environmental Pollution, 159: 742-748
- Sizmur T., Tilston E. L., Charnock J., Palumbo-Roe B., Watts M. J., Hodson M. E. 2011d. Impacts of epigeic, anecic and endogeic earthworms on metal and metalloid mobility and availability. Journal of Environmental Monitoring, 13: 266-273
- Sizmur T., Wingate J., Hutchings T., Hodson M. E. 2011b. *Lumbricus terrestris* L. does not impact on the remediation efficiency of compost and biochar amendments. Pedobiologia 54S: S211-S216
- Soil. 2012. European Commission, Environment, Soil.
http://ec.europa.eu/environment/soil/index_en.htm (december 2012)
- Soil quality for environmental health. 2011. Soil quality for environmental health, Indicators, Enzymes. http://soilquality.org/indicators/soil_enzymes.html (januar 2012)
- Soils Policy: Soil Contamination in Europe. 2009. United States Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response (OSWER).
http://www.epa.gov/oswer/international/factsheets/200906_eu_soils_contamination.htm (december 2012)
- Solubility Product Constant. KTF- SPLIT EniG. 2003.
<http://www.ktf-split.hr/periodni/en/abc/kpt.html> (maj 2013)
- Srinivasan M., Ferraris C., White T. Cadmium and Lead Ion Capture with Three Dimensionally Ordered Macroporous Hydroxyapatite. Environmental Science and Technology, 40: 7045-7059
- Tabatabai M. A., Bremner J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology & Biochemistry, 1: 301-307
- Thalmann A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Landwirtschaftliche Forschung, 21: 249-259
- The State of Soil in Europe, Reference reports. 2012. European Commission, Joint Research Center (JRC).

- http://ec.europa.eu/dgs/jrc/downloads/jrc_reference_report_2012_02_soil.pdf
(december 2012)
- Tica D., Udovič M., Leštan D. 2011. Immobilization of potentially toxic metals using different soil amendments. *Chemosphere*, 85: 577-583
- Tica D., Udovič M., Leštan D. 2013. Long-term efficiency of soil stabilization with apatite and Slovakite: The impact of two earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Dendrobaena veneta*) on lead bioaccessibility and soil functioning. *Chemosphere*, 91: 1-6
- UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices. 2012. BARGE (the Bioaccessibility Research Group of Europe)
http://www.bgs.ac.uk/barge/docs/BARGE_UBM_DEC_2010.pdf (marec 2012)
- Udovič M., Drobne D., Leštan D. 2009. Bioaccumulation in *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) as a measure of the EDTA remediation efficiency of metal-polluted soil. *Environmental Pollution*, 157: 2822–2829
- 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. 2010. Fractionation and bioavailability of Cu in soil remediated by EDTA leaching and processed by earthworms (*Lumbricus terrestris* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 17: 561-570
- Udovič M., Plavc Z., Leštan D. 2007. The effects of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere*, 70: 126-134
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. 1996. Ur. 1. RS, št. 68/1996.
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199668&stevilka=3722> (februar 2010)
- Usman A. R. A., Kuzyakov Y., Lorenz K., Stahr K. 2006. Remediation of a soil contaminated with heavy metals by immobilizing compounds. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 205-212
- Usman A., Kuzyakov Y., Stahr K. 2005. Effect of clay minerals on immobilization of heavy metals and microbial activity in a sewage sludge-contaminated soil. *Journal of Soils and Sediments*, 5 4: 245-252
- Wang A. S., Angle J. S., Chaney R. L., Delorme T. A., McIntosh M. 2006. Changes in soil biological activities under reduced soil pH during *Thlaspi caerulescens* phytoextraction. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 1451-1461
- Wang Y. P., Shi J. Y., Lin Q., Chen X., Chen Y. X. 2007. Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganisms along a Cu/Zn contamination gradient. *Journal of Environmental Science*, 19: 848–853
- Wazne M., Jagupilla Santhi C., Moon D. H., Jagupilla Sarath C., Christodoulatos C., Kim M. G. 2007a. Assessment of calcium polysulfide for the remediation of hexavalent

