

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Živa PLAVC

**FRAKCIONACIJA IN BIODOSEGLJIVOST SVINCA  
IN CINKA V GLISTINAH DEŽEVNIKOV PRED IN PO  
REMEDIJACIJI TAL**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Živa PLAVC

**FRAKCIONACIJA IN BIODOSEGLJIVOST SVINCA IN CINKA V  
GLISTINAH DEŽEVNIKOV PRED IN PO REMEDIACIJI TAL**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**FRACTIONATION AND BIOAVAILABILITY OF LEAD AND ZINC  
IN CASTS OF EARTHWORMS BEFORE AND AFTER SOIL  
REMEDICATION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

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

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je dne 6. junija 2006 za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Domna Leštana.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: doc. dr. Stanislav TRDAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Živa Plavc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 631.453:546.815:546.47:502.13(043.2)
KG	frakcionacija/biodosegljivost/svinec/cink/remediacija tal/deževniki
KK	AGRIS P01/T01
AV	PLAVC, Živa
SA	LEŠTAN, Domen (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2007
IN	FRAKCIONACIJA IN BIDOSEGLJIVOST SVINCA IN CINKA V GLISTINAH DEŽEVNIKOV PRED IN PO REMEDIACIJI TAL
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 30, [8] str., 9 sl., 7 pril., 40 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Proučevali smo vpliv dveh ekološko različnih vrst deževnikov, endogeične vrste <i>Octolasion tyrtaeum</i> ter epigeičnih vrst <i>Eisenia fetida</i> in <i>Lumbricus rubellus</i>, na frakcionacijo (sekvenčna ekstrakcija), mobilnost (TCLP-test) in oralno biodosegljivost (PBET-test) Pb in Zn v visoko in srednje onesnaženih mežiških tleh pred in po izpiranju tal z ligandom etilendiamin tetraacetatom (EDTA). Pri večstopenjskem izpiranju (remediaciji) visoko onesnaženih tal (<math>20 \times 2,5 \text{ mmol kg}^{-1}</math> EDTA) smo odstranili 58,4 % Pb in 16,6 % Zn. Pri tem se je frakcionacija v tleh preostalega Pb in Zn prerazporedila v manj dosegljive oblike. Mobilnost Pb in Zn pa se je zmanjšala za 83,7 % in 80,3 %. Pri remediaciji srednje onesnaženih tal (s skupno <math>12,5 \text{ mmol kg}^{-1}</math> EDTA) smo odstranili 39,8 % Pb in 6,1 % Zn. Pri tem se je Pb iz vseh talnih frakcij enakomerno odstranil. Zn je bil v tleh prisoten predvsem v kemijsko nedostopni frakciji, vezan v strukturo talnih mineralov, kar pojasnjuje njegovo majhno odstranitev iz tal. Po remediaciji srednje onesnaženih tal in izpostavitvi tal deževnikom vrste <i>L. rubellus</i> in <i>E. fetida</i> ni prišlo do statistično pomembnih razlik v frakcionaciji Pb in Zn. Oralna biodosegljivost Pb v iztrebkih vrste <i>E. fetida</i> je bila statistično značilno višja v primerjavi s tlemi – koncentracija biodosegljivega Pb se je v želodčni fazi povečala za 5,1-krat. Po remediaciji visoko onesnaženih tal se je biodosegljivost Pb v črevesni fazi v iztrebkih vrste <i>E. fetida</i> povečala za 2,4-krat in v iztrebkih vrste <i>O. trytaeum</i> za 2,8-krat. Mobilnost Pb je bila v iztrebkih vrste <i>E. fetida</i> 6,2-krat višja glede na remediirana tla. Naši rezultati kažejo, da je vpliv deževnikov, kot modela živih talnih dejavnikov, na potencialno toksičnost ostankov težkih kovin po remediaciji tal treba upoštevati pri oceni tveganja.</p>

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 631.453:546.815:546.47:502.13(043.2)  
CX fractionation/bioavailability/lead/zinc/soil remediation/earthworms  
CC AGRIS P01/T01  
AU PLAVC, Živa  
AA LEŠTAN, Domen (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2007  
TI FRACTIONATION AND BIOAVAILABILITY OF LEAD IN ZINC IN CASTS OF EARTHWORMS BEFORE AND AFTER SOIL REMEDIATION  
DT Graduation Thesis (University Studies)  
NO X, 30, [8] p., 9 fig., 7 ann., 40 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The effect of two ecologically contrasting earthworm species endogeic (*Octolasion tyrtaeum*) and epigeic (*Eisenia fetida* and *Lumbricus rubellus*) on the fractionation (using sequential extractions), mobility (Toxicity Characteristic Leaching Procedure, TCLP) and oral bioavailability (Physiologically Based Extraction Test, PBET) of Pb and Zn was studied in highly and medium contaminated soil from Mežica vally before and after soil remediation with a multi-step soil leaching method. 20-step leaching of highly contaminated soil with 2.5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA used in each step removed 58.4% and 16.6% of initial soil Pb and Zn, respectively, shifted the fractionation of residual heavy metals toward less labile forms and decreased their mobility by 83.7% for Pb and 80.3% for Zn. 4-leaching steps of medium contaminated soil with a total of 12.5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA removed 39.8% and 6.1% of Pb and Zn, respectively. EDTA removed Pb from all soil fractionation fairly uniformly. Zn was mostly present in the chemically inert residual soil fraction, which explains its poor removal. After remediation of medium contaminated soil and the exposure of soils to earthworms (*L. rubellus*, *E. fetida*), the fractionation of Pb and Zn did not significantly change. The oral bioavailability of Pb in *E. fetida* casts was significantly higher than in the bulk of the soil – the concentration of Pb available in the simulated phase was increased by 5.1 times. In highly contaminated soil both earthworm species increased the oral bioavailability of Pb in the simulated intestinal phase by a factor of 2.4 (*E. fetida*) and 2.8 (*O. tyrtaeum*). The concentration of Pb in TCLP leachate from *E. fetida* casts produced in highly contaminated soil was 6.2-times higher than in the bulk of the remediated soil. Our results indicated that the effect of earthworms as a model of soil biotic factors on potential toxicity of metal residuals in a remediated soil requires consideration.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VII
Kazalo prilog	VIII
Okrajšave in simboli	IX
Slovarček	X
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE DE LA</b>	<b>7</b>
3.1 ANALIZA TAL	7
3.2 REMEDIACIJA TAL	7
3.3 LONČNI POIZKUS	8
3.4 TCLP	10
3.5 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA TEŽKIH KOVIN	10
3.6 ORALNA BIODOSEGLJIVOST SVINCA (Pb)	11
3.7 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN	12
3.8 STATISTIČNA ANALIZA	12
<b>4 REZULTATI</b>	<b>13</b>
4.1 REMEDIACIJA TAL	13
4.2 pH DEŽEVNIKOVH IZTREBKOV	15
4.3 VSEBNOST Pb IN Zn V DEŽEVNIKOVH IZTREBKIH	15
4.4 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA ANALIZA	15
4.5 TCLP	17
4.6 ORALNA BIODOSEGLJIVOST Pb	17
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>19</b>
5.1 RAZPRAVA	19
<b>5.1.1 Remediacija tal</b>	<b>19</b>
<b>5.1.2 Vpliv deževnikov na pH tal</b>	<b>20</b>
<b>5.1.3 Vsebnost težkih kovin v deževnikovih iztrebkih</b>	<b>21</b>
<b>5.1.4 Vpliv deževnikov na frakcionacijo Pb in Zn</b>	<b>22</b>
<b>5.1.5 Vpliv deževnikov na mobilnost in izpiranje Pb in Zn</b>	<b>22</b>
<b>5.1.6 Vpliv deževnikov na oralno biodosegljivost Pb</b>	<b>23</b>
5.2 SKLEPI	24
<b>6 POVZETEK</b>	<b>25</b>

<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>27</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGA</b>	



## KAZALO SLIK

- Slika 1: Tok EDTA pri metodi večstopenjskega izpiranja tal skozi sistem za obdelavo procesnih voda (zaprta procesna zanka) (Udovič in Leštan, 2006).
- Slika 2: Iztrebki deževnikov vrste *Eisenia fetida* (A) in *Octolasion tyrtaeum* (B) (foto: Ž. Plavc, 2006).
- Slika 3: Iztrebki deževnika vrste *Lumbricus rubellus* (foto: Ž. Plavc, 2006).
- Slika 4: Shema fiziološko osnovanega testa biodosegljivosti (PBET) (Ruby in sod., 1996).
- Slika 5: Koncentracija Pb v izpiralni raztopini vode (pred vstopom v sistem za obdelavo procesnih voda) med 20-stopenjskim izpiranjem tal z 2,5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA-jem.
- Slika 6: Koncentracija Zn v izpiralni raztopini vode (pred vstopom v sistem za obdelavo procesnih voda) med 20-stopenjskim izpiranjem tal z 2,5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA-jem.
- Slika 7: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni fazi, določena *in vitro* s PBET-testom, v visoko onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter iztrebkih deževnikov vrste *E. fetida* in *O. tyrtaeum*. Podana so povprečja treh vrednosti s standardnim odklonom. (a, b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).
- Slika 8: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni fazi, določena *in vitro* s PBET-testom, v srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter iztrebkih deževnikov vrste *L. rubellus* in *E. fetida*. Podana so povprečja treh vrednosti s standardnim odklonom. (a, b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).
- Slika 9: Ekstrakcija bakra (Cu), cinka (Zn), kadmija (Cd) in svinca (Pb) iz naravno onesnaženih tal s pomočjo ligandov (● EDTA, ■ NTA, ▲ EDSS in ◇ DTPA) kot funkcija razmerja med kelati in celotno vsebnostjo težkih kovin (Nowack in sod., 2006).

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Izbrane lastnosti tal in celokupne koncentracije Pb in Zn v srednje onesnaženih tleh pred remediacijo in po njej. Rezultati remediiranih tal so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.
- PRILOGA B: Izbrane lastnosti visoko onesnaženih tal pred remediacijo in po njej. Rezultati remediiranih in neremediiranih tal so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.
- PRILOGA C: Celokupna vsebnost Pb in Zn, pH vrednosti in koncentracija Pb in Zn v ekstrakcijski raztopini TCLP pred in po remediaciji visoko onesnaženih začetnih tal ter v iztrebkih deževnikov vrste *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v neremediiranih in remediiranih tleh.
- PRILOGA D: Frakcionacija Pb pred in po remediaciji srednje onesnaženih tal in v iztrebkih deževnikov vrste *L. rubellus* in *E. fetida*. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.
- PRILOGA E: Frakcionacija Zn pred in po remediaciji srednje onesnaženih tal in v iztrebkih deževnikov vrste *L. rubellus* in *E. fetida*. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.
- PRILOGA F: Frakcionacija Pb v visoko onesnaženih tleh pred remediacijo in po njej ter v iztrebkih deževnikov vrste *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v teh tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.
- PRILOGA G: Frakcionacija Zn v visoko onesnaženih tleh pred remediacijo in po njej ter v iztrebkih deževnikov vrste *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v teh tleh. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

NTA	NitriloTriAcetatna kislina
PDA	Piridin-2,6-Dikarboksilna kislina
EDDS	[S,S] EtilenDiamin DiSukcinat
EDTA	EtilenDietilTertaAcetat
DTPA	DietilenTriaminPentAcetat
Pb	svinec
Zn	cink
Cu	baker
Cd	kadmij
Si	silicij
Al	aluminij
Fe	železo
Mn	mangan
UV	okrajšava za ultravijolične žarke z valovno dolžino od 400 nm do približno 10 nm

## SLOVARČEK

Absorbent	absorpcijsko sredstvo
Absorbicija	raztapljanje plina v tekočini ali vezava plina na trden nosilec pri katerem pride do enakomerne porazdelitve absorbiranega sredstva v absorbentu
Acetat	etanoat ali sol očetne kisline
Adsorbicija	vezava plina, kapljavine ali topljenca na površino trdne snovi
<i>aqua regia</i>	latinski izraz za mešanico dušikove kisline (HNO <sub>3</sub> ) in klorovodikove kisline (HCl) v razmerju 1 : 3.
Biodostopnost	delež Pb, ki je zaužit in se absorbira v človekovem krvnem obtoku skozi črevesni epitel
Biorazpoložljivost	delež celotnega zaužitega Pb, ki se je raztopil v človeškem želodcu
Desorbicija	sproščanje absorbirane snovi
Frakcija	posamezen način vezave težkih kovin na trdne delce
Frakcionacija	postopek, ki določa obliko kemijske vezave težkih kovin na talne delce
<i>in vitro</i>	latinski izraz za delo v laboratoriju
Koprofagija	uživanje lastnih izločkov
Poljska kapaciteta tal	celotna količina vode, ki jo tla lahko zadržijo in ki ne steče skozi tla; optimalna vlažnost za večino mikroorganizmov v tleh je med 50 in 80 odstotki poljske kapacitete tal za vodo

## 1 UVOD

Zaradi vse večje uporabe kemičnih sredstev v industriji, kmetijstvu in v vsakdanjem življenju, se v tleh kopiči vse več kemikalij. Kemikalije prehajajo v tla iz zraka, z odlaganjem odpadkov in uporabo fitofarmaceutskih sredstev ter z nenadnimi izlivi in izpusti kemikalij, ki so posledica nesreč. Onesnažila, s katerimi onesnažujemo tla, so različna: sintetična organska onesnažila, težke kovine, radionuklidi in anorganske snovi. Škodljivost onesnažil v tleh je odvisna od njihove toksičnosti in biodosegljivosti. Toksičnost in biodosegljivost onesnažil je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti onesnažil ter od lastnosti tal. Lastnosti tal (pH, redoks potencial, CEC-kationska izmenjalna kapaciteta tal, vsebnost organske snovi v tleh) vplivajo na mobilizacijo in biodosegljivost onesnažil. Kemizacija tal je globalni problem 20. in 21. stoletja, saj je zaradi uporabe kemikalij degradiranih kar 2,39 milijonov km<sup>2</sup>, kar predstavlja približno 2 % kopnega na Zemlji (Oldman, 1994, cit. po Leštan, 2002). Kemizacija tal je nepovrnljiv degradacijski proces, saj je tlom težko povrniti popolno kakovost in funkcionalno sposobnost. Taka tla so mrtva in lahko tudi nevarna za okolje in za zdravje ljudi. Zato je potrebno, da tla remediiramo in jim tako povrnemo vsaj del njihove prvotne funkcionalne sposobnosti. Remediacija tal je metoda, ki pomeni izboljšavo lastnosti degradiranih tal, predvsem tal, ki so onesnažena. Remediacija tal vključuje tudi metode očiščevanja tal. Ena najbolj obetavnih metod je izpiranje tal s pomočjo kelatnih ligandov, kot je npr. etilendiamin tetraacetne kisline (EDTA). Z njo običajno odstranimo le biodosegljive kovine, bionedosegljive kovine pa le deloma. V tleh neprestano potekajo biogeokemični procesi, na katere vplivajo neživi in živi talni dejavniki. Neživi talni dejavniki so založenost tal s hranili, temperatura, dosegljiva voda, kisik, pH ter redoks potencial. Žive dejavnike pa predstavljajo talni organizmi, ki s svojim delovanjem (presnavljanjem in porabljanjem sestavin pedosfere in litosfere) spreminjajo sestavo in lastnosti tal. Z remediacijo, z izpiranjem tal, odstranimo le biodosegljivi del kovin iz tal. S tem porušimo kemijsko ravnotežje, ki je bilo pred remediacijo vzpostavljeno med biodosegljivimi in bionedosegljivimi kovinami. Tla so dinamičen sistem, ki teži k ponovni vzpostavitvi ravnotežja. Po remediaciji lahko zato pod vplivom živih in neživih dejavnikov del preostalih bionedosegljivih težkih kovin preide v biodosegljivo obliko. S tem se lahko poveča toksičnost preostalih kovin.

