

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Saša PLESTENJAK

**UPORABA BIOLOŠKO RAZGRADLJIVEGA
LIGANDA IN HIDROGELA PRI INDUCIRANI
FITOEKSTRAKCIJI SVINCA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Saša PLESTENJAK

**UPORABA BIOLOŠKO RAZGRADLJIVEGA LIGANDA IN
HIDROGELA PRI INDUCIRANI FITOEKSTRAKCIJI SVINCA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**USE OF BIODEGRADABLE CHELANT ([S,S]-EDDS) AND
HYDROGEL FOR INDUCED PHYTOEXTRACTION OF LEAD**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija Agronomije. Izdelano je bilo na Katedri za pedologijo in varstvo okolja Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poizkus je bil izveden v rastlinjaku, kemijske analize pa v laboratoriju katedre za Pedologijo in varstvo okolja.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Domna LEŠTANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora: 31. julij 2007

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo 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.

Plestenjak Saša

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 631.453:546.815:502.175:504.5(043.2)
KG onesnaženost tal/težke kovine/fitoekstrakcija/fitoremediacija/svinec/ligandi/EDDS
KK AGRIS P01/P30/T01
AV PLESTENJAK, Saša
SA LEŠTAN, Domen (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2007
IN UPORABA BIOLOŠKO RAZGRADLJIVEGA LIGANDA IN HIDROGELA PRI INDUCIRANI FITOEKSTRAKCIJI SVINCA
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 38, [4] str., 6 pregl., 15 sl., 3 pril., 68 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Kopičenje težkih kovin v tleh kot posledica različnih človekovih dejavnosti, je čedalje večji problem za okolje in človeško zdravje. Fitoekstrakcija je ena izmed metod remediacije tal, s katero se iz tal odstranjuje težke kovine. Poteka s pomočjo rastlin, ki imajo sposobnost črpanja težkih kovin iz tal. V kolonskem poskusu smo preučevali fitoekstrakcijo tal iz Mežiške doline, ki so vsebovala 1100 mg Pb kg⁻¹ tal in s testno rastlino kitajski kapus (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*). Proučevali smo tudi potencialno nevarnost za izpiranje svinca (Pb) ob dodajanju biorazgradljivega liganda. Z dodajanjem različnih koncentracij [S,S] izomere etilen diamin disukcinata (EDDS) smo povečali mobilnost Pb v tleh in s tem tudi njegovo biološko dostopnost. Z dodajanjem akrilamidnega hidrogela tlem pa smo poskušali povečati sposobnost tal za zadrževanje vode in s tem povečati učinek fitoekstrakcije. Dodatek hidrogela je povečal poljsko kapaciteto tal za vodo iz začetne 24,6% na 28,5% pri dodatku 0,1% oz. na 31,3% pri dodatku 0,2% hidrogela. Pri obravnavanju z 10 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS in dodanim hidrogelom je bil sprejem Pb v rastlino znatno manjši, medtem ko smo dosegli visoko stopnjo izpiranja Pb ne glede na sorptivno kapaciteto tal. Iz tal se je izpralo 44,2% vsega Pb. Pri nižjih koncentracijah dodanega [S,S]-EDDS je bil učinek hidrogela na izpiranje ravno nasproten. Dodatek 5 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS in 0,2% hidrogela je povečal odvzem Pb za 18-krat, izpranega pa je bilo le 0,2% vsega Pb. Pri vseh obravnavanjih so bile koncentracije Pb v nadzemnih delih rastlin veliko nižje, kot bi bilo potrebno za učinkovito remediacijo tal v sprejemljivem časovnem obdobju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 631.453:546.815:502.175:504.5(043.2)
- CX contaminated soil/heavy metals/phytoextraction/phytoremediation/lead/chelates/
EDDS
- CC AGRIS P01/P30/T01
- AU PLESTENJAK, Saša
- AA LEŠTAN, Domen (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PY 2007
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- TI USE OF BIODEGRADABLE CHELANT ([S,S]-EDDS) AND HYDROGEL FOR
INDUCED PHYTOEXTRACTION OF LEAD
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 38, [4] p., 6 tab., 15 fig., 3 ann., 68 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Accumulation of heavy metals in soil as a result of different human activities has become a serious worldwide environmental and human health problem. Phytoextraction is one of soil remediation techniques which exploit plants capable of accumulating heavy metals in their harvestable parts. In a soil column experiment, we studied the effectiveness of phytoextraction, employing heavily contaminated soil from Mežica valley with 1100 mg Pb kg⁻¹ and Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*) as a test plant. We also studied potential risk of lead (Pb) leaching through the soil profile while biodegradable chelant was added. With addition of different concentrations of biologically degradable chelant [S,S] isomere of ethylenediamine disuccinate (EDDS), we increased the mobility of Pb in the soil and its biological availability. We tried to modify soil water sorption characteristics by addition of acrylamide hydrogel. The additions of 0.1% and 0.2% (w/w) of hydrogel increased soil field water capacity from initial 24.6% to 28.5% and 31.3% respectively. In treatments with 10 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS hydrogel amended soils, plant Pb uptake was significantly reduced and Pb leaching was as high as 44.2% of total initial soil Pb. At lower [S,S]-EDDS concentrations, the effect of hydrogel soil amendment on Pb leaching was opposite. The addition of 5 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS to the soil amended with 0.2% hydrogel increased Pb uptake by 18 times while only 0.2% of total initial Pb was leached. In all treatments, the concentrations of Pb in dry plant biomass were far from concentrations required for efficient soil remediation within a reasonable time span.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 POVOD ZA IZDELAVO NALOGE	2
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 HIPOTEZA	2
2 TEORETSKE OSNOVE	3
2.1 TLA	3
2.1.1 Onesnaženost tal	3
2.1.2 Mejne in kritične imisijske vrednosti snovi v tleh	6
2.2 TEŽKE KOVINE V TLEH IN NJIHOVA DOSTOPNOST	7
2.2.1 Odpornost rastlin na težke kovine	9
2.3 ČIŠČENJE OZ. REMEDIACIJA ONESNAŽENIH TAL	10
2.3.1 Fitoremediacija	11
2.3.2 Fitoekstrakcija težkih kovin	12
2.3.2.1 Kontinuirana fitoekstrakcija	13
2.3.2.2 Inducirana fitoekstrakcija	14
2.3.2.3 Kelatni ligandi	14
2.4 HIDROGELI	17
3 MATERIALI IN METODE DELA	20
3.1 LASTNOSTI TAL	20
3.2 TESTNA RASTLINA IN GNOJENJE	20
3.3 LIGAND	21
3.4 ZASNOVA IN POSTAVITEV POSKUSA	21
3.5 ANALITSKE METODE	23
3.5.1 Analiza svinca v tleh – kislinski razklop	23
3.5.2 Analiza svinca v rastlinah – kislinski razklop	23
3.5.3 Analiza svinca v odcednih vodah	23

3.5.4	Statistična analiza	23
4	REZULTATI IN DISKUSIJA	24
4.1	RAST IN RAZVOJ RASTLIN	24
4.2	MODIFIKACIJA SORPTIVNE KAPACITETE TAL ZA VODO Z DODATKOM HODROGELA	25
4.3	VSEBNOST SVINCA V ZELENIH DELIH TESTNE RASTLINE	26
4.4	DINAMIKA IZPIRANJA SVINCA V IZCEDNIH VODAH	28
5	SKLEPI	31
6	POVZETEK	32
7	VIRI	33
7.1	CITIRANI VIRI	33
7.2	OSTALI VIRI	38
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti nevarnih snovi v tleh (Uredba ..., 1996).	6
Preglednica 2: Stroški različnih metod remediacije s TK onesnaženih tal (Mulligan in sod., 2001; Cunningham in Berti, 1999)	11
Preglednica 3: Vsebnost svinca in nekatere osnovne pedološke lastnosti tal, ki smo jih uporabili v poskusu.	20
Preglednica 4: Povprečja koncentracij Pb in delež Pb v listih kitajskega zelja.	27
Preglednica 5: Povprečne mase izpranega svinca po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda, absolutna masa svinca ter masa preostalega svinca v koloni.	29
Preglednica 6: Odstotki skupnega izpranega svinca po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda ter totalni delež izpranega svinca.	30

KAZALO SLIK

Slika 1:	Vsebnost svinca (Pb mg kg ⁻¹ s.s.) v zgornjem sloju tal (0-5 cm ali 0-20 cm) (Zupan, 2005).	5
Slika 2:	Legenda tematske karte tal onesnaženih s Pb, vrednosti so v mg kg ⁻¹ zračno suhih tal; upoštevane so mejna, opozorilna in kritična imisijska vrednost glede na slovensko zakonodajo (Uredba..., 1996).	5
Slika 3:	Biološka dosegljivost Pb je odvisna od mineralne oblike v kateri se nahaja v tleh, velikosti delcev in strukturne vezave z drugimi minerali, glino in organsko snovjo tal. Te pojavne oblike so odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti tal (Leštan, 1999).	8
Slika 4:	Glavne poti in procesi kroženja kovin v sistemu tla – talna voda –rastline.	9
Slika 5:	Procesi, vključeni v postopek fitoekstrakcije onesnažil iz tal (Cunningham in sod., 1995)	13
Slika 6:	Struktura EDDS, ki nam kaže kiralna ogljikova atoma (z rdečo); obadva morata biti S; l-aspartna kislina pa je obdana z zelenimi pikami (University of Bristol, School of Chemistry, 2007).	16
Slika 7:	Strukturne formule različnih prostorskih izomer EDDS (Jaworska in sod., 1999)	16
Slika 8:	Strukturna formula akrilamida in poliakrilamida (Polyacrylates, 2007)	18
Slika 9:	Stockosorb v suhem stanju v obliki granul (Zaleznik, 2002).	18
Slika 10:	Stockosorb hidrogel v nabreklem stanju po namakanju v vodi (Zaleznik, 2002).	19
Slika 11:	Kolonski poskus v rastlinjaku CPVO na Biotehniški fakulteti. Vse testne rastline so pred dodatkom liganda EDDS.	22
Slika 12:	Učinek različnih koncentracij odmerkov EDDS na kitajski kapus.	24
Slika 13:	Odmiranje listov testne kastline, kateri smo dodali 10 mmol EDDS.	25