- chromium in chromite ore processing residue (COPR). *Journal of Hazardous Materials*, 143: 620-628
- Wazne M., Moon D. H., Jagupilla Santhi C., Jagupilla Sarath C., Christodoulatos C., Dermatas D., Chrysochoou M. 2007b. Remediation of chromite ore processing residue using ferrous sulfate and calcium polysulfide: *Geoscience Journal*, 11, 2: 105-110
- Wen B., Liu Y., Hu X. Y., Shan X. Q. 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere*, 63: 1179–1186
- Wen, B., Hu, X., Liu, Y., Wang, W., Feng, M., Shan, X., 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils* 40, 181–187
- Wong J. W. C., Li K., Fang M., Su D. C. 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environment International*, 27, 5: 373-380
- Wragg J., Cave m., Basta N., Brandon E., Casteel S., Denys S., Gron C., Oomen A., Reimer K., Tack K., van de Wiele T. 2011. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Science of the Total Environment*, 409: 4016-4030
- Xenidis A., Stouraiti C., Papassiopi N. 2010. Stabilization of Pb and As in soils by applying combined treatment with phosphates and ferrious iron. *Journal of Hazardous Materials*, 177: 929-937
- Yamada H., Tamura K., Watanabe Y., Ivy N., Morimoto K. 2011. Geomaterials: their application to environmental remediation. *Science and Technology of Advanced Materials*, 12: 064705: 13 str.
- Yip T. C. M., Tsang D. C. W., Lo I. M. C. 2010. Interactions of chelating agents with Pb-goethite at the solid–liquid interface: Pb extraction and re-adsorption. *Chemosphere*, 81: 415-421
- Yu X., Cheng J., Wong M. H. 2005. Earthworm–mycorrhiza interaction on Cd uptake and growth of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 195-201
- Zakon o varstvu okolja. 2006. Ur. l. RS, št. 39/2006
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=200639&stevilka=1682> (septembar 2012)
- Zhang F. P., Li C. F., Tong L. G., Yue L. X., Li P. 2010. Response of microbial characteristics to heavymetal pollution of mining soils in central Tibet, China. *Applied Soil Ecology*, 45: 144-151
- Zia M. H., Codling E. E., Scheckel K. G., Chaney R. L. 2011. *In vitro* and *in vivo* approaches for the measurement of oral bioavailability of lead (Pb) in contaminated soil: A review. *Environmental Pollution*, 159: 2321-2327
- Zimakowska-Gnoinska D., Bech J. 2000. Estimation of the soil respirometry using the constant pressure volumetric respirometer and the flow-through respirometer UNI-RES10. *Environmental Monitoring and Assessment*, 64: 583–590
- Zorn M. I., Van Gestel C. A. M., Ejsackers H. 2005. The effect of *Lumbricus rubellus* and

- Lumbricus terrestris* on zinc distribution and availability in artificial soil columns.
Biology and Fertility of Soils, 41: 212-215
- Zupan M., Grčman H., Lobnik F. 2008. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije. Ljubljana,
Agencija RS za okolje: 63 str.
- Zupančič M., Lavrič S., Bukovec P. 2012. Metal immobilization and phosphorus leaching
after stabilization of pyrite ash contaminated soil by phosphate amendments. Journal of
Environmental Monitoring, 14: 704-710

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Domnu Leštanu, za vso pomoč, strokovne nasvete, predloge in pripombe ter omogočanje izvajanja laboratorijskega dela.

Za kritično branje moje doktorske disertacije, svetovanje in pripombe se zahvaljujem tudi ostalim članom komisije - somentorju prof. dr. Marjan Vebru, predsednici komisije prof. dr. Damjani Drobne ter prof. dr. Francu Lobniku, ki je tudi "odgovoren", da sem se na področju varstva okolja odločila ravno za varstvo tal. Dr. Metki Udovič hvala za strokovno pomoč, saj sta krona tega objavljena članka in za mene zelo pomembna življenska izkušnja.

Za financiranje doktorskega študija se posebej zahvaljujem Javnemu skladu Republike Slovenije za razvoj kadrov in štipendije.

Gospe Rozaliji Špes se zahvaljujem za lektoriranje doktorske disertacije.

Zahvaljujem se sodelavkam in sodelavcem na oddelku CPVO za vso njihovo prijaznost in pomoč. Posebej se zahvaljujem prijateljem in prijateljicam naše raziskovalne skupinice - Urška, Maja, Neža, David, Grega, hvala za konstruktivne debate, razumevanje, pomoč, smeh, s katerim je vedno bilo lažje delati; posebej se zahvaljujem Urški za strokovno pomoč med pisanjem doktorata, ter pomoč pri lektoriranju dela.

Hvala vsem prijateljem, ker so vedno tukaj zame.

Nenazadnje se zahvaljujem tudi svoji družini - mama in sestri, hvala ker mi ves čas stojite ob strani, ker verjamete vame in me brezpogojno podpirate; Gojko hvala Ti za ljubezen in zaupanje, hvala ker znaš poslušati, me pomiriti in vedno najti pravo besedo zame - pot do doktorata ni bila lahka, toda uspela sva. Mila, hvala za barve in note, ki si jih prinesla v moje življenje, s teboj je vse dobilo globlji smisel.

Od srca, hvala vsem!