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, ali deževniki kot živi dejavnik med presnavljanjem tal, pri čemer spreminjajo kemijsko-fizikalne lastnosti tal, spremenijo tudi frakcionacijo, mobilnost in biodosegljivost svinca (Pb) in cinka (Zn), ki v tleh ostaneta po remediaciji z izpiranjem tal.

Za proučevanje vpliva deževnikov smo uporabili dve ekološko različni vrsti deževnikov, endogeične in epigeične. Endogeični deževniki živijo na globini 50 cm in se prehranjujejo z organsko snovjo, humusom. Za predstavnika te vrste smo vzeli mlečnega deževnika (*Octolasion tyraeum* Örley). Epigeični deževniki pa živijo na površju tal, v stelji, in se z njo prehranjujejo. Za predstavnika te vrste smo vzeli rdečega deževnika (*Lumbricus*

*rubellus* Hoffmeister) in smrdečega (smrdljivega) deževnika (*Eisenia fetida* Savigny) (Mršič, 1997).

Za določitev vpliva deževnikov na frakcionacijo, mobilnost in oralno biodosegljivost Pb in Zn smo analizirali njihove iztrebke, proizvedene v visoko in srednje onesnaženih tleh pred in po remediaciji tal z izpiranjem z EDTA-jem. Frakcionacijo Pb in Zn smo določili s šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo, mobilnost pa smo določili s TCLP-testom. Oralno biodosegljivost Pb smo določili z Rubyjevim testom.

Predvidevamo, da deževniki, kot model živih talnih dejavnikov, vplivajo na frakcionacijo, mobilnost in oralno biodosegljivost kovin, preostalih v tleh po remediaciji z izpiranjem tal z EDTA-jem.

## 2 PREGLED OBJAV

Med anorganskimi onesnažili v tleh največkrat zasledimo težke kovine kot so svinec, cink, baker, nikelj, kadmij, živo srebro in krom, ki so v tleh prisotne naravno in kot posledica človekove dejavnosti. Naravna vsebnost kovin v tleh je odvisna od matične podlage in je večja v kamninah vulkanskega kot sedimentnega izvora (Leštan, 2002). Človek pa vpliva na vsebnost težkih kovin v tleh z rudarjenjem in taljenjem rud, industrijo, atmosferskimi depoziti, kmetijstvom in odlaganjem odpadkov (Ross, 1994, cit. po Leštan, 2002).

Mežiška dolina je bila več kot 300 let izpostavljena rudarjenju in taljenju Pb-rude, vse do leta 1990. Posledično so tla v dolini, vključno z več kot 6600 ha kmetijskih zemljišč, onesnažena s Pb ter tudi s Zn (Finžgar in Leštan, 2007).

Močno onesnažena tla so lahko nevarna za okolje in ljudi in jih je treba remedirati (očistiti). Remediacija tal je odvisna od zakonodaje, ki predpisuje dovoljene vrednosti onesnažil za tla določene rabe, ter od izbire metode, ki je odvisna od zahtevane stopnje očiščenja tal (Leštan, 2002). Pri remediaciji onesnaženih tal uporabljamo kemijske, fizikalne in biološke metode. Glede na način odstranitve težkih kovin iz tal razlikujemo:

- uničenje ali kemijsko spremembo onesnažil v neškodljivo obliko,
- ekstrakcijo ali odstranitev onesnažil iz okolja,
- imobilizacijo onesnažil.

Remediacijske metode vključujejo (Finžgar in Leštan, 2006b):

- izkop in odvoz onesnaženih tal,
- imobilizacijo onesnažil in dovajanje snovi kot so cement, apno in različni fosfati,
- elektrokinetično mobilizacijo in obarjanje težkih kovin iz tal z elektrodami,
- fitoekstrakcija 'rastlinska ekstrakcija' težkih kovin iz tal; rastline v svojih organih (koreninah in listih) kopičijo težke kovine,
- izpiranje tal temelji na ločevanju težkih kovin iz trdnega dela tal s solubilizacijo (raztopitev kovin v topilu, v katerem v naravnih razmerah niso topna) v izpiralni raztopini.

Trenutno je ena najbolj obetavnih remediacijskih metod izpiranje tal s pomočjo kelatnih ligandov. Ligandi lahko kovine iz trdne faze tal desorbirajo tako, da z njimi tvorijo vodotopni kompleks (kelat), ki ga lahko iz tal odstranimo z izpiranjem (Udovič in Leštan, 2006). Kelatni ligandi so dvo- ali večvezne koordinacijske spojine, pri katerih so na centralni atom ali ion vezani ligandi, tj. negativno nabiti ioni. Te spojine so razmeroma stabilne in v raztopini ne disociirajo (Lazarini in Brenčič, 2004). Preizkušeni so bili številni ligandi (NTA, PDA, EDDS), za odstranjevanje kovin iz tal, onesnaženih s Pb, Zn, Cu in Cd, pa je najbolj učinkovit EDTA (Finžgar in Leštan, 2007).

Vse pogosteje se za določanje uspeha remediacije namesto celotne koncentracije težkih kovin uporablja mobilnost in biodosegljivost težkih kovin v tleh. Grožnjo okolju in zdravju predstavljajo ravno mobilizirane in biorazpoložljive težke kovine.

Težke kovine so v tleh prisotne v različnih kemijskih oblikah in vezane na različne talne frakcije. Frakcionacija kovin v tleh je odvisna od kemijskih lastnosti težke kovine in od naslednjih vrst reakcij v tleh (Leštan in sod., 2003):

- Adsorbpcije in desorbpcije, ki vplivata na nastanek vezi in kelatnih kompleksov ter na ionsko izmenjavo. Težke kovine v tleh tvorijo delno kovalentne vezi z netopno organsko snovjo ter s hidroksidnimi oksidi. Težke kovine tvorijo v tleh kelatne komplekse in koordinacijske vezi s topno organsko snovjo in polikarboksilnimi organskimi kislinami mikrobnega izvora. V onesnaženih tleh poteka izmenjava težkih kovin s kationi iz negativno nabite površine talnih koloidov. Adsorbpcija in desorbpcija sta večinoma odvisni od pH talne raztopine.
- Obarjanja (precipitacija) težkih kovin iz talne raztopine v fosfatni, karbonatni, sulfatni ali hidroksidni obliki. Na obarjanje vpliva pH talne raztopine; v kislih tleh je manjše.
- Prodiranja (penetracije) težkih kovin v kristalno strukturo alumosilikatnih glinenih mineralov, kjer pride do izomorfične izmenjave (tj. izmenjave s snovjo z enako kemijsko obliko) s silicijem (Si) in aluminijem (Al).
- Biološke mobilizacije in imobilizacije težkih kovin.

Te reakcije vplivajo na prehajanje težkih kovin med frakcijami in so odvisne od številnih lastnosti tal, kot so (Leštan in sod., 2003):

- tekstura tal,
- vsebnost organske snovi,
- vsebnost in tip glinenih mineralov ter aluminijevih (Al), železovih (Fe) in manganovih (Mn) oksidov,
- prevladujoči fizikalno-kemijski pogoji v tleh (prezračevanje, pH, redoks potencial),
- mineralogija (oblika izvora ter kemijske in fizikalne lastnosti) težkih kovin.

Od tega je odvisna biološka dosegljivost in posledično vstop težkih kovin v prehranjevalno verigo, mobilnost ter toksičnost težkih kovin v tleh.

Nowack in sod. (2006) so zbrali podatke iz 28 publikacij za ekstrakcijo težkih kovin z ligandi, pri čemer so ugotovili, da noben ligand (EDTA, NTA, EDDS in DTPA) ne ekstrahira popolnoma težkih kovin (Pb, Zn, Cd in Cu), temveč le med 5 in 70 odstotki. Tako z remediacijo lahko le zmanjšamo delež kovin v tleh, ne moremo pa jih popolnoma odstraniti.

Pb in Zn v tleh tvorita močne vezi s trdnimi talnimi delci. Pb se večinoma veže na organsko snov in karbonate (Kabata-Pendias in Pendias, 1992; Li in Thornton, 2001), Zn pa je večinoma prisoten v ostanku talnih frakcij po ekstrakciji, tj. v kovinah, vključenih v kristalne rešetke alumosilikatnih glinenih mineralov (Rivero in sod., 2000; Kabala in Singh, 2001). Zaradi njunih močnih vezi s trdno fazo tal ju ne moremo v celoti odstraniti z izpiranjem tal, še posebno, če so obravnavana tla bogata z organsko snovjo in glino. Posledično ostane velik del Pb in Zn v tleh tudi po remediaciji le-teh (Pichetl in sod., 2001; Finžgar in Leštan, 2007). Ostanki težkih kovin se po remediaciji v tleh nahajajo v stabilni



mineralni obliki in so vezani na biološko nedosegljive talne frakcije. V taki obliki so tudi manj toksični za rastline in živali v tleh. Vprašanje pa je, ali z zmanjšanjem mobilnosti in biodosegljivosti težkih kovin v tleh z remediacijo dosežemo trajno ali le začasno odstranitev kovin iz biološko dostopne faze tal (Udovič in sod., 2007).

Na tla začnejo po remediaciji in vrnitvi v naravni ekosistem delovati neživi in živi talni dejavniki, ki lahko prerazporedijo ostanke težkih kovin po talnih frakcijah iz manj biodosegljivih oblik proti bolj biodosegljivim oblikam in s tem spremenijo njihov toksični status (Udovič in sod., 2007). Od talnih živih dejavnikov so deževniki najpomembnejši talni organizmi, ki vplivajo na lastnosti tal (Boyle in sod., 1997), saj z zauživanjem in izločanjem talnih delcev spreminjajo fizikalno-kemijske lastnosti tal (Edwards in Bohlen, 1996).

Dokazano je bilo, da deževniki z izločanjem talnih delcev spremenijo biodosegljivost hranil (iz bionedosegljivih v biodosegljive). Podobno lahko deževniki tudi povečajo biodosegljivost težkih kovin. Objavljeno je bilo, da so se težke kovine v talnih frakcijah izrazito prerazporedile po obravnavanju z deževniki. Njihova biodosegljivost se je povečala (Cheng in Wong, 2002; Ma in sod., 2002; Wen in sod., 2004).

V znanstveni literaturi ni nobenih raziskav in podatkov o vplivu deževnikov ali drugih živih dejavnikov na frakcionacijo ali biodosegljivost ostankov težkih kovin v tleh po remediaciji tal. Dokazano je bilo, da deževniki hitro prodrejo v remediirana tla (Spurgeon in Hopkin, 1999; Langdon in sod., 2001). Glede na letni »proizvod« deževnikovih iztrebkov, ki znaša med 5 in 250 ton ha<sup>-1</sup> (Bohlen, 2002), domnevamo, da bi deževniki lahko hitro vplivali na frakcionacijo, mobilnost in biodosegljivost težkih kovin v tleh.

Ekološko sta v Evropi, Severni Ameriki, Avstraliji in Aziji najbolj zastopani družini Megascolecidae in Lumbricidae (Edwards in Bohlen, 1996). Najbolj prevladujoči deževniki, ki poseljujejo kmetijska zemljišča, so deževniki vrste peregrina (beseda izhaja iz latinščine in pomeni popotnik; ti deževniki so zelo razširjeni po svetu) iz rodov: *Lumbricus*, *Aporrectodea*, *Allolobophora*, *Eisenia*, *Eiseniella*, *Dendrobaena*, *Dendrodrilus*, *Bimastos* in *Octolasion* (Lee, 1985). Deževniki peregrina imajo posebne karakteristike, ki vključujejo: potencial za dvospolnost, prisvojitvev poliploidnega dedovanja, odpornost na okoljsko raznolikost, značilnost življenjskega prostora, možnost v izbiri hrane, zmožnost zoperstavljanja kemičnim stresom in združitev z obdelanimi tlemi (Lee, 1985).

Ekološka delitev deževnikov temelji predvsem na razlikah med vrstami deževnikov ter na prehranjevalnih aktivnostih in aktivnostih kopanja rogov v tleh.

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

- Epigeični deževniki, ki živijo na površju tal pod steljo in se prehranjujejo z razgradljivo organsko snovjo. Med te vrste med drugimi uvrščamo *Lumbricus rubellus*, *Eisenia fetida* in *Dendrobaena octaedra*.

- Anecični deževniki, ki živijo v zgornjem delu talnega horizonta in se prehranjujejo z razgradljivo organsko snovjo na površju tal ter z mineralnim delom tal.
- Endogeični deževniki, ki živijo v mineralnem delu talnega horizonta in se prehranjujejo z mineralnim delom tal, zlasti z organsko bogatimi snovmi. Mednje uvrščamo vrsto *Octolasion tyrtaeum*.