Slika 14: Koncentracije Pb akumuliranega v nadzemnih rastlinskih tkivih kitajskega kapusa, kot odziv na dodajanje 0, 2,5, 5 in 10 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS. 27

Slika 15: Odstotek začetnega skupnega izpranega Pb v prvih štirih tednih po dodatku liganda. Od leve proti desni kontrola, 2,5, 5 in 10 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS. 29

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Volumi odcednih vod, ki smo jih zbirali v 1,5 l plastenke po dveh tednih in po štirih tednih po dodatku liganda EDDS.
- Priloga B: Masa zračno suhe, zelene snovi rastlin ter vsebnost svinca (mg) v nadzemnih delih kitajskega kapusa.
- Priloga C: Mase izpranega svinca po posameznih kolonah, po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda ter absolutna masa izpranega svinca.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CPVO	Center za pedologijo in varsvo okolja
EDDS	etilen diamin disukcinat
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
FAAS	plamenska atomska absorpcijska spektrofotometrija
konc.	koncentracija
npr.	na primer
oz.	oziroma
Pb	svinec
pH	Negativni logaritem koncentracije vodikovih [H ⁺] ionov v neki raztopini. Izraža mero za kislost ali bazičnost vodnih raztopin.
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki (polycyclic aromatic hydrocarbons)
POP	težko razgradljiva organska onesnažila (persistent organic pollutants)
s.d.	standardna deviacija
s.s.	suha snov
TK	težke kovine
€	valuta Evropske Unije; euro
US\$	ameriški dolar
var.	varietas

1 UVOD

Posledica industrializacije, urbanizacije, ter razvoja kmetijstva z intenzivnim načinom pridelave so tla onesnažena z visokimi koncentracijami strupenih snovi. Primarne vire takega onesnaževanja predstavljajo izgorevanje fosilnih goriv, taljenje rud, uporaba sintetičnih fitofarmaceutskih pripravkov in umetnih gnojil, odpadna blata in gošče komunalnih čistilnih naprav, promet, emisije kemijske in druge industrije (Leštan in sod. 2003). Velika področja sicer rodovitnih tal, so zaradi visokih koncentracij škodljivih snovi, postala neuporabna za kmetijsko rabo.

Onesnaženje tal s težkimi kovinami (TK) je v Evropski Uniji in njenih sosednjih državah zelo razširjeno in čeprav območje ni točno določeno, je ocenjeno da zavzema nekaj milijonov hektarov (Flathman in Lanza, 1998). Zaradi rudniško-topilniške dejavnosti je v Sloveniji prizadetih kar nekaj območji, vendar se bom jaz osredotočila samo na zgornjo Mežiško dolino, kjer je več kot 300 let deloval rudnik svinčeve rude in topilnica. Tla v dolini, vključno s 6600 ha obdelovalne zemlje so onesnažena predvsem s svincem (Pb), pa tudi s cinkom (Zn) in kadmijem (Cd). Leta 1990 se je rudarjenje in taljenje svinčeve rude prenehalo, a se je pričelo recikliranje starih avtomobilskih akumulatorjev. Trenutno sta v Mežiški dolini poznana dva glavna vira onesnaževanja: topilnica svinčeve in cinkove rude v Žerjavu ter odlagališče žlindre in plastičnih delov akumulatorjev v Glančniku (Leštan in Grčman, 2001). Za območje zgornje Mežiške doline velja, da se je predvsem v preteklosti del kovin izplavljalo nizvodno kar je katastrofalno vplivalo na tamkajšnjo naravo. Povečano vsebnost Zn, Pb in Cd pa je zaslediti tudi jugovzhodno od Maribora, koncentracije teh TK tudi za sto krat presegajo dovoljene koncentracije (Zupan, 1999). Po nekaj desetletjih sta se splošno stanje in kvaliteta zraka in voda res nekoliko izboljšali, a TK so se zaradi svoje kemijske obstojnosti in izredno trdne vezave na talne delce v tleh kopičile. Ob glavnih cestah, predvsem na območju večjih mest, kjer promet ni tekoč, zasledimo povečano vsebnost svinca v tleh zaradi emisij prometa (Vidic in sod., 1997).

TK so eden najpogostejših agensov, ki ogrožajo zdravje živih organizmov, saj lahko v telo vstopajo preko različnih poti; s hrano (npr. poljščine pridelane na onesnaženih tleh), z zaužitjem tal ali inhalacijo prahu. V organizem vstopajo v koncentracijah, ki niso škodljive, vendar pa se sčasoma akumulirajo do visokih toksičnih vsebnosti. Prav tako so na TK v tleh občutljivi talni organizmi, ki so vitalno pomembni za zdravje in kakovost tal. Zato se lahko zgodi, da visoke koncentracije TK zmanjšajo biološko raznolikost tal.

Remediacija oz. čiščenje onesnaženih tal s TK je nujno potrebna operacija v postopku rehabilitacije onesnaženih območij, žal pa je dolgotrajna (odvisno od tehnike čiščenja) in tudi zelo draga operacija, saj lahko cena preseže 1 milijon €ha⁻¹. Ocenjuje se, da se samo v Veliki Britaniji nahaja 100 000 območij onesnaženih s TK, v sosednji Avstriji pa 30 000 območij in približno 1 400 000 območij v Evropski Uniji (Puschenreiter, 2003). Približen znesek za remediacijo območij v Veliki Britaniji znese okoli 13-30 milijard US\$, v celotni Evropski Uniji pa se ocenjuje znesek od 180 - 420 milijard US\$ (Lombi, 2001). Pri tem niso bila upoštevana gotovo še številna območja vzhodne Evrope.

1.1 POVOD ZA IZDELAVO NALOGE

Na Centru za pedologijo in varstvo okolja (CPVO), Biotehniške fakultete v Ljubljani se že nekaj let ukvarjajo z raziskavami in razvojem metod, ki omogočajo zmanjšanje ekotoksikološkega tveganja z zmanjševanjem biodosegljivosti onesnažil. Fitoremediacija je ena izmed teh metod remediacije onesnaženih tal, ki je razmeroma nova, cenejša od ostalih metod in tlem »prijazna«.

V te raziskave se vključuje tudi ta diplomska naloga, ki obravnava vpliv dodajanja različnih koncentracij biološko razgradljivega liganda ter hidrogela na fitoekstrakcijo Pb.

1.2 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil ovrednotiti učinkovitost fitoekstrakcije oz. mobilizacije Pb z uporabo različnih koncentracij biološko razgradljivega kovinskega liganda etilen diamin disukcinata (EDDS) in akrilamidnega hidrogela. Uporabili smo kolone s porušenim talnim profilom v katere smo dodali hidrogel. Spremljali smo sprejem Pb v testno rastlino kitajski kapus (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*) in izpiranje Pb skozi talni profil v lovilne posode. Ob tem smo želeli ugotoviti potencialno nevarnost za izpiranje Pb-kelatnega kompleksa iz talnega profila v podtalnico.

1.3 HIPOTEZA

Hipoteze naše raziskave so bile sledeče:

- Ø Z dodajanjem kovinskih ligandov v tla onesnažena s Pb se poveča njegova biološka dostopnost in akumulacija v testno rastlino.
- Ø Biorazgradljiv ligand EDDS je možno uporabljati za okoljsko varno inducirano fitoekstrakcijo, ker je mikrobiološko razgradljiv je s tem manj obstojen in nevaren za izpiranje TK, kot že prej preizkušeni sintetični ligandi (npr. EDTA).
- Ø Z dodatkom akrilamidnega hidrogela Stockosorb tlem, lahko dosežemo počasnejše sproščanje EDDS, kar lahko še omeji spiranje Pb iz tal in ga obenem naredi bolj dostopnega rastlinam.

2 TEORETSKE OSNOVE

2.1 TLA

Tla so površinski del litosfere, ki ga sestavljajo mineralne in organske snovi, voda, zrak in organizmi (Uredba..., 1996). Tla vsebujejo sistem mikro, makro in mezo por, ki lahko sprejemajo vodo in/ali zrak. Tla nastajajo s fizikalnim in kemičnim preperevanjem matične kamnine in organske snovi, ob prisotnosti živih organizmov (Vidic, 1995). Matična kamnina je vir mineralov in pogojuje glavne fizikalne in kemijske lastnosti tal. Po globini so tla lahko zelo različno globoka in razdeljena v plasti ali horizonte, ki se izrazijo ob navpičnem prerezu skozi tla in katerih vsak ima specifične fizikalne, kemijske in biološke lastnosti.

Tla so naravni vir, potreben za pridelavo hrane, industrijskih surovin in pridobivanje energetskih virov, pa tudi naravna vrednota, ki jo varujemo kot naravno dediščino. Kot naravni vir, naravna vrednota in kot nosilec prostora, so za obstoj in razvoj človeštva nenadomestljiva. Ohranitev naravnega vira tal pred fizičnim uničenjem in onesnaževanjem ter ohranitev ravnovesja med tlemi in ostalimi deli ekosistema je danes ena pomembnih aktivnosti v slovenskem prostoru. Gospodarjenje s tlemi mora zato zagotoviti ohranjanje naravnih značilnosti tal in omogočiti ustrezno raven življenja človeka.