### 3 MATERIALI IN METODE DE LA

#### 3.1 ANALIZA TAL

Pri proučevanju vpliva deževnikove aktivnosti na frakcionacijo Pb in Zn ter na oralno biodosegljivost Pb smo uporabili zgornjo plast (0–30 cm) visoko in srednje onesnaženih tal. Srednje onesnažena tla smo pridobili iz zapuščenega zelenjavnega vrta v okolici bivše industrijske cone v Mežiški dolini, visoko onesnažena tla pa smo pridobili iz oskrbovanega zelenjavnega vrta blizu zapuščenega svinčevega rudnika v Mežiški dolini.

pH tal in deževnikovih iztrebkov je bil izmerjen s standardno pedološko analizo v 1/2,5 (w/V) deleža tal in v 0,01 M vodotopne suspenzije kalcijevega diklorida ( $\text{CaCl}_2$ ). Talni vzorci so bili analizirani na: organsko snov v tleh po Walkley-Blackovi titraciji; kationsko izmenjalno kapaciteto z amonijevo acetat metodo; teksturo tal, določeno s pipetno metodo; lahko izmenljivi fosfor (P), določen z AL-metodo po Egner-Riehn-Domingu ter karbonate, določene volumetrično po reakciji tal s klorovodikovo kislino–solno kislino (HCl).

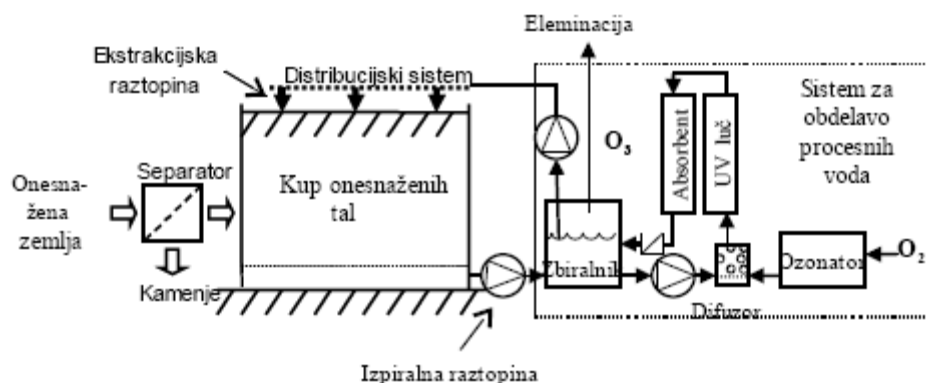
Izbrane vzorce smo uporabili za pedološko analizo neremediiranih tal v eni ponovitvi, medtem ko smo analizo remediiranih tal in deževnikovih iztrebkov naredili v treh ponovitvah (prilogi A in B).

#### 3.2 REMEDIACIJA TAL

Za remediacijo tako visoko kot tudi srednje onesnaženih tal smo uporabili metodo izpiranja tal z ligandi, kjer so bili ozon, UV-svetloba ter izpiralna raztopina uporabljeni za remediacijo tal v zaprti procesni zanki (Finžgar in Leštan, 2006b). Na zraku posušena tla (4,6 kg) smo presejali skozi 5 mm sito ter jih dali v tri kolone, dimenzij 15 cm v premeru in 24 cm v višini. Plastična mrežica premera 0,2 mm je na dnu vsake kolone zadrževala tla.

Izpiranje srednje onesnaženih tal je potekalo v štirih stopnjah, kjer smo tla v prvih treh stopnjah tretirali z  $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$  EDTA-jem ter v zadnji, četrti stopnji s  $5 \text{ mmol kg}^{-1}$  EDTA-jem, raztopljenega v 2,4 L vode. Za remediacijo visoko onesnaženih tal pa smo uporabili metodo dvajsetstopenjskega izpiranja tal, pri kateri smo tla v vsaki stopnji obravnavali z  $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$  EDTA-jem, raztopljenim v 2,4 L vode.

Na vsaki stopnji izpiranja, tako visoko onesnaženih kakor tudi srednje onesnaženih tal, je izpiralna raztopina (2,4 L) s pomočjo peristaltične črpalke s hitrostjo pretoka  $12 \text{ mL min}^{-1}$  48 ur počasi krožila skozi kolone in pri tem iz tal izpirala Pb in Zn. Izpiralna raztopina (2,4 L) je nato krožila v zaprti procesni zanki skozi kolone, da bi odstranila talne ostanke kompleksa težkih kovin – EDTA, ter skozi sistem za obdelavo procesnih voda, ki sestoji iz ozonatorja, UV-svetlobe in filtra, ki adsorbira težke kovine. Ozon in UV-sevanje proizvajata hidroksilne radikale za oksidativno razgradnjo EDTA-kompleksov v izpiralni raztopini. Sproščene težke kovine so bile odstranjene z absorpcijo v komercialne absorbente Slovakite (IPRES, Bratislava, Slovakia).



Slika 1: Tok EDTA pri metodi večstopenjskega izpiranja tal skozi sistem za obdelavo procesnih voda (zaprta procesna zanka) (Udovič in Leštan, 2006)

Ko je koncentracija Pb in Zn v izpiralni raztopini srednje onesnaženih tal padla pod 5 in 10 mg L<sup>-1</sup> ter ko se je začetni delež Pb in Zn v izpiralni raztopini visoko onesnaženih tal zmanjšal za 5 %, kar je bilo pričakovano, da se bo zgodilo po 18–24 urah izpiranja, smo pričeli z novo stopnjo izpiranja tal ter z novo izpiralno raztopino, ki je vsebovala 2,5 oz. 5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA-ja. Med poskusom smo z dovajanjem vode vzdrževali konstanten volumen izpiralne raztopine (2,4 L). V vsaki stopnji procesa smo dotočili približno 10 % volumna.

Po končanem izpiranju, tako visoko kakor tudi srednje onesnaženih tal, smo tla zračno posušili in homogenizirali pred nadaljnjo uporabo.

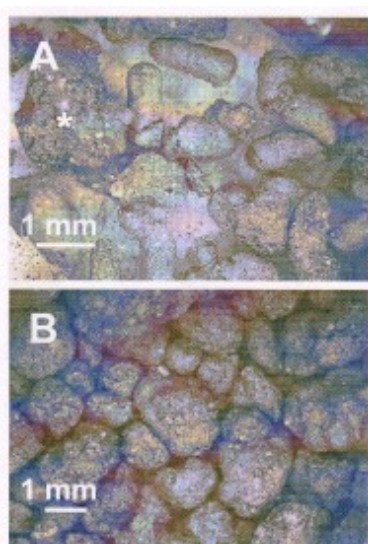
### 3.3 LONČNI POIZKUS

Za poizkus smo potrebovali plastične lončke višine 9 cm in premera 12,5 cm, ki smo jih napolnili z 250 g na zraku posušenih neremediiranih in remediiranih srednje in visoko onesnaženih tal. Poizkus smo izvedli v treh ponovitvah. Tla smo navlažili z destilirano vodo do približno 80-odstotne poljske kapacitete tal in pustili en teden pri 20 °C in 80-odstotni relativni zračni vlagi, da se tla stabilizirajo.

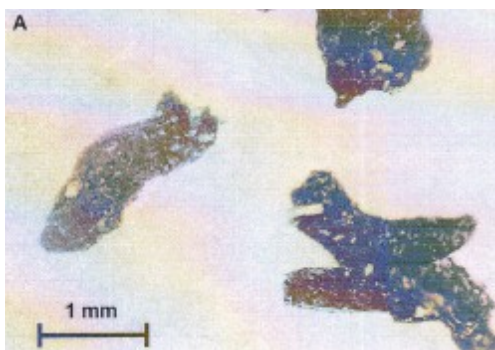
Epigeične deževnike vrste *Eisenia fetida* Savigny smo dobili iz podjetja Regenwurmfarme Tacke GmbH (Borken, Nemčija), deževnike vrste *Lumbricus rubellus* Hoffmeister pa smo dobili iz podjetja Biobrazde (Dragomer, Slovenija). Endogeične deževnike vrste *Octolasion tyrtaeum* Örley pa smo zbrali pretežno med prekopavanjem neonesnaženega oskrbovanega zelenjavnega vrta (Vižmarje, Ljubljana, Slovenija). Deževnike smo ohranjali pri življenju v temi pri konstantni temperaturi 20 °C in 80-odstotni relativni zračni vlagi. Za poizkus smo zbrali spolno dozorele vrste, ki imajo razvito sedlo in pubertetne izboklinice. Iz izbranih vrst smo v vodi odstranili delce tal, ki so bili prilepljeni na površje njihovega telesa. Očiščene in spolno dozorele osebkke smo dali stradati na navlažen papir v plastično petrijevko (5 živali na petrijevko) za 2 dni pri temperaturi 20 °C, z namenom, da se iz prebavnega trakta popolnoma odstrani predhodni substrat, v katerem so deževniki

bivali. Za preprečitev koprofagije smo papirnate brisače menjali vsaj enkrat dnevno. Po dveh dneh stradanja smo jih z vodo sprali, s papirnato brisačo osušili in stehali.

Povprečna teža vrst *E. fetida* in *L. rubellus* pred vnosom v srednje onesnažena tla je bila 0,63 g in 0,20 g. Povprečna teža vrst *E. fetida* in *O. tyrtaeum* pred vnosom v visoko onesnažena tla pa je bila 0,55 g in 0,74 g. Deset deževnikov vsake vrste smo vstavili v posamezne lončke (dve vrsti onesnaženih tal pred in po remediaciji v treh ponovitvah) in jih pustili v temi pri konstantni temperaturi 20 °C in 80-odstotni relativni zračni vlagi. Vrsto *E. fetida* smo pustili v visoko onesnaženih in srednje onesnaženih tleh 7 tednov, vrsto *O. tyrtaeum* smo pustili v visoko onesnaženih tleh 4 tedne, vrsto *L. rubellus* pa smo pustili v srednje onesnaženih tleh 7 tednov. V tleh smo jih pustili tako dolgo, dokler niso proizvedli dovolj iztrebkov za analize. Za vzdrževanje 80-odstotne poljske kapacitete tal smo tla v lončkih redno vlažili z destilirano vodo. Iztrebke smo previdno zbirali, tako tiste s površja kot tiste iz notranjosti, s pomočjo stereomikroskopa in jih nato zračno posušili pred nadaljnjimi analizami. Njihova struktura se je jasno razlikovala od preostalih tal (sliki 2 in 3).



Slika 2: Iztrebki deževnikov vrste *Eisenia fetida* (A) in vrste *Octolasion tyrtaeum* (B) (foto: Ž. Plavc, 2006)



Slika 3: Iztrebki deževnikov vrste *Lumbricus rubellus* (foto: Ž. Plavc, 2006)

### 3.4 TCLP

S TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) vrednotimo potencialno mobilnost onesnažil iz tal in iz drugih odpadkov v okolje (US EPA, 1995). S TCLP smo določili potencialno mobilnost Pb in Zn v visoko onesnaženih tleh pred remediacijo tal in po njej. Analizo smo izvajali v treh ponovitvah. 1 g tal smo ekstrahirali z 20 mL ekstrakcijske raztopine (v razmerju 1 : 20), ki je vsebovala 0,0992 M očetne kisline ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) in 0,0643 M natrijevega hidroksida ( $\text{NaOH}$ ), pri  $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$  za 18 h na stresalniku pri 300 obratih  $\text{min}^{-1}$ . Po ekstrakciji smo vzorce filtrirali (Whatman No. 4), filtrat pa zakisali s 65-odstotno dušikovo kislino ( $\text{HNO}_3$ ) do  $\text{pH} < 2$  in shranili v hladilnik pri  $5^\circ\text{C}$  za določitev težkih kovin.

### 3.5 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA EKSTRAKCIJA TEŽKIH KOVIN

Sekvenčna ekstrakcija je kemijski postopek izločanja težkih kovin iz tal z zaporednimi ekstrakcijami z uporabo različnih ekstrakcijskih raztopin. Z vsako od zaporednih ekstrakcij izločimo težke kovine, ki so vezane na točno določeno talno frakcijo (Baćac, 2005). V našem poizkusu je bila za določitev frakcionacije Pb in Zn v visoko in srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter visoko in srednje onesnaženih deževnikovih iztrebkih, v šestih frakcijah, uporabljena spremenjena Tessienova sekvenčna analiza (Leštan in sod., 2003).

Iz tal se najprej izločijo težke kovine v biološko dostopnih frakcijah (ioni kovin, raztopljeni v talni raztopini, in ioni kovin, izmenljivo adsorbirani na površini talnih koloidov) ter nato kovine v biološko nedostopnih frakcijah (kovine, izborjene kot karbonati, sulfati ali fosfati; kovine, koordinativno vezane na Fe- in Mn-okside; kovine, vezane na netopno organsko snov tal ter kovine, vključene v kristalne rešetke glinenih mineralov). Prvo frakcijo, ione težkih kovin, raztopljenih v talni raztopini, smo pridobili z ekstrakcijo 1 g zračno posušenih tal in deževnikovih iztrebkov, prelitih z 10 mL deionizirane vode za 1 h. Drugo frakcijo izmenljivih ionov kovin iz talnih koloidov v talno raztopino smo ekstrahirali iz ostankov talnega vzorca iz predhodne frakcije, ki smo ga prelili z 10 mL 1 M magnezijevega nitrata ( $\text{MgNO}_3$ ) za 2 h. Magnezijev nitrat povzroči izmenjavo elektrostatično vezanih ionov kovin na talne koloide. Tretjo frakcijo vezanih težkih kovin na karbonate smo ekstrahirali z 10 mL 1 M amonacetata ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) pri  $\text{pH } 5$  za 5 h. Amonacetat povzroči raztapljanje karbonatov (kalcit, dolomit) in oboritev (sprostitev) vezanih kovin. Četrto frakcijo koordinativno vezanih težkih kovin na Fe- in Mn-okside smo ekstrahirali z 20 mL 0,1 M hidroksilaminom hidrokloridom ( $\text{NH}_2\text{OH} \times \text{HCl}$ ) pri  $\text{pH } 2$  za 12 h. Hidroksilamin hidroklorid povzroči zmanjšanje Fe- in Mn-oxidov v topno obliko. Peto frakcijo vezav težkih kovin na netopno organsko snov smo pridobili po izpostavitvi tal vročini, v 3 mL 0,02 M dušikove (V) kisline ( $\text{HNO}_3$ ) in 5 mL 30-odstotnega peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) za 3 h pri  $85^\circ\text{C}$ , ki ji je sledila ekstrakcija s 15 mL 1 M amonacetata ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) za 3 h. Dušikova (V) kislina in peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) povzročita oksidacijo organske snovi in sprostitve vezanih težkih kovin ter raztapljanje kovinskih sulfidov. Šesto frakcijo, frakcijo

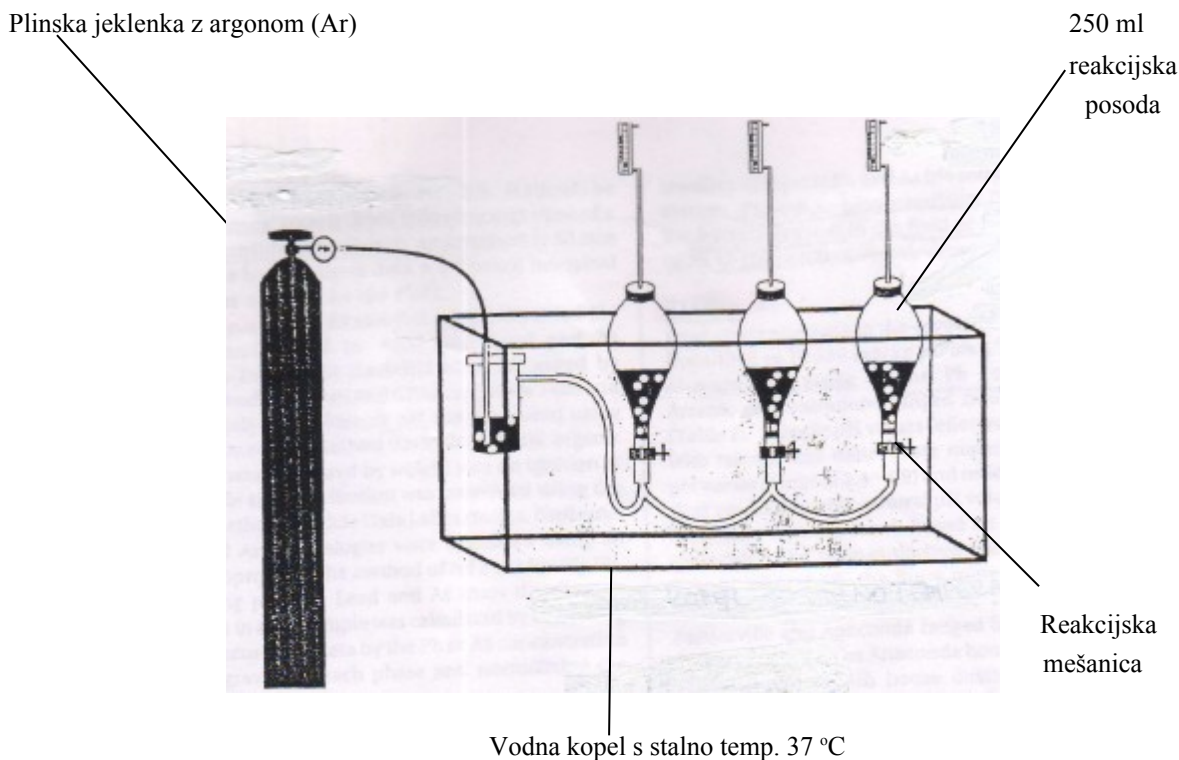
preostankov (kovin, vključenih v kristalne rešetke glinenih mineralov), pa smo pridobili v razklopu z *aqua regia* (zlatotopko), s pomočjo katere smo povzročili raztapljanje silikatov in preostalih mineralov.

Celotno analizo smo naredili v treh ponovitvah.

### 3.6 ORALNA BIDOSEGLJIVOST SVINCA (Pb)

V visoko in srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter v deževnikovih iztrebkih, proizvedenih v teh tleh, smo določili oralno biodosegljivost Pb s fiziološko osnovanim ekstrakcijskim testom (Physiologically Based Extraction Test, PBET) (Ruby in sod., 1996). PBET je *in vitro* test za napovedovanje biodosegljivosti kovin iz trdnega matriksa. Test temelji na fizioloških lastnostih prebavnega sistema otrok med drugim in tretjim letom starosti. Zaradi igralnih navad, ob katerih pride tudi do nenamerne zaužitja tal, so bolj izpostavljeni onesnažilom v tleh kot odrasli (Ruby in sod., 1996; Davis in Mirick, 2006). Test ne simulira celotnega fiziološkega procesa absorpcije Pb skozi črevesni epitel, temveč le biodosegljivost Pb v človeškem želodcu in v tankem črevesju.

Želodčno fazo PBET smo simulirali z dodajanjem želodčne raztopine, ki je vsebovala 1,25 g pepsina, 0,50 g citrata in malata, 420  $\mu\text{L}$  laktata ter 500  $\mu\text{L}$  očetne kisline, raztopljene v 1 L vode pri pH  $2,50 \pm 0,05$  (uravnavan z 12 M klorovodikovo kislino (HCl)). Za analizo smo potrebovali 0,4 g zračno posušenega vzorca, presejanega skozi 250  $\mu\text{m}$  sito. Pripravljeni vzorec smo v 250 mL polipropilenski posodi prelili s 40 mL želodčne ekstrakcijske raztopine in tako dobili reakcijsko mešanico. V posodo smo dovajali inertni plin argon s pretokom 20 L h<sup>-1</sup> in s tem simulirali peristaltične gibe v prebavnem traktu. Ekstrakcija je potekala v vodni kopeli pri stalni temperaturi 37 °C. Po 1 h smo odpipetirali po 2 mL reakcijske mešanice (za analizo oralne biodosegljivosti Pb v želodčni fazi) in volumen nadomestili z 2 mL sveže želodčne raztopine. pH vzorca smo zvišali na vrednost 7 z natrijevim karbonatom (NaHCO<sub>3</sub>) v dializni vrečki (8000 MWCO, spectra/Por Cellulose ester tubing). Vzorcju smo dodali 20 mg pankreatina in 70 mg žolčnega ekstrakta. Reakcijsko mešanico smo 1 h inkubirali pri 37 °C in jo nato odpipetirali 2 mL za analizo oralne biodosegljivosti Pb v črevesni fazi. Odpipetirane vzorce smo centrifugirali, supernatant pa shranili pri temperaturi 5 °C za nadaljnjo analizo vsebnosti Pb.



Slika 4: Shema fiziološko osnovanega testa biodosegljivosti (PBET) (Ruby in sod., 1996)

### 3.7 DOLOČANJE TEŽKIH KOVIN

Zračno posušene vzorce visoko in srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tal (3 g) ter deževnikovih iztrebkov (1 g), proizvedenih v teh tleh, smo zmelili v agarjevi tirilnici in prekuhali v *aqua regia* (28 mL), razredčili z ionizirano vodo do 100 mL ter Pb in Zn analizirali z AAS (Atomski Absorpcijski Spektrometer, Perkin-Elmer 1100-B, Norwalk, CT, USA).

Ekstrahirane težke kovine iz izpiralne raztopine, sekvenčnih ekstrakcij ter ekstrakcijskih raztopin PBET in TCLP testa smo določili direktno z AAS. Standardni referenčni material, ki smo ga uporabili za primerjavo *aqua regia* in analize znotraj laboratorija kot del protokola QA/QC, je bil ALVA Boden1 iz HBLFA Raumberg-Gumpenstien, Irding, Avstrija. Doseženi odstotek je znašal za Pb  $104,2 \pm 2,5$  in za Zn  $110,0 \pm 7,1$ . Zaznavna meja je znašala za Pb  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  in za Zn  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Slepri vzorec in analitične duplikate smo uporabili, kjer je bilo primerno za zagotovitev natančnosti v analizi.

### 3.8 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Student t-test ( $p < 0,05$ ) za parne podatke in Duncanov test ( $p < 0,05$ ) za določitev razlik med povprečji. Duncanov test smo naredili s programom Statgraphics Plus za Windows 4.0.



## 4 REZULTATI

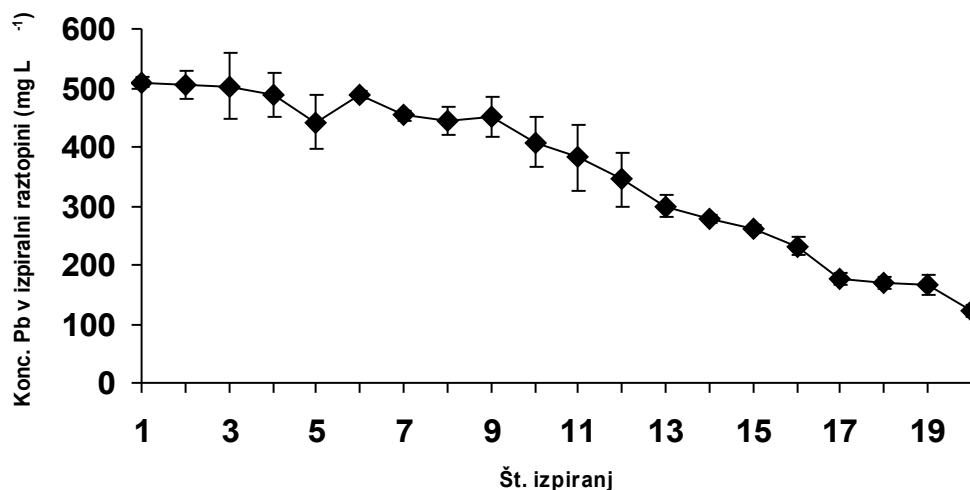
### 4.1 REMEDIACIJA TAL

Lastnosti tal, določenih s standardno pedološko analizo, pH vrednosti in celotno koncentracijo Pb in Zn pred in po remediaciji visoko in srednje onesnaženih tal smo podali v prilogah A in B.

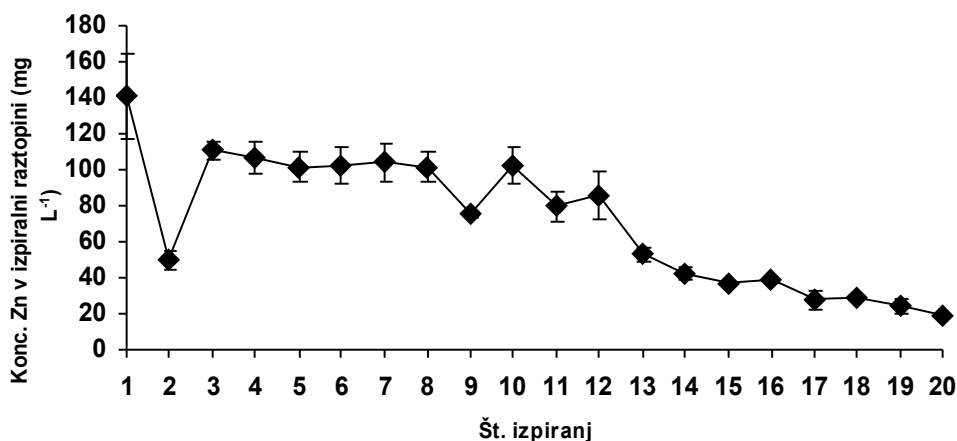
Pri visoko onesnaženih tleh se je pH tal po dvajsetstopenjskem izpiranju tal z EDTA-jem statistično značilno dvignil ( $p < 0,05$ ), medtem ko je delež karbonatov v tleh statistično značilno upadel ( $p < 0,05$ ). Razlike med drugimi lastnostmi tal pred in po remediaciji so bile manjše ali pa so ostale znotraj standardnega odklona (priloge B in C).

Pri srednje onesnaženih tleh je pH tal ostal znotraj naravnih vrednosti, kljub temu pa se je pokazala statistično značilna razlika ( $p < 0,05$ ) med pH tal pred remediacijo (pH 6,6) in po njej (pH 7,2). Razlike med drugimi pedološkimi lastnostmi tal pred remediacijo in po njej so večinoma ostale znotraj standardnega odklona.

Med remediacijo, tako visoko kot tudi srednje onesnaženih tal, se je delež Pb in Zn v tleh z vsako stopnjo izpiranja zmanjševal v primerjavi z začetnim deležem v tleh. Z remediacijo visoko onesnaženih tal smo po dvajsetstopenjskem izpiranju tal s skupno  $50 \text{ mmol kg}^{-1}$  EDTA-ja odstranili 58,4 % Pb in 16,6 % Zn glede na njuno začetno vsebnost v tleh (sliki 5 in 6).



Slika 5: Koncentracija Pb v izpiralni raztopini vode (pred vstopom v sistem za obdelavo procesnih voda) med 20-stopenjskim izpiranjem tal z  $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$  EDTA-ja. Podana so povprečja treh ponovitev s standardnim odkonom.



Slika 6: Koncentracija Zn v izpiralni raztopini vode (pred vstopom v sistem za obdelavo procesnih voda) med 20-stopenjskim izpiranjem tal z 2,5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA-ja. Podana so povprečja treh ponovitev s standardnim odklonom.

Z remediacijo srednje onesnaženih tal pa smo po štiristopenjskem izpiranju tal s skupno 12,5 mmol kg<sup>-1</sup> EDTA-ja odstranili 39,8 ± 2,2 % Pb in 6,1 ± 3 % Zn.

Primerjali smo porazdelitvene vzorce frakcionacije Pb in Zn v remediiranih in neremediiranih srednje onesnaženih tleh. Rezultati primerjave niso pokazali statistično značilnih razlik (Studentov *t*-test,  $p < 0,05$ ) (priloge D in E). Po remediaciji se je koncentracija Pb v izmenljivi frakciji zmanjšala za faktor 4. Nekaj Pb se je tudi odstranilo iz frakcije vezane na Fe- in Mn-oksidi. Od najpomembnejših frakcij vezav Pb pa je statistično značilno upadla ( $p < 0,05$ ) le koncentracija Pb, vezanega na karbonate.