2.1.1 Onesnaženost tal

Tla se smatrajo za onesnažena takrat, ko vsebujejo toliko onesnažil, da je njihova samo-očiščevalna sposobnost zmanjšana (Alloway, 1990), poslabšajo pa se tudi njihove fizikalne, kemijske in biološke lastnosti. Onesnažila zavirajo in preprečujejo rast rastlin v tleh, z njimi se onesnažuje podtalnica ali pa je zaradi škodljivih snovi kako drugače okrnjena trajna rodovitnost tal.

Vzroki onesnaženosti tal so emisije industrijske proizvodnje, intenzivnega kmetijstva, prometa in odlaganje odpadkov. Organske in anorganske nevarne snovi se nalagajo v tleh in v njih ostanejo tudi po prenehanju onesnaževanja, saj se nekatere le počasi razgradijo ali se iz tal izločajo.

Učinek TK in ostalih nevarnih snovi ter koncentracija le teh v rastlinah sta odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti tal, kjer se nahajajo (pH, tekstura tal, vsebnost organske snovi, oksidacijsko-redukcijski potencial, temperatura, poroznost itd.), kemijskih lastnosti nevarnih snovi (pH, kemijska oblika elementa oz. spojine v kateri se nahajajo v tleh, itd.), ter bioloških lastnosti rastlin (vrsta rastline, varieteta, del in starost rastline). Na splošno se vsebnost TK zmanjšuje z višanjem pH tal, talne organske snovi in vsebnosti gline (Eriksson, 1989).

Kovine in druge anorganske snovi v tleh se vključujejo v številne procese, prehajajo v rastline in dalje po prehrambeni verigi do živali in ljudi, s tem pa se vsebnost le teh vsakič

bolj zvišuje. Ta proces se imenuje s tujko biomagnifikacija. Največje koncentracije TK so bile opažene v užitnih zelenih delih rastlin (endivija, špinača, zelje) in v koreninah (korenje, rdeča pesa, redkev), manjše v steblih, najmanjše pa v plodovih (stročnice) in semenih (koruza, pšenica) (Zupan in sod., 2006). Zato je največ tveganja pri pridelavi korenovk in solatnic. Vendar pa je akumulacija Pb nasplošno v korenovkah zelo majhna.

Problematično je tudi spiranje nevarnih snovi v podtalnico. Najpogostejše nevarne snovi v tleh so TK (Cd, Zn, Pb, Cr, Ni, Hg, Cu), nekateri radionukleidi, fluoridi, nitrati in fosfati. Od organskih nevarnih snovi so prisotni klorirani ogljikovodiki, poliklorirani bifenili, dioksini, fenoli, policiklični aromatski ogljikovodiki in mineralna olja, ki v tla pridejo z uporabo fitofarmaceutskih sredstev, vnosom blat čistilnih naprav ali kompostov ter goriv.

Po izvoru razdelimo nevarne snovi na organske in anorganske (Leštan, 2000):

Med organska onesnažila spadajo:

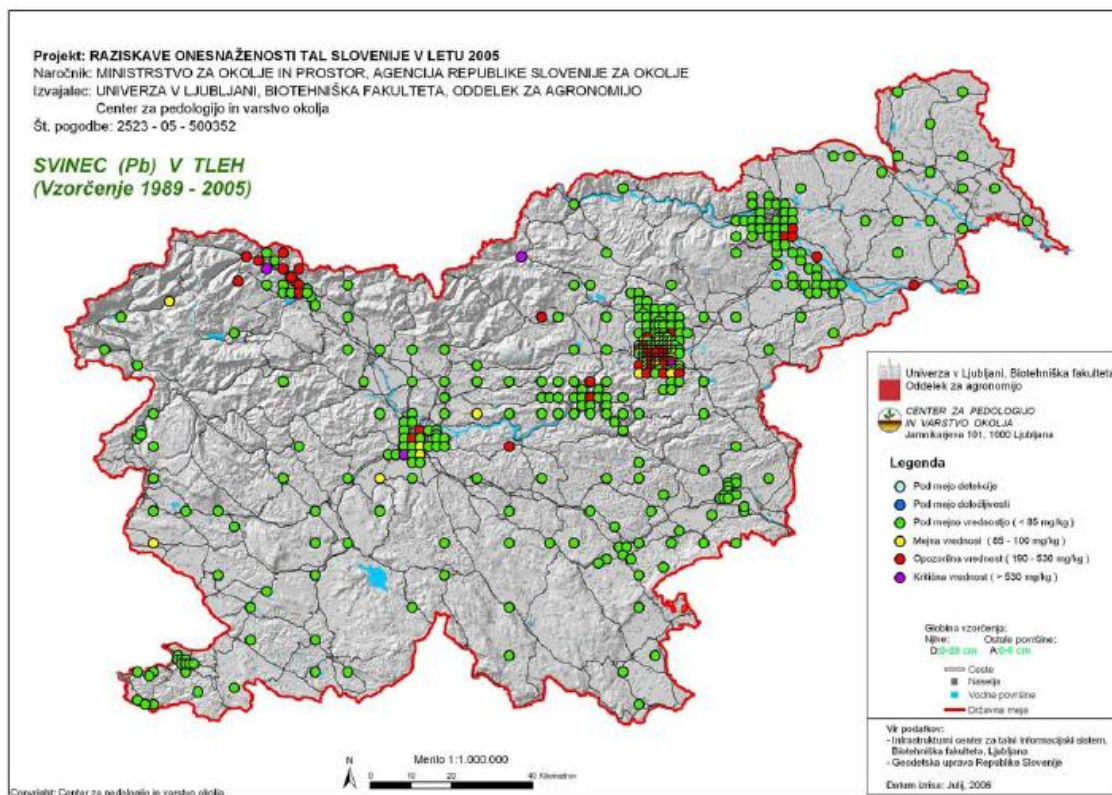
- Ø policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH oz. PAO);
- Ø poliklorirani bifenili (PCB)
- Ø organokovinske spojine,
- Ø goriva,
- Ø sintetični polimeri,
- Ø pesticidi (DDT in njegovi derivati),
- Ø persistentna organska onesnažila (POP),
- Ø razstreliva.

Med anorganska onesnažila spadajo:

- Ø težke kovine (TK),
- Ø radionuklidi,
- Ø ostale anorganske snovi (nitrati, fosfati, soli, itd.).

Do sedaj so bile izvedene sistematične raziskave onesnaženosti tal na območjih, ki obsegajo približno 13 % ozemlja Slovenije. Območja se razlikujejo glede na rabo tal, vrsto morebitnega onesnaževanja ter vsebnost organskih in anorganskih nevarnih snovi v tleh. Ugotovljena je povečana vsebnost kovin v okolici kovinskopredelovalne industrije in v bližini rudnikov (Celje, Jesenice, Mežiška dolina), tovarn, območja blizu avtocest in gosto naseljenih mest ter vsebnost nekaterih organskih nevarnih snovi na intenzivnih kmetijskih območjih.

Na sliki 1 so prikazane vrednosti za vsebnost svinca v tleh, interpretirane glede na mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti.



Slika 1: Vsebnost svinca (Pb mg kg⁻¹ s.s.) v zgornjem sloju tal (0-5 cm ali 0-20 cm). (Zupan, 2006)

oznaka		dosežena koncentracija merjene nevarne snovi	Pb
svetlo modra		pod mejo detekcije uporabljene metode	<2
modra		pod mejo določljivosti uporabljene metode	<5
zelena		do mejne imisijske vrednosti	<85
rumena		mejna imisijska vrednost do opozorilne vrednosti	≥85
rdeča		opozorilna imisijska vrednost do kritične vrednosti	≥100
vijolična		kritična imisijska vrednost in več	≥530

Slika 2: Legenda tematske karte onesnaženih tal s Pb, vrednosti so v mg kg⁻¹ zračno suhih tal; upoštevane so mejna, opozorilna in kritična imisijska vrednost glede na slovensko zakonodajo (Uredba..., 1996)

2.1.2 Mejne in kritične imisijske vrednosti snovi v tleh

Zaradi toksičnosti TK so številne države omejile pridelavo hrane na onesnaženih območjih in določile tudi meje dovoljenega letnega vnosa TK s komposti in blati čistilnih naprav. V Sloveniji določa še sprejemljive ali mejne in presežene ali kritične vrednosti za posamezne TK v tleh Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh (Uredba..., 1996).

Po definiciji je **mejna imisijska** vrednost gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni takšno obremenitev tal, da se zagotavljajo življenjske razmere za rastline in živali, in pri kateri se ne poslabšuje kakovost podtalnice ter rodovitnost tal. Pri tej vrednosti so učinki ali vplivi na zdravje človeka ali okolje še sprejemljivi.

Opozorilna imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, ki pomeni pri določenih vrstah rabe tal verjetnost škodljivih učinkov ali vplivov na zdravje človeka ali okolje.

Kritična imisijska vrednost je gostota posamezne nevarne snovi v tleh, pri kateri zaradi škodljivih učinkov ali vplivov na človeka in okolje onesnažena tla niso primerna za pridelavo rastlin, namenjenih prehrani ljudi ali živali ter za zadrževanje ali filtriranje vode. Kadar je dosežena kritična imisijska vrednost onesnažil v tleh pri kateri je omejena raba tal in gojenje rastlin za človeško uporabo, je potrebno taka tla očistiti s procesi remediacije.

Uredba velja za celotno območje Republike Slovenije ne glede na sestavo ali vrsto rabe tal.

Preglednica 1: Mejne, opozorilne in kritične imisijske vrednosti nevarnih snovi v tleh (Uredba ..., 1996).