Med porazdelitvijo Pb in Zn v remediiranih in neremediiranih visoko onesnaženih tleh smo ugotovili statistično značilne razlike (Studentov *t*-test,  $p < 0,05$ ). Po remediaciji je koncentracija Pb v frakciji izmenjave upadla za faktor 10 ter za faktor 2,6 v frakciji vezane na karbonate in za faktor 2,2 v frakciji vezane na Fe- in Mn-oksidi. Nasprotno se je v frakciji vezani na organsko snov koncentracija Pb povečala za faktor 1,2, v frakciji preostankov pa za faktor 1,5 (priloga F). Koncentracija Zn se je v frakciji izmenjave po remediaciji tal zmanjšala za faktor 53,0, v frakciji vezani na karbonate za faktor 3,6 ter v frakciji vezani na Fe- in Mn-oksidi za faktor 3,3. Tako kot pri Pb se je tudi pri Zn njegova koncentracija po remediaciji povečala za faktor 1,2 v frakciji vezani na organsko snov in za faktor 1,4 v frakciji preostankov po ekstrakciji (priloga G).

Rezultate analize TCLP v visoko onesnaženih tleh (priloga B) smo medsebojno primerjali (Studentov *t*-test,  $p < 0,05$ ). Koncentraciji Pb in Zn v TCLP ekstrakcijski raztopini sta se po remediaciji z dvajsetstopenjskim izpiranjem statistično značilno zmanjšali za faktor 5 in 6 ( $p < 0,05$ ).

Analiza primerjave rezultatov PBET-testa, med visoko onesnaženimi tlemi pred remediacijo tal in po njej, je pokazala statistično značilno zmanjšanje koncentracije biodosegljivega Pb v želodčni fazi tal po remediaciji za faktor 3 ( $p < 0,05$ ). V črevesni fazi

je bil opazen tudi rahel upad biodosegljivosti Pb po remediaciji tal, a ni bil statistično značilen (Studentov t-test,  $p < 0,05$ ).

Analiza rezultatov PBET-testa v srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik.

#### 4.2 pH DEŽEVNIKOVIIH IZTREBKOV

pH v iztrebkih vrste *L. rubellus* ( $6,69 \pm 0,22$ ), proizvedenih v srednje onesnaženih neremediiranih tleh, se ni statistično značilno razlikoval ( $p < 0,05$ ) od rahlo kislih začetnih tal ( $6,64$ ), medtem ko je bil pH v iztrebkih vrste *E. fetida* statistično značilno višji ( $6,99 \pm 0,09$ ). Izmerjene pH vrednosti v iztrebkih obeh vrst deževnikov, proizvedenih v srednje onesnaženih remediiranih tleh, so bile statistično značilno nižje ( $6,86 \pm 0,13$  in  $7,03 \pm 0,06$  *L. rubellus* in *E. fetida*) v primerjavi z vrednostjo pH začetnih tal ( $7,23 \pm 0,06$ ).

pH v iztrebkih obeh vrst deževnikov, *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v visoko onesnaženih neremediiranih tleh, se ni statistično značilno razlikoval ( $p < 0,05$ ) od pH rahlo kislih začetnih tal. Po remediaciji se je pH tal statistično značilno zvišal ( $p < 0,05$ ) za več kot 0,6 enot. Tudi pri iztrebkih obeh vrst deževnikov, proizvedenih v remediiranih tleh, je pH statistično značilno narasel ( $p < 0,05$ ), in sicer za 0,45 enot pri *E. fetida* ter za 0,65 enot pri *O. tyrtaeum*.

#### 4.3 VSEBNOST Pb IN Zn V DEŽEVNIKOVIIH IZTREBKIIH

V neremediiranih visoko onesnaženih tleh je bila koncentracija Pb v iztrebkih obeh vrst deževnikov, *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, statistično značilno višja ( $p < 0,05$ ) kot v začetnih tleh. Koncentracija Zn je statistično značilno upadla le v iztrebkih vrste *O. tyrtaeum*, proizvedenih v remediiranih tleh.

#### 4.4 ŠESTSTOPENJSKA SEKVENČNA ANALIZA

Rezultate analize šeststopenjske sekvenčne ekstrakcije visoko onesnaženih tal smo podali v prilogi F za Pb in v prilogi G za Zn, srednje onesnaženih tal pa v prilogi C za Pb in prilogi D za Zn. Iz prilog F in D je razvidno, da je bil največji delež Pb prisoten v frakciji vezani na organsko snov, tako v remediiranih kot tudi v neremediiranih tleh, ter v iztrebkih deževnikov, *L. rubellus*, *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v teh tleh. Iz prilog G in D pa je razvidno, da je bil največji delež Zn prisoten v frakciji preostanka po ekstrakciji, v veliki meri pa je bil tudi prisoten v frakciji vezani na organsko snov.

V iztrebkih vrste *E. fetida*, proizvedenih v visoko onesnaženih neremediiranih tleh, se je koncentracija Pb v vodotopni frakciji v primerjavi z začetnimi tlemi statistično značilno povečala ( $p < 0,05$ ). Spremembe v koncentraciji Pb v ostalih frakcijah niso bile statistično značilne ( $p < 0,05$ ). V nasprotju z vrsto *E. fetida* se je koncentracija Pb v iztrebkih vrste *O. tyrtaeum* v vodotopni frakciji statistično značilno zmanjšala za faktor 2,5. Koncentracija

Pb se je v frakciji vezani na Fe- in Mn-okside ter na organsko snov statistično značilno zmanjšala, medtem ko se je koncentracija Pb statistično značilno povečala ( $p < 0,05$ ) v frakciji izmenjave, v frakciji vezani na karbonate ter v frakciji preostankov po ekstrakciji. V iztrebkih vrste *E. fetida*, proizvedenih v visoko onesnaženih remediiranih tleh, se je koncentracija vodotopnega Pb povečala za faktor 17, medtem ko je koncentracija Pb v iztrebkih vrste *O. tyrtaeum* ostala nespremenjena. V iztrebkih obeh vrst deževnikov (*E. fetida* in *O. trytaeum*) je bilo opazno tako statistično značilno povečanje koncentracije Pb v frakcijah vezanih na karbonate ter na Fe- in Mn-okside kakor tudi statistično značilno zmanjšanje le-te v frakciji vezave na organsko snov ( $p < 0,05$ ).

V iztrebkih *E. fetida*, proizvedenih v srednje onesnaženih neremediiranih tleh, smo opazili 11-kratno statistično značilno povečanje ( $p < 0,05$ ) koncentracije Pb v frakciji vodne raztopine ter 3-kratno statistično značilno zmanjšanje ( $p < 0,05$ ) v frakciji izmenjave. Spremembe koncentracije Pb v posameznih frakcijah so bile statistično neznačilne ( $p < 0,05$ ). Tudi v iztrebkih *L. rubellus*, proizvedenih v srednje onesnaženih neremediiranih tleh, ni bilo opaziti nobene statistično značilne spremembe v koncentraciji Pb ( $p < 0,05$ ). V iztrebkih obeh vrst deževnikov, *E. fetida* in *L. rubellus*, proizvedenih v srednje onesnaženih remediiranih tleh, smo zaznali majhno, a statistično značilno zmanjšanje ( $p < 0,05$ ) koncentracije Pb v frakciji vezani na Fe- in Mn-okside. Samo v iztrebkih *E. fetida* se je koncentracija Pb v vodotopni frakciji povečala za 5-krat. Podobno kot v neremediiranih tleh, tudi v remediiranih nismo zaznali nobene statistično značilne razlike v koncentraciji Pb v frakciji izmenjave.

Statistično značilno povečanje koncentracije Zn za faktor 1,5 v iztrebkih *L. rubellus*, proizvedenih v remediiranih srednje onesnaženih tleh, smo zaznali le v frakciji vezani na organsko snov (priloga D). Statistične spremembe so bile opazne tudi pri koncentraciji Zn, vezanega na karbonate in okside.

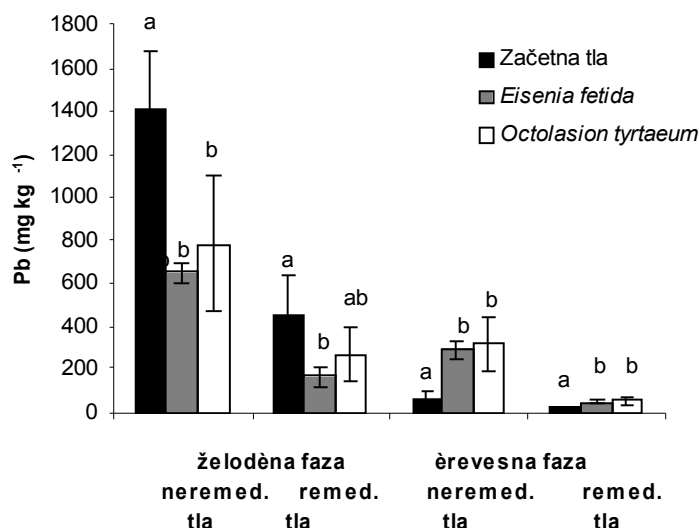
V iztrebkih obeh vrst deževnikov, *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v visoko onesnaženih neremediiranih tleh, je bilo le v vodotopni frakciji komaj zaznavno, a statistično značilno povečanje ( $p < 0,05$ ) koncentracije Zn (priloga F). Koncentracija Zn se je statistično značilno zmanjšala ( $p < 0,05$ ) v vseh frakcijah, razen pri najmanj dostopni frakciji preostankov po ekstrakciji, kjer je koncentracija ostala nespremenjena. V iztrebkih *E. fetida*, proizvedenih v visoko onesnaženih remediiranih tleh, se koncentracija Zn v posameznih frakcijah ni statistično značilno razlikovala ( $p < 0,05$ ) od koncentracije Zn v frakcijah začetnih tal. V iztrebkih *O. tyrtaeum* je bilo glede na začetna tla opazno statistično značilno ( $p < 0,05$ ) povečanje koncentracije Zn v frakciji izmenjave ter frakciji vezani na karbonate. V vodotopni frakciji ter v frakciji vezani na Fe- in Mn-okside smo zaznali majhno, a statistično značilno ( $p < 0,05$ ) zmanjšanje koncentracije Zn.

#### 4.5 TCLP

Med mobilnostjo Pb in Zn v iztrebkih obeh vrst deževnikov (*E. fetida* in *O. tyrtaeum*), proizvedenih v visoko onesnaženih remediiranih in neremediiranih tleh ter v začetnih tleh, ni bilo nobenih statistično značilnih razlik ( $p < 0,05$ ) (priloga B). Izjema je bila le povečana mobilnost Pb za kar 6,2-krat v iztrebkih *E. fetida* iz remediiranih tal. Mobilnost Pb v iztrebkih *E. fetida* iz remediiranih tal, se ni statistično razlikovala ( $p < 0,05$ ) od mobilnosti Pb neremediiranih tleh.

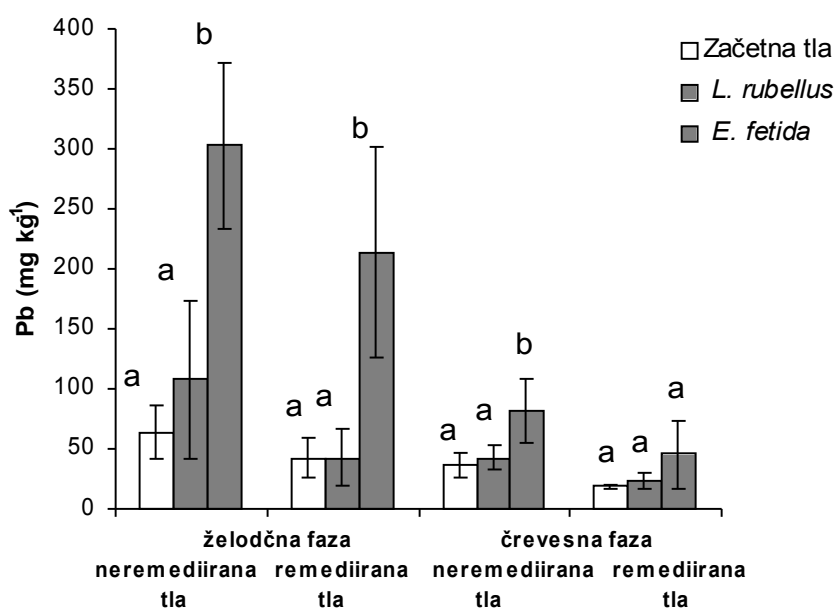
#### 4.6 ORALNA BIDOSEGLJIVOST Pb

Analiza rezultatov testa oralne biodosegljivosti Pb (slika 7) je pokazala, da je bila biodosegljivost Pb v želodčni fazi statistično značilno nižja ( $p < 0,05$ ) v iztrebkih obeh vrst deževnikov (*E. fetida* in *O. tyrtaeum*), proizvedenih v visoko onesnaženih remediiranih in neremediiranih tleh, v primerjavi z začetnimi tlemi. Po drugi strani pa je bila v deževnikovih iztrebkih (*E. fetida* in *O. tyrtaeum*) biodosegljivost Pb v črevesni fazi v primerjavi s tlemi statistično značilno višja ( $p < 0,05$ ) za faktor 4,4 in 4,9. Biodosegljivost Pb v iztrebkih vrst *E. fetida* in *O. trytaeum*, proizvedenih v visoko onesnaženih remediiranih tleh, je bila v črevesni fazi za 2,4- in 2,8-krat višja v primerjavi z visoko onesnaženimi remediiranimi tlemi. Spremembe v koncentraciji biodosegljivega Pb v visoko onesnaženih remediiranih tleh so bile majhne, a vseeno statistično značilne ( $p < 0,05$ ).



Slika 7: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni fazi, določena *in vitro* s PBET-testom, v visoko onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter deževnikovih iztrebkih vrst *E. fetida* in *O. tyrtaeum*. Podana so povprečja treh vrednosti s standardnim odklonom. (a, b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Biodosegljivost Pb v iztrebkih vrste *E. fetida* je bila tako v primerjavi z iztrebki vrste *L. rubellus* kakor tudi v primerjavi s srednje onesnaženimi remediiranimi in neremediiranimi začetnimi tlemi statistično značilno višja (slika 8). V iztrebkih vrste *E. fetida*, proizvedenih v srednje onesnaženih neremediiranih tleh, je bila biodosegljivost Pb v želodčni fazi za 4,1-krat in v črevesni fazi za 2,3-krat višja v primerjavi s začetnimi tlemi. V iztrebkih vrste *E. fetida*, proizvedenih v srednje onesnaženih remediiranih tleh, se je biodosegljivost Pb v želodčni fazi statistično značilno povečala za 5,1-krat, medtem ko pri biodosegljivosti Pb v črevesni fazi ni bilo opaznih statistično značilnih razlik ( $p < 0,05$ ). Med iztrebki vrste *L. rubellus* in začetnimi tlemi ni bilo zaznati statistično značilnih razlik ( $p < 0,05$ ).



Slika 8: Oralna biodosegljivost Pb v želodčni in črevesni fazi, določeni *in vitro* s PBET-testom, v srednje onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh ter deževnikovih iztrebkih vrst *L. rubellus* in *E. fetida*. Podana so povprečja treh vrednosti s standardnim odklonom. (a, b) označujeta statistično značilne razlike (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

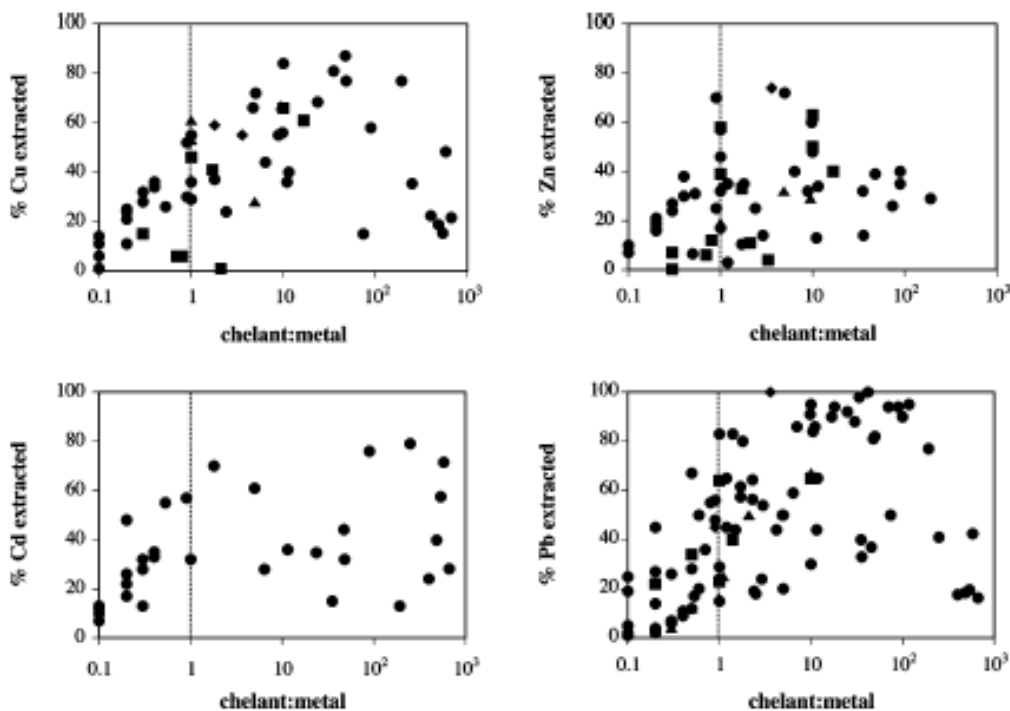
### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Remediacija tal

Novejša remediacijska metoda (proces očiščevanja izpiralne raztopine skozi zaprto procesno zanko s pomočjo ozona/UV in s pomočjo adsorpcijske odstranitve težkih kovin iz raztopine) nam je omogočila učinkovito odstranitev ostankov kompleksov EDTA-težka kovina iz tal. Odstranitev kompleksov EDTA-težka kovina iz tal je izredno pomembna zaradi mobilizacije ionov kovin ter zaradi razgradljivosti ligandov (EDTA) in njihovih kompleksov v okolju. Mobilizirani ioni kovin so biološko dostopnejši (rastlinam lažje dosegljivi) in se lažje izpirajo v podtalnico. Večina ligandov in njihovih kompleksov je v okolju slabo fito-, kemo- in biorazgradljivih (Nortemann, 1999, cit. po Finžgar in Leštan, 2006a) ter potencialno toksičnih za mikroorganizme (Sillanpaa in Oikari, 1996, cit. po Finžgar in Leštan, 2006a). Učinkovitost odstranitve mobiliziranega Pb in Zn iz tal smo spremljali z merjenjem koncentracij le-teh v izpiralni raztopini, tj. v raztopini, ki je tekla skozi kolone tal. Koncentracija Pb in Zn se je z vsako stopnjo izpiranja zmanjševala tako v visoko kakor tudi v srednje onesnaženih remediacijskih tleh (sliki 5 in 6). Navedene ugotovitve potrjujejo učinkovitost odstranjevanja kompleksov EDTA-težka kovina iz tal z uporabljeno metodo.

Z remediacijo želimo iz tal odstraniti težke kovine, ki predstavljajo potencialno nevarnost za okolje in za zdravje. Zato moramo za oceno učinkovitosti remediacijske tehnologije ovrednotiti biodosegljivost in mobilnost težkih kovin v tleh, izpiranje težkih kovin iz tal ter oralno biodosegljivost težkih kovin pred remediacijo tal in po njej.

S šeststopenjsko sekvenčno ekstrakcijo ocenjujemo delež Pb in Zn, vezanega na biološko dostopne in nedostopne frakcije tal. Iz rezultatov (prilogi D in F) je razvidno, da je delež Pb tako v neremediiranih kot v remediiranih visoko in srednje onesnaženih tleh največji v frakciji vezani na organsko snov, kar je v skladu s pričakovanji, saj je znano, da ima Pb močno afiniteto do organske snovi (Domy, 2001). Iz prilog E in G pa je razvidno, da je Zn v večjem deležu tako v remediiranih kot tudi v neremediiranih visoko in srednje onesnaženih tleh prisoten v frakciji preostankov (vključen v kristalno strukturo alumosilikatnih glinenih mineralov). Ta podatek nam tudi pojasnjuje slabo odstranitev Zn iz tal s pomočjo liganda EDTA (odstranili smo ga le približno 6 % začetne vrednosti). Nasprotno pa lahko rečemo, da je bil Pb z ligandom EDTA dokaj enotno odstranjen iz vseh frakcij (slika 9). Rezultati dokazujejo, da se je delež Pb in Zn po remediaciji v obeh obravnavanih vzorcih tal zmanjšal v biološko dostopnih talnih frakcijah, tj. v frakciji talne raztopine in v frakciji izmenjave, kar se sklada tudi z dognanji drugih raziskav (Maiz in sod., 2000). Ker torej Pb in Zn nista biološko dostopna, saj sta v večjem deležu vezana na biološko nedostopne frakcije, ne predstavljata nevarnosti za okolje in za zdravje ljudi.



Legenda: % Cu, Zn, Cd, Pb extracted = % ekstrahiranega Cu, Zn, Cd in Pb;  
chelant:metal = kelat:težka kovina

Slika 9: Ekstrakcija bakra (Cu), cinka (Zn), kadmija (Cd) in svinca (Pb) iz naravno onesaženih tal s kelatnimi ligandi (● EDTA, ■ NTA, ▲ EDDS in ◊ DTPA) kot funkcija razmerja med kelanti in celotno vsebnostjo težkih kovin (Nowack in sod., 2006)

Mobilnost težkih kovin v tleh in potencialno izpiranje le-teh iz tal nam poda TCLP-test. Že neremedirana tla (uporabljena pri poizkusu) niso presegala kritičnih vrednosti določenih po US EPA (1995), tj. 5 mg L<sup>-1</sup> za Pb in 250 mg L<sup>-1</sup> za Zn.

Iz rezultatov je razvidno, da z remediacijo tal porušimo njeno kemijsko ravnovesje, saj z odstranitvijo Pb in Zn iz posameznih talnih frakcij spremenimo kemijske pogoje v tleh. Slednje se odraža v spremenjeni porazdelitvi Pb in Zn med posameznimi talnimi frakcijami.

### 5.1.2 Vpliv deževnikov na pH tal

Reakcija tal je eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na topnost, speciacijo in oralno biodosegljivost Pb. Biodosegljivost Pb in Zn je obratno sorazmerna s pH tal (Weltje, 1998; Ge in sod., 2000; Cao in sod., 2001; Domy, 2001). pH vpliva na mobilnost in biodosegljivost težkih kovin v tleh, zato je smiselno, da ugotovimo vpliv aktivnosti deževnikov na njegovo spremembo. Dokazano je, da je pH v deževnikovih iztrebkih višji in bližji nevtralni vrednosti (pH 7) kot v tleh, v katerih živijo. Deževniki so izredno občutljivi na koncentracijo protonov (H<sup>+</sup>) v vodni raztopini, kar pojasnjuje deževnikovo netoleranco do amoniaka (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) (Edwards in Bohlen, 1996). Posledično so raziskovalci skleпали, da deževniki nevtralizirajo tla. Nastali sta dve razlagi, ki pojasnjujeta



nevtralizacijo tal. Prva pravi, da deževniki nevtralizirajo talni pH zaradi izločanja kalcija iz železokalcijevih žlez. Druga, bolj verjetna razlaga pa pravi, da deževniki nevtralizirajo talni pH s pomočjo bazičnih izločkov iz črevesja in/ali z izločanjem amoniaka.

Različni avtorji (Edwards in Bohlen, 1996; Wen in sod., 2004, 2006) poročajo o dvigu pH tal proti nevtralnimi vrednostim zaradi vpliva deževnikov vrste *E. fetida*, kar smo opazili tudi v naši raziskavi. Vendar smo pri primerjavi vpliva različnih vrst deževnikov na pH tal opazili razlike, ki so posledica medvrstnih fiziološko-ekoloških razlik kot so zgradba in lastnosti prebavnega sistema ter način prehranjevanja.

Dobljeni rezultati izpostavljajo aktivno vlogo oz. vpliv deževnikov na uravnavanje talnega pH-ja. To bi morali upoštevati pri oceni tveganja po remediaciji tal, saj je bilo že objavljeno, da se v deževnikovem črevesju spremeni mobilnost težkih kovin kot posledica spremembe pH-ja (Weltje, 1998). Potrebno pa je tudi upoštevati medvrstne razlike deževnikov.

### 5.1.3 Vsebnost težkih kovin v deževnikovih iztrebkih

Rezultati analize vzorcev so pokazali izrazito, a nelogično višjo vsebnost Pb v iztrebkih v primerjavi s tlemi, kar so tudi drugi raziskovalci zaznali pri svojih raziskavah (Morgan J.E. in Morgan A.J., 1992). Visoka vsebnost Pb v iztrebkih je morebitna posledica absorpcije organske snovi v prebavnem traktu, ki se odraža v navidezno višji koncentraciji težkih kovin (Morgan J.E. in Morgan A.J., 1999). Posledično bi morali v nadaljnjih raziskavah meriti tudi delež organske snovi v deževnikovih iztrebkih.

Tako v visoko onesnaženih remediiranih tleh kakor tudi v visoko onesnaženih neremediiranih tleh se je celokupna vsebnost kalcija (Ca) očitno povečala v iztrebkih obeh vrst deževnikov v primerjavi z začetnimi tlemi. Deževniki imajo železokalcijeve žleze, ki se odpirajo v požiralnik in ki izločajo kalcijev karbonat. Kljub temu, da njihova funkcija ni povsem razjasnjena (Edwards in Bohlen, 1996), bi lahko njihova aktivnost vplivala na povečanje Ca v deževnikovih iztrebkih.

Dokazano je, da se kopičenje težkih kovin tako med ekološko kot med fiziološko različnimi deževniki razlikuje (Dai in sod., 2004). Spurgeon in Hopkin (1999) sta objavila nasprotujočo si fiziološko usodo esencialnih (nujno potrebnih za življenje) elementov kot je Zn in neesencialnih elementov kot je Pb. Tako kot talni členonožci (Janssen in Horgervorst, 1993) tudi deževniki regulirajo vsebnost esencialnih elementov v telesu, ki jih selektivno prevzemajo iz tal (Zorn in sod., 2005). Iz tega vidika lahko upad vsebnosti Zn v iztrebkih vrste *O. tyrtaeum* in nespremenjeno vsebnost le-tega v iztrebkih vrste *E. fetida* v primerjavi s tlemi pripišemo različnim regulacijskim mehanizmom. Podobne regulacijske mehanizme za večjo učinkovitost kopičenja Zn je pri njivskem deževniku (*Aporrectodea caliginosa*) v primerjavi z rdečim deževnikom (*L. rubellus*) objavil tudi Dai s sod. (2004). Regulacijske mehanizme lahko pripišemo posebnim fiziološkim potrebam njivskega

deževnika (*A. caliginosa*), ki zahteva biodostopno zalogo Zn med diapavzo, ki je rdeči deževnik (*L. rubellus*) nima (Edwards in Bohlen, 1996).

#### 5.1.4 Vpliv deževnikov na frakcionacijo Pb in Zn

Biodosegljivost, vstop v prehrambeno verigo, toksičnost, mobilnost in prenos težkih kovin so odvisne od njihovih kemijskih oblik in njihove frakcionacije v tleh. Dokazano je, da deževniki s svojo aktivnostjo spremenijo kemijske in fizikalne lastnosti tal, od katerih je odvisna frakcionacija težkih kovin v tleh.