Nevarna snov	Vrednosti [mg kg ⁻¹ suhih tal]		
	mejna vrednost	opozorilna vrednost	kritična vrednost
Kadmij in njegove spojine, izražene kot Cd	1	2	12
Baker in njegove spojine, izražene kot Cu	60	100	300
Nikelj in njegove spojine, izražene kot Ni	50	70	210
Svinec in njegove spojine izražene kot Pb	85	100	530
Cink in njegove spojine, izražene kot Zn	200	300	720
Celotni krom Cr	100	150	380
Živo srebro in njegove spojine, izražene kot Hg	0.8	2	10
Kobalt in njegove spojine, izražene kot Co	20	50	240
Molibden in njegove spojine, izražene kot Mo	10	40	200
Arzen in njegove spojine, izražene kot As	20	30	55

V Evropskem prostoru pa velja evropska zakonodaja oz. uredba Council Directive 86/27/EEC iz leta 1986, ki prepoveduje uporabo odpadnih voda ter aktivnih blat čistilnih

naprav, kot najbolj razpoložljivega organskega gnojila, na s TK onesnaženih tleh. V tej direktivi je mejna imisijska vrednost za Pb 50 mg kg⁻¹ in kritična imisijska vrednost 300 mg kg⁻¹ suhih tal.

2.2 TEŽKE KOVINE V TLEH IN NJIHOVA DOSTOPNOST

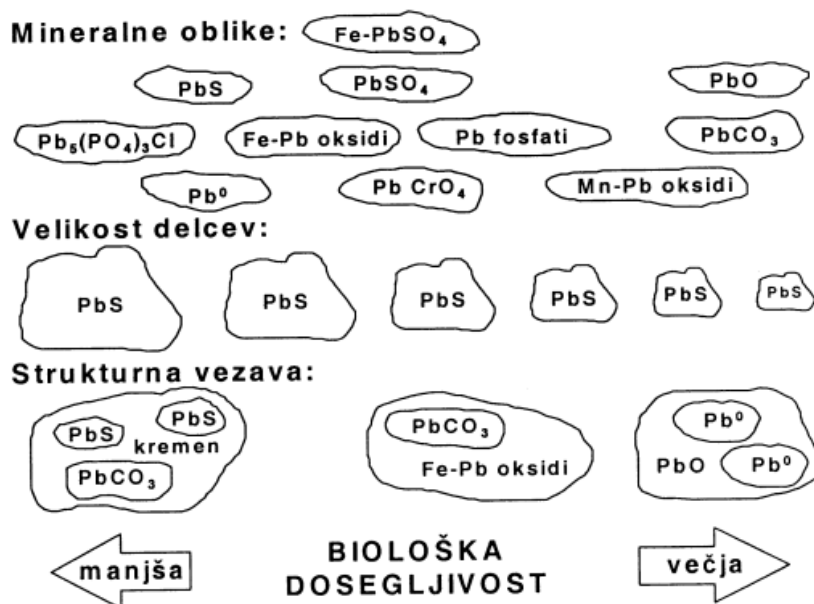
TK so vse tiste kovine, ki imajo specifično gostoto večjo od 5 g cm⁻³ in atomsko maso med 63,546 in 200,590 g mol⁻¹. Izraz zajema vse kovinske ione ali njihove spojine, ki so v naravnih sistemih prisotni v zelo nizkih koncentracijah in so nekateri v sledovih celo nujno potrebni za obstoj živih organizmov. Problem z onesnaževanjem nastane le, ko se ti elementi prekomerno nakopičijo na nekem območju (tla, voda, zrak) ali v živem organizmu (rastline, živali, ljudje). Pomanjkanje določenega esencialnega elementa se v živem organizmu kaže na več načinov, kot so na primer kloroze, rastlina ne more rasti oz. razviti celotnega življenjskega ciklusa, nefunkcioniranje metabolnih procesov, itd. Pri prekomernih koncentracijah pa lahko kovine postanejo toksične in njihovi učinki se kažejo pri osnovnih fizioloških in biokemičnih procesih in sicer lahko povzročijo zmanjšano rast rastlin, inhibirajo fotosintezo in dihanje (omejen transport elektronov), degenerirajo zelo pomembne celične organele (Vangronsveld in Clijsters, 1994), pri ljudeh in živalih pa povzročajo akutno ali kronično zastrupitev, mutacije somatskih celic oz. kancerogenost, mutagenost, teratogenost ali poškodbe zarodka (Oliver, 1997), inaktivacijo encimov, blokirajo funkcionalne skupine biološko pomembnih molekul, lahko poškodujejo biomembrane, lahko zamenjajo druge organizmu potrebne kovinske ione ali povzročijo spremembo strukture bioloških molekul (Kos, 2004). Z izrazom TK pogosto imenujemo elemente, kot so Cd, Cr, Cu, Co, Hg, Mn, Mo, Pb, Sn, Ni, Zn, itd. med katerimi so za rast in normalen razvoj rastlin nujno potrebne naslednje kovine: Mn, Fe, Zn, Cu, Mo in Co (Mengel in Kirkby, 1987), ostale kovine pa rastlinam niso nujno potrebne, vendar jih rastline vseeno črpa iz talne raztopine, če so v njej prisotne.

Primarni vir kovin v tleh je matična podlaga, a veliko kovin je antropogenega izvora (Alloway, 1990). TK so prisotne v tleh v trdnih delcih: kot prosti ioni v raztopini, kot topni organsko - mineralni kompleksi ali adsorbirane na koloidnem delu tal. Biodostopnost TK za talne organizme in rastline je odvisna od številnih procesov v tleh, kot so: obarjanje, adsorpcija in desorpcija, ionska izmenjava, raztapljanje, nastanek in razgraditev kompleksov. Na obseg teh procesov in na vrsto reakcije vplivajo pedološke lastnosti, kot so: količina in vrsta glinenih mineralov ter Al, Fe in Mn oksidov, koncentracija kovinskega iona in ostalih ionov v raztopini, vsebnost organske snovi, vodno-zračne razmere v tleh ter pH in redoks potencial tal (Leštan, 2002). Kot sem že omenila je pH talne raztopine zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na topnost, mobilnost in sprejem TK v rastline. Z naraščanjem pH vrednosti talne raztopine pada topnost TK, oz. sprejem v rastline je večji v kislih tleh kot v alkalnih ali karbonatnih tleh (Adriano, 1986).

Pedološke lastnosti tal močno vplivajo tudi na obstojnost škodljivih snovi v talnem profilu. Tla z višjimi odstotki glinenih mineralov imajo višjo poljsko kapaciteto in bolje zadržujejo vodo in onesnažila (Levy in sod., 1992). Več kot je v tleh peska, manjša je poljska kapaciteta in manjša je sposobnost tal za zadrževanje onesnažil. Tla imajo veliko samo-

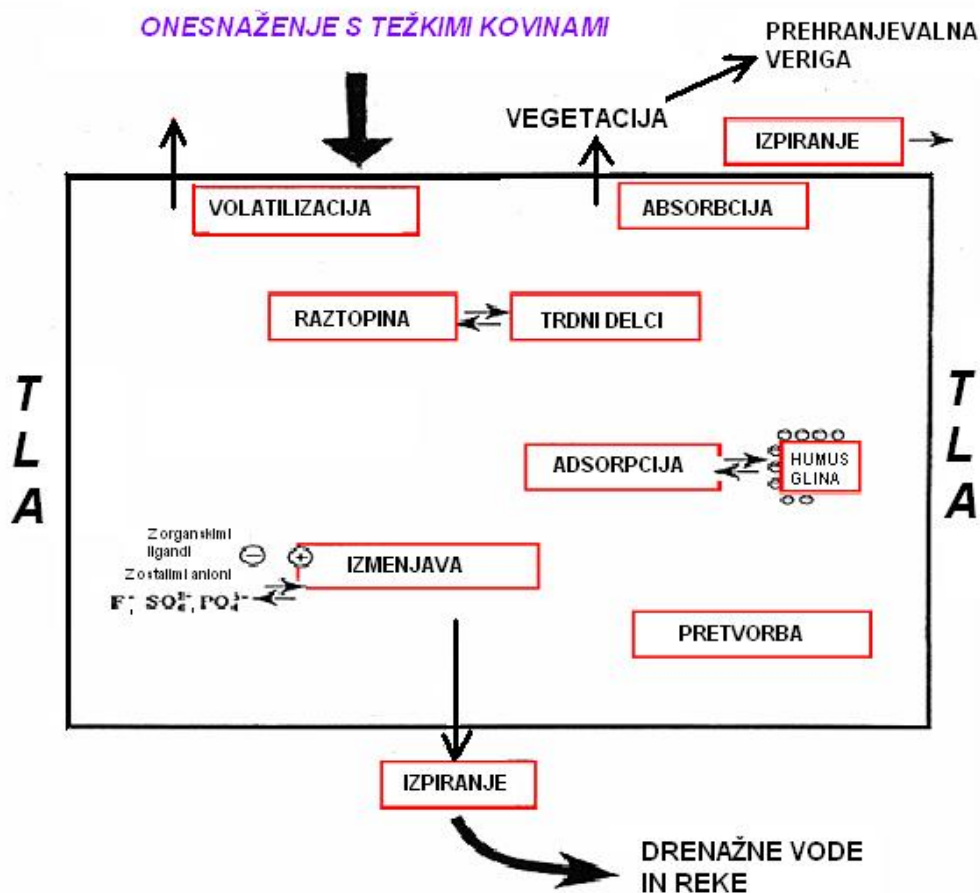
očiščevalno sposobnost. Zaradi močne vezave kovin na talne delce (koloide), se le te naenkrat ne morejo sprostiti v okolje v večjih koncentracijah.

Kot primer navajam Pb, ki je zelo netopen in med TK v tleh najmanj mobilni. Biološka dostopnost Pb je predvsem odvisna od njegove mineralne oblike in velikosti talnih delcev, na katere je Pb vezan, od pH tal, deleža organske snovi in deleža glinenih delcev v tleh (Leštan, 1999). Pb se v tleh lahko nahaja v čistih mineralnih oblikah kot so svinčev sulfid (PbS), svinčev sulfat (PbSO₄) ali svinčev karbonat (PbCO₃). Kot svinčev sulfid se običajno nahaja v območjih kjer poteka metalurška predelava svinčeve rude. Sulfatna in karbonatna oblika nastaneta kot posledica obarjalnih reakcij v tleh. Sulfatne oblike je več v kislih tleh, karbonatne pa v bazičnih tleh. Pb v tleh najdemo tudi v fosfatni (PbPO₄), kloridni (PbCl₂), oksidni (PbO) in drugih oblikah, ki imajo različno topnost. Številne organske kisline ter organska snov v tleh, tvorijo komplekse s Pb. Mn in Fe oksidi in Fe sulfati lahko tudi vsebujejo Pb. Hitrost raztapljanja Pb in s tem biološka dosegljivost Pb iz teh kompleksov je odvisna od pH reakcije tal, redoksi potenciala tal, kationske izmenjalne kapacitete in drugih lastnosti tal. Raztapljanje je odvisno tudi od razmerja med površino in volumnom in s tem od velikosti delcev na katere je vezan Pb (Slika 2). Zaradi vezave Pb na glinene minerale in organsko snov je Pb v tleh slabo mobilni in njegov vstop v rastlinska tkiva je omejen (Oliver, 1997). V talni raztopini je Pb lahko v ionski obliki Pb²⁺, pogosteje pa v obliki kompleksnih ionskih zvrsti: Pb(OH)⁺, PbCl⁺, PbHCO₃⁺ ali Pb(CO₃)⁺. Koncentracijski prag škodljivosti Pb v tleh je tako odvisen od prevladujočih oblik v kateri se nahaja Pb in toksičnosti teh oblik.



Slika 3: Biološka dosegljivost Pb je odvisna od mineralne oblike v kateri se nahaja v tleh, velikosti delcev in strukturne vezave z drugimi minerali, glino in organsko snovjo tal. Te pojavne oblike so odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti tal (Leštan, 1999).

Na sliki 4 so prikazane glavne poti in procesi v sistemu prehajanja TK v tla in iz njih v rastlino.



Slika 4: Glavne poti in procesi kroženja kovin v sistemu tla – talna voda – rastline.

2.2.1 Odpornost rastlin na težke kovine

Rastline so razvile številne mehanizme odpornosti na TK (Ross, 1994). V grobem jih delimo na mehanizme, ki preprečujejo sprejem in premeščanje TK po rastlinah (izključitveni mehanizem) in mehanizme, ki omogočajo neškodljivo akumulacijo TK v nadzemnih delih rastlin.

Med izključitvene mehanizme štejemo imobilizacijo kovin v celični steni, selektivnost plazmatske membrane, tvorbo kompleksnih spojin z organskimi in anorganskimi spojinami, fenolnimi derivati in glikozidi ter kopičenje teh spojin v vakuolah koreninskih celic. Rastline, ki so razvile ta tip odpornosti, rastejo na območjih s povečano vsebnostjo kovin, nimajo pa povečane vsebnosti TK v nadzemnih delih.

Neškodljivo akumulacijo TK v nadzemnih delih rastlin omogočajo:

- Ø encimi, katerih delovanje ni prizadeto v prisotnosti določene TK,
- Ø spreminjanje poti metabolnih procesov, s tem se rastlina izogne škodljivemu učinku TK,
- Ø vezava TK s posebnimi organskimi spojinami – fitokelatini.

Določene rastline iz rodov *Thlaspi*, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum* in *Alyssum* so sposobne hiperakumulacije TK kot npr. Cd, Cu, Ni in Zn iz tal (Kos, 2004), vendar je njihova biomasa navadno premajhna, da bi bile te rastline primerne za učinkovito fitoekstrakcijo.

2.3 ČIŠČENJE OZ. REMEDIACIJA ONESNAŽENIH TAL

TK so v nasprotju z organskimi onesnažili nerazgradljive. Zato jih je potrebno z različnimi metodami remediacije (čiščenja, izboljševanja) tal iz njih odstraniti. Čiščenje tal je drago in dolgotrajno in je po večini odvisno od značilnosti območja onesnaženja, lastnosti tal, koncentracije ter vrste TK v tleh.

Glede na mesto, kjer se remediacija vrši, ločimo ta dva načina (Bolton in Gorby, 1995):

- **in-situ** čiščenje, ki poteka na mestu onesnaženja,
- **ex-situ**, kjer se onesnažena tla najprej izkopljejo oz. prenesejo iz prvotnega mesta onesnaženja in šele nato sledi čiščenje.

Glavna prednost tehnologije *in-situ* je predvsem manjši vpliv na ekosistem ter precej nižji stroški čiščenja kot pri izkopavanju, vendar je čas čiščenja ponavadi daljši. Pri *ex-situ* tehnikah, pa so rezultat navadno popolno očiščena, a močno degradirana tla (Smith in sod., 1996).

Glede na postopek, s katerim odstranimo onesnažila iz tal ločimo tri postopke:

- Ø **fizikalno-kemijske** (izpiranje tal, redukcija in oksidacija onesnažil, ekstrakcija v obliki hlapov, dehalogenizacija ter solidifikacija in stabilizacija),
- Ø **termične** (termično pospešena ekstrakcija hlapov, vitrifikacija, nizko in visokotemperaturna termična desorpcija, incineracija in piroliza),
- Ø **biološke** (uporaba mikroorganizmov, rastlin in encimov).

Fizikalno-kemijski postopki so se razvili za remediacijo manjših površin močno onesnaženih tal, ki pa za remediacijo velikih površin onesnaženih kmetijskih tal ekonomsko niso sprejemljivi. Pri raziskavah z nekaterimi rastlinami, so opazili pojav nadpovprečnega sprejema TK v rastlinsko tkivo. Pri teh rastlinah so koncentracije TK v rastlinskem tkivu daleč presegle koncentracije v tleh (Adriano, 1986). Med tehnikami bioremediacije je postopek uporabe rastlin za odzvem TK iz tal, imenovan fitoekstrakcija (fito-rastlina, ekstrakt-izvleček) eden najbolj učinkovitih, nezahtevnih in tudi najcenejših za

reševanje problema onesnaženja *in-situ*. Pri metodi solidifikacije/stabilizacije se imobilizirajo TK v tleh z dodajanjem in vmešavanjem snovi kot so cement, apno, fosfati (Kos, 2004).

Preglednica 2: Stroški različnih metod remediacije s TK onesnaženih tal (Mulligan in sod., 2001; Cunningham in Berti, 1999)

Metoda remediacije	Stroški (\$ ha ⁻¹)
Prekrivanje tal z asfaltom	160.000
Prekrivanje z neonesnaženimi tlemi	140.000
Izkop/stabilizacija težkih kovin, deponiranje	1.500.000
Imobilizacija težkih kovin <i>in situ</i>	60.000
Pranje tal	790.000
Fitoekstrakcija s hiperakumulatorskimi rastlinami	200-100.000
Z ligandi inducirana fitoekstrakcija	260.000

Pranje tal je *ex situ* metoda remediacije, ki vključuje uporabo kovinskih ligandov ali kislin v kombinaciji z ligandi, ki povečajo topnost in mobilnost TK v tleh. Ta metoda se je izkazala za najučinkovitejšo pri čiščenju onesnaženih peščenih tal (Mulligan in sod., 2001). Večina naštetih remediacijskih tehnik se izvaja, vendar so energetsko potratne in drage (Preglednica 2). Poleg tega fizikalno-kemična obdelava tal povzroča rušenje strukture tal in zastrupljanje talnih organizmov ter s tem negativno vpliva na talne ekosisteme (Lasat, 2002).

2.3.1 Fitoremediacija

Fitoremediacija se nanaša na različne tehnike, ki uporabljajo naravne ali genetsko spremenjene rastline v postopku čiščenja onesnaženih tal. Rastlinski sistemi in njihova koreninsko-mikrobiološka skupnost služijo za odstranitev, degradacijo ali stabilizacijo okoljskih onesnažil (Flathman in Lanza, 1998). Fitoremediacijo uvrščamo med biološke, *in-situ* postopke in se uporablja za čiščenje organskih in anorganskih onesnažil. Sprva so jo uporabljali za čiščenje odpadnih vod (umetna mokrišča), kasneje pa se je ideja prenesla tudi na čiščenje tal (Cunningham in sod., 1995). Fitoremediacijske tehnologije lahko opredelimo v dve glavni skupini (Wenzel in sod., 1999):

Prva zajema postopke, ki onesnažila v tleh le stabilizirajo, torej jih zadržijo v talnem profilu in jim preprečijo mobilnost:

- Ø **Fitostabilizacija ali fitoimobilizacija**, uporablja rastline, ki so sposobne absorbirati večje količine TK v svoje korenine, vendar jih pri tem ne odstranijo iz

tal, ampak jih stabilizirajo in zmanjšajo njihovo dostopnost v tleh ter preprečijo vstop v podtalnico ter prehrabeno verigo.

- Ø **Rizofiltracija** je uporaba koreninskih delov rastlin na katere se absorbirajo onesnažila (predvsem TK in radionuklidi), iz voda in odplak.