V srednje onesnaženih tleh je bil Zn v večjem deležu prisoten v kemično in biološko najmanj dosegljivem ostanku talne frakcije. Posledično v iztrebkih deževnikov nismo zaznali nobene opazne spremembe koncentracije Zn v frakciji izmenjave. Različne raziskave o vplivu deževnikov na biodosegljivo frakcijo težkih kovin v tleh so podale rezultate, podobne našim, vendar jih lahko le delno primerjamo z našo raziskavo, saj smo se mi osredotočili na biorazpoložljivo frakcionacijo težkih kovin v deževnikovih iztrebkih in ne v tleh. Wen in sod. (2004) so objavili statistično značilno povečanje koncentracije težkih kovin (Cr, Co, Ni, Zn, Cu, Cd in Pb) v frakciji vezani na karbonate, v vodotopni frakciji in v frakciji izmenjave kot posledice aktivnosti smrdečega deževnika (*E. fetida*). Te frakcije predstavljajo rastlinam najbolj dosegljive oblike težkih kovin. Ma in sod. (2002) so ugotovili, da deževniki iz rodu *Pheretima* povečajo dosegljivost Pb in Zn v tleh. Cheng in Wong (2002) sta objavila, da se po inokulaciji deževnikov iz rodu *Pheretima* spremeni frakcionacija Zn v tleh, tako da se koncentracija Zn v biodosegljivi frakciji, določeni z DTPA-ekstrakcijo, kot tudi v frakciji vezani na organsko snov, poveča. Po drugi strani pa koncentracija Zn v biodosegljivi frakciji izmenjave in v frakciji vezani na karbonate upade. Statistična značilnost teh rezultatov se spreminja glede na tip tal, ki ga uporabljamo v poizkusu. To raznolikost rezultatov bi lahko pripisali razlikam v značilnostih tal ter različnim fiziološkim značilnostim in razlikam v ekološkem vedenju posameznih vrst deževnikov. Znano je, da se kopičenje težkih kovin v tkivih deževnikov medvrstno razlikuje (Dai in sod., 2004).

#### 5.1.5 Vpliv deževnikov na mobilnost in izpiranje Pb in Zn

Mobilnost in prenos težkih kovin po remediaciji tal predstavlja potencialno nevarnost za onesnaženje podtalnice in posledično ogrožanje človekovega zdravja. Visoko onesnaženim tлом, pred remediacijo in po njej, ter iztrebkom vrst *E. fetida* in *O. tyrtaeum*, proizvedenih v remediiranih in neremediiranih tleh, smo s TCLP ekstrakcijo določili mobilnost težkih kovin. Zanimivo je, da se mobilnost Pb v iztrebkih vrste *E. fetida*, proizvedenih v remediiranih tleh, statistično ne razlikuje ( $p < 0,05$ ) od mobilnosti Pb v neremediiranih tleh. Iz tega lahko sklepamo, da aktivnost vrste *E. fetida* izniči učinkovitost remediacijskega procesa. Tudi iz rezultatov, dobljenih s TCLP-testom, lahko opazimo, da obe vrsti različno vplivata na obnašanje težkih kovin v tleh.

### **5.1.6 Vpliv deževnikov na oralno biodosegljivost Pb**

Iz rezultatov je razvidno, da deževniki vplivajo na oralno biodosegljivost Pb tako v remediiranih kot tudi v neremediiranih visoko in srednje onesnaženih tleh ter da je njihov vpliv vrstno značilen. Nekatere vrste deževnikov lahko znatno povečajo biodosegljivost težkih kovin ne samo v onesnaženih ampak tudi v remediiranih tleh.

Rezultati kažejo, da vse izbrane vrste deževnikov povečajo biodosegljivost Pb v črevesni frakciji, čeprav so koncentracije nižje kot v želodčni frakciji, večinoma zaradi nevtralne pH vrednosti. Privzem hranil v prebavnem sistemu človeka poteka v tankem črevesju, zato nas te, čeprav nižje koncentracije z vidika ogrožanja zdravja bolj zanimajo.

## 5.2 SKLEPI

Koncentracija Pb je bila po remediaciji v iztrebkih deževnikov izrazito povečana, medtem ko koncentracija Zn v deževnikovih iztrebkih po remediaciji ni bila izrazito povečana, v nekaterih primerih je bila celo zmanjšana. Glede na te rezultate lahko potrdimo teze drugih raziskav (Spurgeon in Hopkin, 1999) o nasprotujoči si fiziološki usodi esencialnih (nujno potrebnih za življenje) elementov, kot je Zn, in neesencialnih elementov, kot je Pb.

V raziskavi smo opazili tudi bistvene razlike med vplivi različnih vrst deževnikov na frakcionacijo tal. Razlike se odražajo kot posledica različnih fizioloških značilnosti (npr. zgradba prebavnega trakta) in ekološkega vedenja posameznih vrst deževnikov.

Glede na postavljeno hipotezo lahko potrdimo, da deževniki kot model živih talnih dejavnikov vplivajo na frakcionacijo, mobilnost in oralno biodosegljivost Pb in Zn v tleh pred in po izpiranju tal z EDTA-jem (remediaciji). Iz rezultatov je razvidno, da se je koncentracija v biodosegljivih frakcijah Pb in Zn v iztrebkih povečala. Deževniki kot živi dejavniki lahko zato izničijo učinek remediacije tal.

## 6 POVZETEK

Zaradi vse večje uporabe raznolikih kemikalij (dnevno uporabimo več kot 300 kemikalij tako v industriji kot tudi v vsakdanjem življenju) se nevarnost, ki jo onesnažila predstavljajo za okolje in zdravje, iz leta v leto povečuje. Tla so kot vir hrane za človeka pomembna prvina, zato je remediacija onesnaženih tal nujna. V raziskavi smo uporabili remediacijsko metodo večstopenjskega izpiranja tal z ligandom, EDTA.

Zaradi praktičnih razlogov (visoka cena kelatnih ligandov in njihova neučinkovitost pri odstranjevanju težkih kovin, močno vezanih na nelabilne frakcije iz tal) je cilj remediacije tal pogosto zmanjšanje toksičnega dela težkih kovin v tleh (zmanjšanje njihove mobilnosti, fito- in bio- dosegljivosti), čeprav jih iz tal popolnoma ne odstranimo. Poleg koncentracije je za toksičnost onesnažil v tleh pomembna tudi njihova mobilnost (in s tem njihovo izpiranje iz tal) in njihova biodosegljivost. Učinkovitost remediacije tal smo ugotavljali s primerjavo frakcionacije, mobilnosti in biodosegljivosti Pb in Zn pred remediacijo tal in po njej. Frakcionacijo smo določali z metodo sekvenčne ekstrakcije, mobilnost s TCLP-testom ter biološko dosegljivost Pb s PBET-testom po Rubyju.

Ker usoda preostankov težkih kovin v tleh po remediaciji še ni raziskana in ker tudi ni znana kinetika procesa ponovne prerazporeditve težkih kovin po remediaciji tal ter dinamika njihove morebitne prerazporeditve iz biološko manj dosegljive v biološko dosegljivejše oblike, nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo na te procese deževniki kot modelni organizmi živih dejavnikov. Te procese smo spremljali v srednje in visoko onesnaženih neremediiranih in remediiranih tleh iz Mežiške doline. Uporabili smo dve vrsti ekološko različnih deževnikov, epigeični vrsti *Eisenia fetida* in *Lumbricus rubellus* ter endogeično vrsto *Octolasion tyrtaeum*. Vpliv deževnikov na remediirana tla smo ocenili s primerjavo mobilnosti in biodosegljivosti Pb in Zn v njihovih iztrebkih glede na remediirana in neremediirana začetna tla. S primerjavo smo ugotavljali vrstno specifičnost vpliva deževnikov na te procese. Znano je, da se deževniki razlikujejo med seboj tako fiziološko kot tudi ekološko in imajo na tla različen vpliv.

Han in sod. (2003) so v raziskavi prišli do sklepa, da proces staranja prerazporedi težke kovine iz biodosegljivih talnih frakcij v bolj stabilno in manj biodosegljivo obliko. Naši rezultati pa so v nasprotju s Hanovo ugotovitvijo, saj kažejo na to, da aktivnost deževnikov v sveže remediiranih tleh prerazporedi težke kovine v nasprotni smeri, torej iz bolj stabilne, manj mobilne in manj biodosegljive oblike, v bolj dosegljive oblike. Z našimi raziskavami smo ugotovili, da se je zaradi aktivnosti deževnikov v tleh učinek remediacije zmanjšal in v nekaterih primerih celo izničil.

Rezultati naše raziskave jasno kažejo, da se lahko težke kovine v tleh pred in po remediaciji tal prerazporedijo in spremenijo svojo toksičnost zaradi vpliva biotičnih dejavnikov (deževnikov). Potrebne so še dodatne raziskave za zadostno razumevanje teh procesov in za oblikovanje metod, ki bi ocenile njihove vplive. Te metode bi morali

uporabiti kot del načrta za ocenjevanje tveganja (risk assessment) težkih kovin po remediaciji tal.

## 7 VIRI

- Bačac N. 2005. Vpliv nekaterih talnih lastnosti na frakcionacijo svinca in cinka v onesnaženih tleh Celjske regije. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 48 str.
- Bohlen P.J. 2002. Earthworms. V: Encyclopedia of Soil Science. R. Lal (ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 370–373
- Boyle K.E., Curry J.P., Farrell E.P. 1997. Influence of earthworms on soil properties and grass production in reclaimed cutover peat. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 20–26
- Cao X., Chen Y., Wang X., Deng X. 2001. Effects of redox potential and pH value on the release of rare earth elements from soil. *Chemosphere*, 44: 655–661
- Cheng J., Wong M.H. 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 36: 72–78
- Dai J., Becquer T., Rouiller J.H., Reversat G., Bernhard-Reversat F., Nahmani J., Lavelle P. 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 91–98
- Davis S., Mirick D.K. 2006. Soil ingestion in children and adults in the same family. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 16: 63–75
- Domy C. A. 2001. Trace elements in terrestrial environments; Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2. izdaja. New York, Springer-Verlag: 867 str.
- Edwards C.A., Bohlen P.J. 1996. Biology and ecology of earthworms. 3. izdaja. London, Chapman and Hall: 426 str.
- Finžgar N., Leštan D. 2006a. Advanced oxidation for treatment of aqueous extracts from EDTA extraction of Pb and Zn contaminated soil. *Jurnal of environmental engineering*, 132: 1376–1380
- Finžgar N., Leštan D. 2006b. Heap leaching of Pb and Zn contaminated soil using ozone/UV treatment of EDTA extractants. *Chemosphere*, 63: 1736–1743
- Finžgar N., Leštan D. 2007. Multi-step leaching of Pb and Zn contaminated soils with EDTA. *Chemosphere*, 66: 824–832
- Ge Y., Murray P., Hendershot W.H. 2000. Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, 107: 137–144

- Han F.X., Banin A., Kingery W.L., Triplett G.B., Zhou L.X., Zheng S.J., Ding W. X. 2003. New approach to studies of heavy metal redistribution in soil. *Advances in Environmental Research*, 8: 113–120
- Janssen M.P.M., Hogervorst R.F. 1993. Metal accumulation in soil arthropods in relation to micro-nutrients. *Environmental Pollution*, 79: 181–189
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 1992. Trace elements in soil and plants. 3.izdaja. Pulawy, Poland, Institute of soil science: 432 str.
- Kabala C., Singh B.R. 2001. Fractionation and mobility of copper, lead and zinc in soil profiles in the vicinity of copper smelter. *Journal of Environmental Quality*, 30: 485–492
- Langdon C.J., Pearce T.G., Meharg A.A., Semple K.T. 2001. Survival and behavior of the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrodrilus rubidus* from arsenate-contaminated and non-contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1239–1244
- Lazarini F., Brenčič J. 2004. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, Stanislav Kupelj s.p.: 557 str.
- Lee K.E. 1985. Earthworms, Their ecology and relationships with soils and land use. Sydney, Academic press: 410 str.
- Leštan D., Grčman H., Zupan M., Bačac N. 2003. Relationship of soil properties to fractionation of Pb and Zn in soil and their uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination*, 12, 4: 507–522
- Leštan D. 2002. Ekopedologija Študijsko gradivo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 277 str.
- Li X., Thornton I. 2001. Chemical partitioning of trace and major elements in soil contaminated by mining and smelting activities. *Applied Geochemistry*, 16: 1693–1706
- 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
- Maiz I., Arambarri I., Garcia R., Millan E. 2000. Evaluation of heavy metal availability in polluted soils by two sequential extraction procedures using factor analysis. *Environmental Pollution*, 110: 3–9



- Morgan J.E., Morgan A.J. 1992. Heavy metal concentrations in the tissues, ingesta and faeces of ecophysiologicaly different earthworm species. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 1691–1697
- Morgan J.E., Morgan A.J. 1999. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology*, 13: 9–20
- Mršič N. 1997. Živali naših tal. Ljubljana, Tehniška Založba Slovenije: 416 str.
- Nowack B., Rainer S., Brett H.R. 2006. A critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environmental Science and Tehnology*, 40: 5225–5232
- Pichtel J., Vine B., Kuula-Vaisanen P., Niskanen P. 2001. Lead extraction from soils as affected by lead chemical and mineral forms. *Environmental Engineering Science*, 18: 91–98
- Rivero V.C., Masedo M.D., De la Villa R.V. 2000. Effect of soil properties on zinc retention in agricultural soils. *Agrochimica*, 43: 46–54
- 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
- Spurgeon D.J., Hopkin S.P. 1999. Comparison of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology*, 11: 227–243
- Udovič M., Leštan D. 2006. EDTA leaching of Cu contaminated soils using ozone/UV for treatment and reuse of washing solution in a closed loop. *Water, Air and Soil Pollution*, 181: 319–327
- Udovič M., Plavc Ž., Leštan D. 2007. The effect of earthworms on the fractionation and bioavailability of heavy metals before and after remediation. *Environmental Pollution*, doi 10.1016/j.chemosphere.207.06.044
- US EPA. Test methods for evaluation of solid waste, vol. IA. Laboratory manual physical/chemical methods, SW 86, 40 CFR Parts 403 and 503. 1995. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, DC, US Government Printing Office.
- Weltje L. 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, 36: 2643–2660

- Wen B., Hu X-y., Liu Y., Wang W-s., Feng M-h., Shan X-q. 2004. The role of earthworms (*Esenia fetida*) on influencing bioavailability of heavy metals in soils. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 181–187
- Wen B., Liu Y., Hu X.-yu, Shan X.-quan. 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere*, 63: 1179–1186
- Zorn M.I., Van Gestel C.A.M., Eijssackers H. 2005. The effect of two endogeic earthworm species on zinc distribution and availability in artificial soil columns. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 917–925

## ZAHVALA

Iskreno se zahvalujem prof. dr. Domnu Leštanu za ponujeno možnost, strokovne nasvete in mentorsko spodbudo. Z delom v laboratoriju sem pridobila veliko novega znanja in odkrila zame novo področje v agronomiji, ki me izredno zanima in na katerem bom delala še naprej. Dana možnost in pridobljene izkušnje mi izredno veliko pomenijo in so zame neprecenljive.