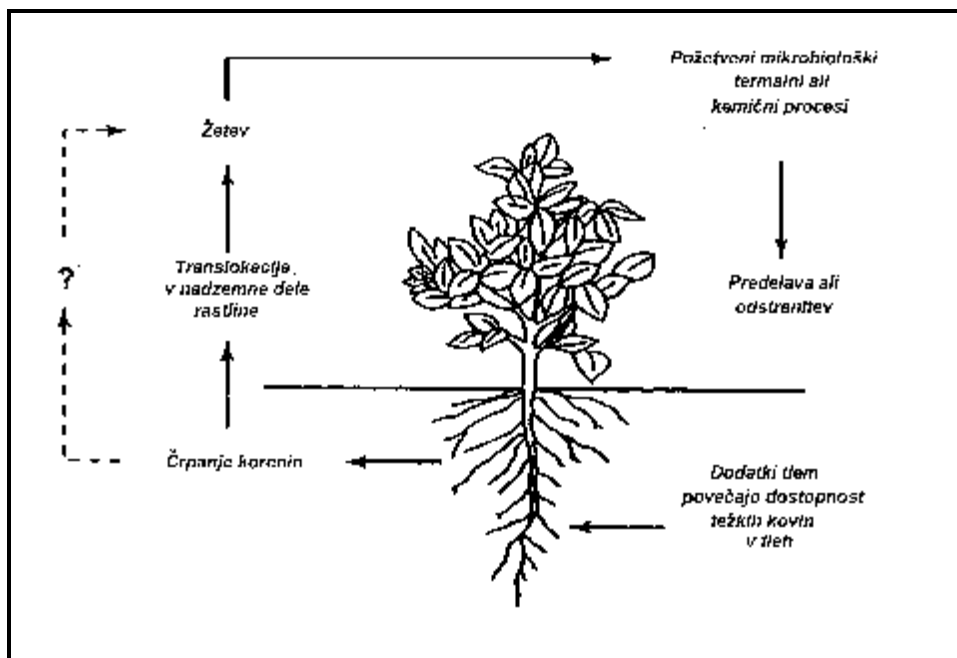
V drugo skupino prištevamo postopke pri katerih neželene snovi odstranimo iz talnega profila (Flathman in Lanza, 1998).

- Ø **Fitoekstrakcija** temelji na uporabi rastlin, ki preko koreninskega sistema iz talne raztopine črpajo TK in jih vgradijo v svojo nadzemno biomaso.
- Ø **Fitodegradacija** je proces, ki izkorišča rastline z sposobnostjo sprejema in razgradnje (lahko tudi mikrobiološke) škodljivih snovi v tleh. Uporaba rastlin in z njimi povezanih mikroorganizmov je primerna za razgradnjo organskih onesnažil.
- Ø **Fitovolatilizacija** je uporaba rastlin za biotransformacijo onesnažil v hlapne snovi (Salt in sod., 1998).

2.3.2 Fitoekstrakcija težkih kovin

Fitoekstrakcija je postopek s pomočjo katerega iz onesnaženih tal rastline črpajo onesnažila, še posebno TK in radionuklide in jih iz korenin translocirajo v svoje nadzemne dele. Fitoekstrakcija omogoča čiščenje velikih površin nizko do srednje onesnaženih tal, pri čemer se kakovost in rodovitnost tal ne poslabša, kot pri večini fizikalno-kemijskih metod. Fitoekstrakcija izkorišča izjemno sposobnost nekaterih rastlin, ki se imenujejo hiperakumulatorske rastline, za črpanje, translokacijo in akumulacijo visokih koncentracij toksičnih kovin iz talne raztopine v rastlinske nadzemne dele (Flathman in Lanza, 1998).

Dobre **hiperakumulatorske rastline** naj bi bile tolerantne na visoke vsebnosti TK v tleh, naj bi imele veliko sposobnost bioakumulacije TK v nadzemnih rastlinskih delih, naj bi hitro rastle, tvorile veliko nadzemne biomase in imele globok koreninski sistem (Garbisu in Alkorta, 2001). Vendar pa je za večino hiperakumulatorskih rastlin značilna majhna biomasa in počasna rast (Cunningham in sod., 1995), kar ima za posledico manjšo količino ekstrahiranih TK in s tem nižjo učinkovitost fitoekstrakcije. Hiperakumulatorske rastline lahko v listih vsebujejo več kot 0,1 % (1000 mg kg^{-1}) Ni, Co, Cu in Cr oz. več kot 1 % Zn (Raskin in sod., 1994). V naravi še niso odkrili pravih hiperakumulatorjev za Pb. Možna razlaga je, da je Pb zaradi pretežne vezave na trdno fazo tal, organsko snov, okside in glinene delce ter karbonate, rastlinam skoraj nedostopen (Ruby in sod., 1999). Rastline, ki rastejo na onesnaženih tleh z visoko koncentracijo Pb, vsebujejo manj kot 50 mg g^{-1} Pb v nadzemnem delu rastline (Cunningham in sod., 1995). Prvi znani hiperakumulatorji so spadali v družini *Brassicaceae* in *Fabaceae*. Poskusi v rastlinjaku z rastlino *Brassica juncea* so pokazali, da je ta hitro rastoča rastlina z veliko biomaso sposobna akumulacije več kot $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ Pb (Blaylock in sod., 1997). V zadnjih letih se z raziskavami območij bogatih s kovinami in tudi s poskusi na kmetijskih rastlinah pospešeno išče nove vrste s hiperakumulatorskimi lastnostmi (Leštan, 2000).



Slika 5: Procesi, vključeni v postopek fitoekstrakcije onesnažil iz tal (Cunningham in sod., 1995)

Potek fitoekstrakcije bi lahko opredelili v petih stopnjah (Cunningham in sod., 1995):

1. Na kontaminiranih tleh vzgojimo rastlino iz sadike ali semena z znanimi lastnostmi, ki skozi svoj življenjski cikel iz tal črpa hranila in z njimi kovinske ione.
2. Koncentracija kovinskih ionov, ki jih bo rastlina sprejela iz tal in akumulirala v svojih tkivih, je odvisna od vrste rastline, dostopnosti kovin v tleh in ostalih talnih in klimatskih dejavnikov.
3. Ko rastlina doseže primerno biomaso in je vsebnost kovin največja jo pobereemo.
4. Pridelek lahko sežgemo, ali pa ga kot kontaminiran material prepeljemo na deponijo. S posebnimi postopki lahko iz rastlin ponovno pridobijo ekonomsko pomembne kovine (Leštan 2000).

Poznamo dve osnovni strategiji fitoekstrakcije (Salt in sod., 1998):

- Ø Kontinuirana fitoekstrakcija
- Ø Inducirana fitoekstrakcija.

2.3.2.1 Kontinuirana fitoekstrakcija

To je postopek, pri katerem se uporabljajo rastlinski hiperakumulatorji in navadno ni časovno omejen, izkorišča le razpoložljive fitoekstrakcijske sposobnosti rastlin, brez dodajanja snovi v tla. Dobre strani tega postopka so nizka cena, enostavnost postopka in majhno ekološko tveganje, slabe pa predvsem dolgotrajnost postopkov in s tem slaba učinkovitost (Huang, 1997), ter selektivnost hiperakumulatorskih rastlin za posamezne elemente. Ker navadno rastline nimajo vseh za fitoekstrakcijo želenih lastnosti se iščejo nove hiperakumulatorske rastline, v zadnjih letih preučujejo tudi gensko spremenjene

vrste. Razvoj teh je usmerjen predvsem v čim večjo biomaso, hitro rast in čim večji sprejem kovin.

2.3.2.2 Inducirana fitoekstrakcija

Inducirana fitoekstrakcija je proces, pri katerem z uporabo kelatnih ligandov povečamo prenos TK iz tal v rastline. Ligandi povečujejo topnost in mobilnost TK v tleh in s tem biodostopnost le teh rastlinam (Salt in sod., 1995) ter akumulacijo v nadzemne dele rastlin. Dodatek ligandov v tla sprosti kovine v talno raztopino preko desorpcije iz talnih delcev, raztapljanja Fe in Mn oksidov ter oborin. Uporaba ligandov pri fitoekstrakciji tako omogoča izrabo hitro rastočih rastlin z veliko biomaso in s tem skrajšanje trajanja remediacije tal. Hkrati pa se kovinsko-kelatni kompleksi spirajo v nižje plasti tal, kar omejuje učinkovitost in predstavlja veliko tveganje za okolje. Blaylock in sod. (1997) ter Huang in Cunningham (1997) so ugotovili, da lahko z rastlino *Brassica juncea* z metodo inducirane fitoekstrakcije v desetih letih na območjih, onesnaženih z več kot 2500 mg kg⁻¹ Pb, odstranijo med 180 kg ha⁻¹ in 530 kg ha⁻¹ Pb (Salt in sod., 1998).

2.3.2.3 Kelatni ligandi

Ligandi so koordinacijske spojine, ki z alkalijskimi kationi in kovinskimi ioni tvorijo komplekse. Ligandi so lahko enovezni (enostavni ioni) ali večvezni, ki jih imenujemo tudi kelatni ligandi (grško: *hele* – rakove klešče). Večina kovinskih ionov reagira z donorji prostih elektronskih parov, s katerimi tvorijo koordinacijske spojine ali kompleksne ione. Donor ali ligand mora imeti vsaj en par prostih elektronov, ki so na voljo za tvorbo spojine (Skoog in sod., 1988).

Ligande na osnovi aminopolikarboksilnih kislin uporabljajo v mnogih industrijskih panogah, kot so celulozna in papirna industrija, tekstilna, usnjarska, kovinska in živilska industrija, v proizvodnji foto materiala, pri izdelavi kozmetike in detergentov ter v kmetijstvu (Schowanek in sod., 1997) kot dodatek gnojilom. Z njihovim dodajanjem v gnojila se dosega večja biološka dosegljivost hranil v tleh. Uporabljajo pa se tudi za vzdrževanje topnosti mikroelementov v hidroponskih raztopinah. Pri različnih industrijskih procesih uporabljajo ligande za preprečevanje tvorbe netopnih oborin kovinskih soli, ki jo povzroča prisotnost prostih kovinskih ionov. Ligandi vežejo kovinske ione in zmanjšujejo njihovo delovanje, škodljivost ter preprečujejo nezaželene reakcije. Poleg uporabe v kmetijstvu in industriji so se ligandi izkazali za pomembne pri postopkih remediacije tal. Ligandi v tleh vežejo kovine v kovinsko-kelatne komplekse, kar preprečuje obarjanje in adsorpcijo kovin na talne delce in povečuje topnost kovin v tleh in s tem dostopnost le teh rastlinam.