Posebej in iskreno bi se rada zahvalila asist. Metki Udovič, univ. dipl. biol., ki mi je ves čas stala ob strani in pri samem delu ogromno pomagala in mi odkrila vse tiste male skrivnosti, zaradi katerih je bilo delo v laboratoriju lažje in zabavnejše.

Vsem sodelavcem na katedri, centru za pedologijo in varstvo okolja bi se rada zahvalila za dobro delovno vzdušje, zaradi katerega se bom vedno rada vračala k vam.

## PRILOGA A

Izbrane lastnosti tal in celokupne koncentracije Pb in Zn v srednje onesnaženih tleh pred in po remediaciji tal. Rezultati remediiranih tal so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

	Pedološka analiza							Težke kovine		
	pH	Organska snov (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (%)	CEC (mmol C <sup>+</sup> 100g <sup>-1</sup> )	Pesek (%)	Melj (%)	Glina (%)	Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
Pred remediacijo	6,6	6,2	51,9	2,48	24,3	47	39	14	1504	1285
Po remediaciji	7,2±0,1	7,8±2,1	63±10,3	2,32±0,47	25,3±0,9	49±2	38±2	13±1	905±33	1206±38

## PRILOGA B

Izbrane lastnosti visoko onesnaženih tal pred in po remediaciji. Rezultati remediiranih in neremediiranih tal so podani, kjer je bilo to mogoče, kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

### Pedološka analiza

	Organska snov (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (%)	CEC (mmol C <sup>+</sup> 100g <sup>-1</sup> )	Pesek (%)	Melj (%)	Glina (%)
Pred remediacijo	9,1	130,3	20,2	27,6	43,1	47,2	9,7
Po remediaciji	8,8 ± 0,2	145,9 ± 10,3	17,2 ± 0,6	31,6 ± 0,6	41,2 ± 0,8	49,5 ± 0,9	9,3 ± 0,4

## PRILOGA C

Celokupna vsebnost Pb in Zn, pH vrednosti in koncentracija Pb in Zn v ekstrakcijski raztopini TCLP pred in po remediaciji visoko onesnaženih začetnih tal ter v iztrebkih deževnikov vrste *Eisenia fetida* in *Octolasion tyrtaeum*, proizvedenih v neremediiranih in remediiranih tleh.

<b>CELOTNA KONCENTRACIJ A</b>	PRED REMEDIACIJO			PO REMEDIACIJI		
	Ø	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Octolasion tyrtaeum</i>	Ø	<i>Eisenia fetida</i>	<i>Octolasion tyrtaeum</i>
Celotni Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> 4528,7 ± 142,8	<sup>c</sup> 5708,4 ± 54,2	<sup>b</sup> 4827,9 ± 86,7	<sup>a</sup> 1884,9 ± 41,7	<sup>a</sup> 1900,3 ± 128,0	<sup>a</sup> 1923,6 ± 53,8
Celotni Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> 2541,6 ± 47,4	<sup>a</sup> 2515,3 ± 50,2	<sup>b</sup> 2220,4 ± 22,5	<sup>a</sup> 2119,5 ± 104,3	<sup>a</sup> 2019,7 ± 83,1	<sup>b</sup> 1544,0 ± 96,2
Celotni Ca (mg kg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> 48706,0 ± 68,0	<sup>ab</sup> 51521,5 ± 1149,9	<sup>b</sup> 52323,7 ± 2234,2	<sup>a</sup> 46196,1 ± 1260,2	<sup>c</sup> 51032,5 ± 195,8	<sup>b</sup> 49243,5 ± 742,7
<b>pH</b>	<sup>a</sup> 6,38 ± 0,13	<sup>a</sup> 6,75 ± 0,08	<sup>a</sup> 6,32 ± 0,19	<sup>a</sup> 7,02 ± 0,09	<sup>b</sup> 7,20 ± 0,02	<sup>a</sup> 6,97 ± 0,08
<b>TCLP</b>						
Pb (mg L <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> 1,66 ± 0,06	<sup>a</sup> 1,91 ± 0,40	<sup>a</sup> 2,04 ± 0,03	<sup>a</sup> 0,27 ± 0,05	<sup>b</sup> 1,67 ± 0,47	<sup>a</sup> 0,21 ± 0,02
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> 3,05 ± 0,57	<sup>a</sup> 3,68 ± 0,60	<sup>a</sup> 3,81 ± 0,80	<sup>a</sup> 0,60 ± 0,11	<sup>a</sup> 0,84 ± 0,25	<sup>a</sup> 0,73 ± 0,16

Plavc Ž. Frakcionacija in biodosegljivost svinca in cinka v glistinah deževnikov pred in po remediaciji tal.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2007

---

Črke nad povprečji (a, b) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test ( $p < 0,05$ )).

## PRILOGA D

Frakcionacija Pb pred in po remediaciji srednje onesnaženih tal in v iztrebkih deževnikov vrste *Lumbricus rubellus* in *Esenia fetida*.  
Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

Frakcionacija (%)	Pred remediacijo			Po remediaciji		
	Tla	<i>L. rubellus</i> (iztrebki)	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	Tla	<i>L. rubellus</i> (iztrebki)	<i>E. fetida</i> (iztrebki)
V talni raztopini	<sup>a</sup> 0,02 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,04 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,23 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,07 ± 0,07	<sup>a</sup> 0,03 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,34 ± 0,00
Izmenljiva	<sup>a</sup> 0,13 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,11 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,04 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,03 ± 0,02	<sup>a</sup> 0,04 ± 0,03	<sup>a</sup> 0,01 ± 0,01
Vezana na karbonate	<sup>a</sup> 21,8 ± 1,0	<sup>a</sup> 20,4 ± 1,5	<sup>a</sup> 22,5 ± 0,8	<sup>a</sup> 16,8 ± 0,9	<sup>a</sup> 16,2 ± 0,7	<sup>a</sup> 17,4 ± 0,6
Vezana na Fe- in Mn-oksidi	<sup>a</sup> 0,43 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,47 ± 0,03	<sup>a</sup> 0,45 ± 0,03	<sup>a</sup> 0,39 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,31 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,31 ± 0,03
Vezana na organsko snov	<sup>a</sup> 62,6 ± 1,0	<sup>a</sup> 71,4 ± 6,7	<sup>a</sup> 65,5 ± 2,0	<sup>a</sup> 67,9 ± 6,0	<sup>a</sup> 66,2 ± 2,6	<sup>a</sup> 66,9 ± 4,7
Residiumov	<sup>a</sup> 14,9 ± 0,9	<sup>a</sup> 13,8 ± 1,9	<sup>b</sup> 11,3 ± 0,4	<sup>a</sup> 14,7 ± 1,4	<sup>a</sup> 17,2 ± 1,9	<sup>a</sup> 15,1 ± 1,8
Recovery (%)	86,7	89,5	84,9	95,0	96,3	89,5

Črke nad povprečji (a, b) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test ( $p < 0,05$ )).



## PRILOGA E

Frakcionacija Zn pred in po remediaciji srednje onesnaženih tal in v iztrebkih deževnikov vrste *Lumbricus rubellus* in *Eisenia fetida*.

Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

Frakcionacija (%)	Pred remediacijo			Po remediaciji		
	Tla	<i>L. rubellus</i> (iztrebki)	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	Tla	<i>L. rubellus</i> (iztrebki)	<i>E. fetida</i> (iztrebki)
V talni raztopini	<sup>a</sup> 0,01±0,00	<sup>a</sup> 0,01±0,00	<sup>a</sup> 0,01±0,00	<sup>a</sup> 0,11±0,05	<sup>b</sup> 0,03±0,01	<sup>b</sup> 0,02±0,00
Izmenljiva	<sup>a</sup> 0,35±0,01	<sup>b</sup> 0,2±0,15	<sup>c</sup> 0,21±0,02	<sup>a</sup> 0,1±0,01	<sup>b</sup> 0,06±0,00	<sup>b</sup> 0,05±0,0
Vezana na karbonate	<sup>a</sup> 5,08±0,24	<sup>ab</sup> 5,3±0,31	<sup>b</sup> 5,78±0,24	<sup>a</sup> 2,26±0,18	<sup>b</sup> 2,94±0,19	<sup>b</sup> 2,82±0,7
Vezana na Fe- in Mn-oksidi	<sup>a</sup> 2,25±0,05	<sup>a</sup> 2,31±0,42	<sup>a</sup> 2,77±0,27	<sup>a</sup> 1,03±0,07	<sup>b</sup> 1,39±0,13	<sup>b</sup> 1,31±0,08
Vezana na organsko snov	<sup>a</sup> 12,5±1,8	<sup>a</sup> 15,3±2,0	<sup>a</sup> 15,6±1,5	<sup>a</sup> 10,6±0,3	<sup>b</sup> 15,4±1,1	<sup>ab</sup> 14,4±2,7
Residiumov	<sup>a</sup> 79,8±1,2	<sup>a</sup> 76,9±6,0	<sup>a</sup> 75,6±7,5	<sup>a</sup> 81,3±4,7	<sup>a</sup> 80,2±8,8	<sup>a</sup> 81,4±10,8
Recovery (%)	114,7	71,4	107,8	137,9	86,7	127,1

Črke nad povprečji (a, b) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test ( $p < 0,05$ )).

## PRILOGA F

Frakcionacija Pb v visoko onesnaženih tleh pred remediacijo in po njej ter v iztrebkih deževnikov vrste *Eisenia fetida* in *Octolasion tyrraeum*, proizvedenih v teh tleh.  
Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

Frakcionacija (%)	Pred remediacijo			Po remediaciji		
	Tla	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	<i>O. tyrraeum</i> (iztrebki)	Tla	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	<i>O. tyrraeum</i> (iztrebki)
V talni raztopini	<sup>b</sup> 0,05 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,08 ± 0,00	<sup>c</sup> 0,02 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,01 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,17 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,03 ± 0,02
Izmenljiva	<sup>a</sup> 0,21 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,20 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,25 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,02 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,00 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,03 ± 0,00
Vezana na karbonate	<sup>a</sup> 24,4 ± 1,0	<sup>a</sup> 25,0 ± 0,9	<sup>b</sup> 28,9 ± 3,0	<sup>a</sup> 9,2 ± 0,7	<sup>b</sup> 16,9 ± 1,4	<sup>c</sup> 19,0 ± 0,6
Vezana na Fe- in Mn-oksidi	<sup>a</sup> 0,42 ± 0,04	<sup>a</sup> 0,44 ± 0,03	<sup>b</sup> 0,36 ± 0,00	<sup>a</sup> 0,19 ± 0,03	<sup>b</sup> 0,24 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,26 ± 0,02
Vezana na organsko snov	<sup>a</sup> 65,1 ± 3,7	<sup>a</sup> 66,8 ± 1,0	<sup>b</sup> 56,9 ± 1,5	<sup>a</sup> 76,3 ± 5,5	<sup>ab</sup> 70,1 ± 2,2	<sup>b</sup> 63,8 ± 4,3
Residuumov	<sup>ab</sup> 9,8 ± 1,1	<sup>a</sup> 7,6 ± 0,4	<sup>b</sup> 13,6 ± 2,7	<sup>a</sup> 14,3 ± 0,8	<sup>a</sup> 12,7 ± 1,5	<sup>b</sup> 16,9 ± 1,8
Recovery (%)	104,0	78,3	86,7	92,8	96,3	93,0

Črke nad povprečji (a, b) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test ( $p < 0,05$ )).

## PRILOGA G

Frakcionacija Zn v visoko onesnaženih tleh pred remediacijo in po njej ter v iztrebkih deževnikov vrste *Eisenia fetida* in *Octolasion tyrtaeum*, proizvedenih v teh tleh.  
Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh ponovitev s standardnim odklonom.

Frakcionacija (%)	Pred remediacijo			Po remediaciji		
	Tla	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	<i>O. tyrtaeum</i> (iztrebki)	Tla	<i>E. fetida</i> (iztrebki)	<i>O. tyrtaeum</i> (iztrebki)
V talni raztopini	<sup>a</sup> 0,02 ± 0,01	<sup>ab</sup> 0,05 ± 0,03	<sup>b</sup> 0,07 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,05 ± 0,01	<sup>a</sup> 0,04 ± 0,01	<sup>b</sup> 0,02 ± 0,01
Izmenljiva	<sup>a</sup> 1,59 ± 0,05	<sup>b</sup> 1,00 ± 0,03	<sup>a</sup> 1,63 ± 0,06	<sup>a</sup> 0,03 ± 0,02	<sup>ab</sup> 0,04 ± 0,02	<sup>b</sup> 0,07 ± 0,01
Vezana na karbonate	<sup>a</sup> 12,8 ± 1,4	<sup>b</sup> 9,5 ± 0,4	<sup>ab</sup> 10,9 ± 1,0	<sup>a</sup> 3,6 ± 0,3	<sup>a</sup> 3,1 ± 0,2	<sup>b</sup> 4,2 ± 0,3
Vezana na Fe- in Mn-oksidi	<sup>a</sup> 4,0 ± 0,1	<sup>b</sup> 3,1 ± 0,1	<sup>b</sup> 2,9 ± 0,1	<sup>a</sup> 1,2 ± 0,1	<sup>a</sup> 1,1 ± 0,1	<sup>b</sup> 0,8 ± 0,1
Vezana na organsko snov	<sup>a</sup> 34,3 ± 2,8	<sup>b</sup> 24,6 ± 3,1	<sup>b</sup> 26,3 ± 0,6	<sup>a</sup> 27,6 ± 7,3	<sup>a</sup> 25,5 ± 2,7	<sup>a</sup> 24,7 ± 1,2
Residuumov	<sup>a</sup> 55,5 ± 0,7	<sup>a</sup> 51,7 ± 2,2	<sup>a</sup> 58,8 ± 3,6	<sup>a</sup> 67,6 ± 3,1	<sup>a</sup> 70,2 ± 8,2	<sup>a</sup> 70,2 ± 5,2
Recovery (%)	83,7	80,1	87,6	87,4	71,5	98,1

Črke nad povprečji (a, b) označujejo statistično značilne razlike (Duncanov test ( $p < 0,05$ )).