Showanek in sod. (1997) so ligande uvrstili v tri kategorije glede na vrednost stabilnostne konstante (log K) kovinsko-kelatnih vezi: na šibke, srednje in močne ligande. Močni ligandi imajo sorazmerno nizko afiniteto za Ca in Mg ione (nasprotno od šibkih ligandov), visoko afiniteto pa za Fe, Mn in TK kot so Pb, Cd, Co in Zn (Jaworska in sod., 1999), vendar pa so na splošno biološko zelo slabo razgradljivi. V talni raztopini s kovinskimi

ioni tvorijo izredno obstojne kovinsko-kelatne komplekse, ki so zaradi omejene sposobnosti sprejema lahko izpostavljeni izpiranju skozi talni profil, kjer lahko ogrozijo druge naravne vire (Jaworska in sod., 1999). Ti kelatno-kovinski kompleksi preprečujejo, da bi se TK s sorpcijo oz. obarjanjem vezale na talne delce. Obenem prihaja tudi do raztapljanja nekaterih kovinskih oksidov. Kovine so v obliki nastalega kompleksa za razliko od vezave na talne delce, rastlinam dostopne in se lahko v rastlini akumulirajo (Raskin in sod., 1994).

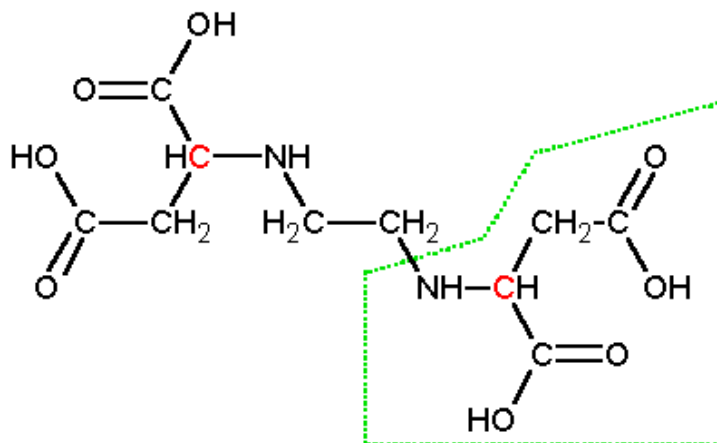
Problem ligandov in njihovih kompleksov s težkimi kovinami je njihova toksičnost in slaba razgradljivost. Etilen diamin tetraacetna kislina (EDTA), ki spada med močne ligande se je zaradi svoje počasne razgradljivosti, začela nabirati v evropskih površinskih vodah v koncentracijah od 10-50 $\mu\text{g l}^{-1}$. Pri remediaciji tal se ligandi dodajajo v tla, zato je njihova biorazgradljivost zelo pomembna. Zaradi tega se je za remediacijo tal začel uporabljati biološko razgradljiv, nizko toksičen organski ligand [S,S] stereoisomera etilendiamindijantarjeve kisline (EDDS), ki smo ga uporabili v naši raziskavi. Biorazgradljivi ligandi so v okolju neobstoječi in ne povzročajo dodatnega onesnaževanja tal. Edina biološko razgradljiva in komercialno dostopna liganda, testirana pri metodah remediacije tal, sta etilendiamin disukcinat (EDDS) in nitrilotriacetat (NTA) (Bucheli-Witschel in Egli, 2001).

2.3.2.3.1 Etilen diamin disukcinat (EDDS)

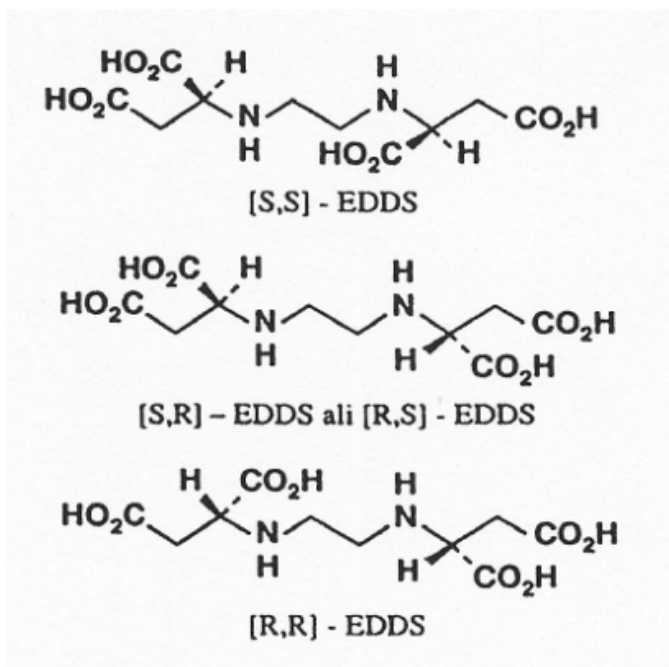
EDDS je nehlapna, v vodi dobro topna spojina ($>1000 \text{ g l}^{-1}$), ki ima dva kiralna ogljikova atoma in tri možne prostorske izomerne oblike ([R,R], [R,S]/[S,R], [S,S]) (slika 6), vendar je le [S,S] izomera biološko razgradljiva, ostale izomere pa se v okolju transformirajo v različne obstojne metabolite (Jaworska in sod., 1999). EDDS je strukturna izomera EDTA. [S,S]-EDDS s kovinskimi ioni tvori kovinsko-kelatne komplekse. Jaworska in sod. pa piše, da je [S,S]-EDDS, kot močan ligand bolj toksičen za alge, medtem ko je za ribe, daphnio (obe $\text{EC}_{50} > 1000 \text{ mg l}^{-1}$) in ostale nevretenčarje skoraj netoksičen. EDDS je bil prvič izoliran kot metabolit talne aktinomicete *Amycolatopsis orientalis* (Nishikiori in sod., 1984). *Amycolatopsis orientalis* proizvaja EDDS izključno v biorazgradljivi obliki [S,S] izomeri. Pred kratkim se je začel EDDS uporabljati kot aktivna sestavina v proizvodnji čistil. Dandanes, pa je edini komercialno dosegljiv ligand, ki je naravno prisoten v tleh, kjer razpade na neškodljive produkte (Bucheli-Witschel in Egli, 2001, Jaworska in sod., 1999, Schowanek in sod., 1997), kot so *N*-(2-aminoetil) aspartanska kislina in CO_2 . Razgradnja je odvisna od vrste prostorske izomere. Po kriteriju OECD (Organizacija za ekonomsko sodelovanje in razvoj) je kriterij za biorazgradljivost neke spojine 60% mineralizacija v okolju v 28. dneh in razpolovilna doba 2,5 dni. Mineralizacija [S,S]-EDDS presega 80% po 20. dneh vrednotenja po prilagojenem Sturm-ovem testu OECD 301B (Jaworska in sod., 1999, Schowanek in sod., 1997). EDDS ima močno kemijsko afiniteto za Pb (konstanta stabilnosti kompleksa, $\text{Log } K_s = 12.7$), vendar je vseeno manjša kot od EDTA ($\text{Log } K_s = 17.8$) (Bucheli-Witschel in Egli, 2001). EDDS ima največjo K_s za Cu, sledijo $\text{Zn} > \text{Pb} > \text{Hg} > \text{Cd} > \text{Fe}$ (Schowanek in sod., 1997). Najboljšo sposobnost vezave ima pri pH 7. Biološka razgradnja kelatno-kovinskega kompleksa pa je zelo odvisna od tipa kovine in ni povezana s stabilnostno konstanto kelatnega kompleksa. Pb in Zn-EDDS kompleksi imajo praktično isto stabilnostno konstanto, ampak zelo različno

biorazgradljivost. Kot je poročal Vandevivere in sod. (2001) je kompleks Pb-EDDS veliko bolj biorazgradljiv. Hitra in popolna razgradnja ter nizka toksičnost EDDS dovoljuje okoljsko varnejšo inducirano fitoekstrakcijo, zato ji daje prednost pred EDTA in kelatnimi ligandi, ki so odporni na biološko in kemično razgradnjo (Jones in Williams, 2001).

Slika 6 nazorno prikazuje strukturo EDDS, kjer sta vidna oba kiralna ogljikova atoma ter l-aspartna kislina.



Slika 6: Struktura EDDS, ki nam kaže kiralna ogljikova atoma (z rdečo); obadva morata biti S; l-aspartna kislina pa je obdana z zelenimi pikami (University of Bristol, School of Chemistry, 2007).



Slika 7: Strukturne formule različnih prostorskih izomer EDDS (Jaworska in sod., 1999)

2.4 HIDROGELI

Hidrogeli so superabsorbentni (lahko vsebujejo čez 99% vode) naravni ali sintetični tridimenzionalni polimeri, ki se uporabljajo za zadrževanje vode in hranil v tleh. Polimeri so makromolekule, zgrajene iz manjših molekul ali tako imenovanih monomer. Stockosorb hidrogel je križno vezani kalijevo-amonijev poliakrilamid/poliakrilat, kopolimer akrilamida in akrilne kisline, ki absorbira v svoje mrežne prostore velike količine vode in v njej raztopljeni hranila, ni pa topen v vodi. Ta križno vezani polimer privlači vodo zaradi svoje molekularne strukture in hidrofilne narave. Količina vode, ki jo poliakrilamidni polimeri lahko absorbirajo je 400 krat večja kakor njihova masa. Ime hidrogel se je začel uporabljati zaradi videza in konsistence gela, ki jo dobijo suhi kristali ko absorbirajo vodo in nabreknejo.

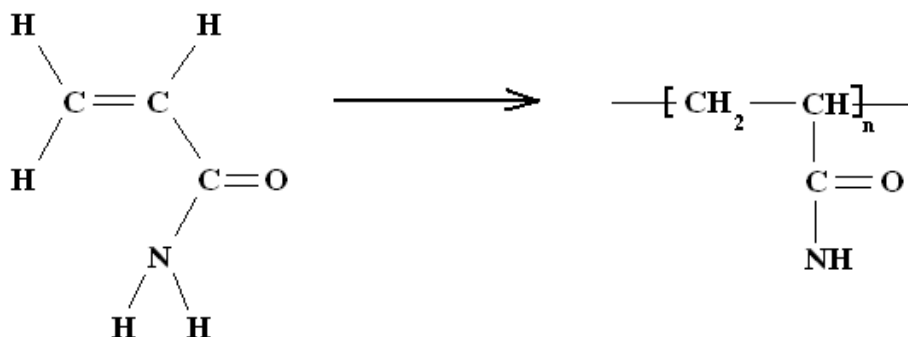
Polimeri na osnovi kalija se zaradi sposobnosti za vsrkavanje velikih količin tekočine in kontroliranega sproščanja le te s pridom uporabljajo v kmetijstvu oz. v vrtnarstvu. Uporaba Stockosorb v kmetijstvu pomaga k zmanjšanju uporabi vode, poveča učinkovitost gnojil, herbicidov in pesticidov, pripomore k povečanju kaljivosti semen in s tem k večjemu pridelku, saj ohranja primerno vlažnost tal, zmanjša zbitost tal ter spiranje kemikalij saj zmanjšuje globoko pronicanje vode (American Soil Technologies, Inc. 800-798-7645, internetna stran).

Aktivna snov vezana v hidrogel postane biološko aktivna ko se iz hidrogela sprosti. Sproščanje aktivne snovi iz polimera poteka z difuzijo skozi gel ali s fizikalnim in kemičnim razpadom polimera, npr. s hidrolizo, biodegradacijo, toplotno degradacijo ipd. Sproščanje nadzorujejo dejavniki kot so: velikost hidrogelnih granul ali delcev, debelina stene in struktura membrane oz. njena poroznost (Rudzinski in sod., 2002).

Hidrogeli se uporabljajo tudi pri izdelavi higienskih produktov (plenice, sanitarne brisače etc.), v zdravstvene namene (v sprejih za celjenje manjših opeklin in ran), v izdelavi mehkih kontaktnih leč (silikonski hidrogeli, poliakrilamidi) etc.), za prsne vsadke ipd.

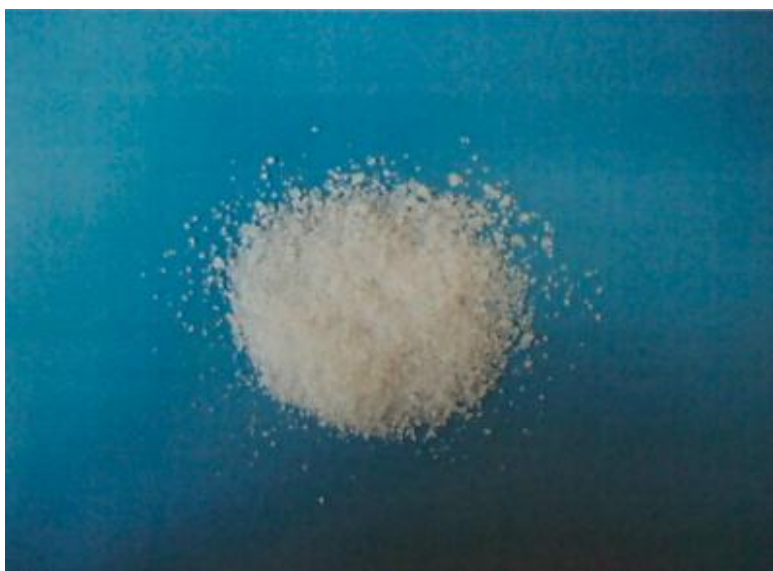
Za sintezo hidrogelov se uporabljajo tudi naravni hidrofilni polimeri, kot so škrob, celuloza, lignin, smola akacije in mnogi drugi naravni biopolimeri (Rudzinski in sod., 2002). V naši raziskavi smo uporabili akrilamidni hidrogel Stockosorb.

Stockosorb je mrežni polimer sestavljen iz akrilne kisline ($\text{CH}_2=\text{CHCOOH}$), delno nevtralizirane z raztopino kalijevega hidroksida (KOH) in akrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) (slika 7) (Polyacrylates, 2007) Gostota poliakrilamidnega hidrogela je približno $1,5 \text{ g/cm}^3$.

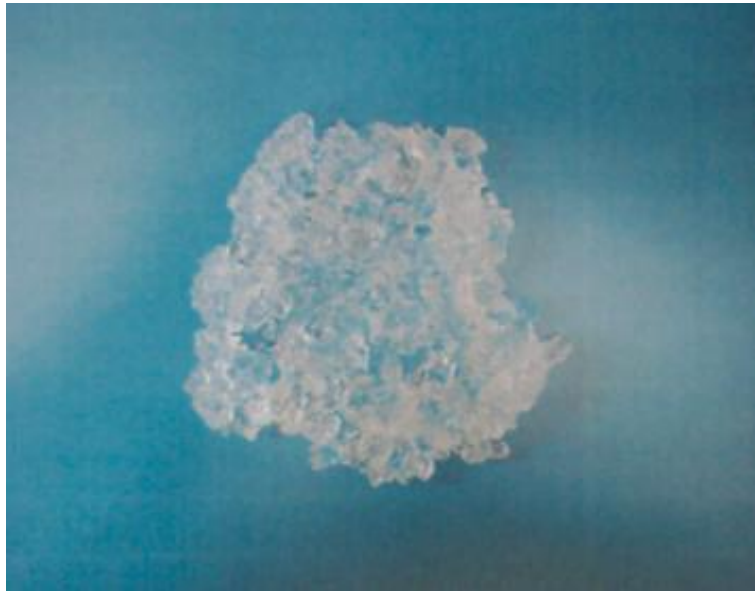


Slika 8: Strukturna formula akrilamida in poliakrilamida (Polyacrylates, 2007)

V suhem stanju je v obliki granulata, v stiku z vodo pa nabrekne in se spremeni v gel (sliki 9 in 10). 1 g Stockosorba lahko vpije približno 300 ml vode. V vodi je netopen in ni biološko razgradljiv. Raziskave so pokazale, da Stockosorb ni toksičen za sesalce, živali, mikroorganizme in rastline.



Slika 9: Stockosorb v suhem stanju v obliki granul (Zaleznik, 2002).



Slika 10: Stockosorb hidrogel v nabreklem stanju po namakanju v vodi (Zaleznik, 2002).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 LASTNOSTI TAL

V poskusu smo uporabili s težkimi kovinami onesnažena tla, ki so bila pripeljana iz Mežiške doline, kjer je včasih delovala topilnica svinčeve rude. Tla so vsebovala Pb (1100 mg kg⁻¹). V preglednici 4 so navedene pomembnejše pedološke lastnosti teh tal.

Preglednica 3: Vsebnost Pb in nekatere osnovne pedološke lastnosti tal, ki smo jih uporabili v poskusu. Analize so predhodno opravili sodelavci CPVO.

Lastnosti zgornjega sloja tal (0-30 cm) v Mežiški dolini	
Teksturni razred	Peščena ilovica (PI)
pH (CaCl ₂)	6,8
Organska snov (%)	5,2
Skupni dušik (%)	0,25
Pesek (%)	55,4
Grobi melj (%)	12,0
Fini melj (%)	18,9
Glina (%)	13,7
P (kot P ₂ O ₅) mg/100g tal	37,3
K (kot K ₂ O) mg/100g tal	9,2
Pb (mg kg ⁻¹)	1100
Gostota tal (g cm ⁻³)	1,15

3.2 TESTNA RASTLINA IN GNOJENJE

Kot testno rastlino smo izbrali kitajski kapus (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*). Botanično kitajski kapus uvrščamo:

- § **Poddeblo** Magnoliophytina (Angiospermae) – kritosemenke
- § **Razred** Rosopsida (Dicotyledoneae) – dvokaličnice
- § **Podrazred** Rosidae s. lat (*Dilleniidae*)
- § **Red** Capparales (Rhoedales) - kaprovčevci

§ Družina	Brassicaceae (Cruciferae) – križnice
§ Rod	<i>Brassica</i> – kapus
§ Vrsta	<i>Brassica rapa</i> L.
§ Varieteta	<i>Brassica rapa</i> L. var. <i>pekinensis</i> – kitajski kapus

Kitajski kapus ni hiperakumulatorska rastlina za Pb, vendar na splošno dobro sprejema TK. Semena rastline kitajski kapus (sorta Nagaoka F1, z 90% kaljivostjo, proizvajalca Semenarna Ljubljana) smo posejali v setvene plošče, napolnjene s substratom. Po treh tednih smo dobili zdrave, izenačene in kakovostne sadike, ki smo jih presadili v kolone. Pred tem smo vsako kolono najprej zalili z 200 ml vode in nato z 200 ml hranilne raztopine, ki smo jo pripravili s 100 mg N v obliki $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonijev sulfat) in 100 mg K v obliki K_2SO_4 (kalijev sulfat) na kg zračno suhih tal.

3.3 LIGAND

V poskusu smo uporabili biološko razgradljivo izomero liganda etilendiamin disukcinat ([S,S]-EDDS) z molsko maso ($M=292,243 \text{ g mol}^{-1}$) v obliki 34,2% raztopine v vodi. Ligand smo dodali kolonom v enkratnem odmerku v raztopinah z deionizirano vodo v koncentracijah $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$ tal, 5 mmol kg^{-1} tal in 10 mmol kg^{-1} tal.

3.4 ZASNOVA IN POSTAVITEV POSKUSA

Poskus je potekal v rastlinjaku Centra za Pedologijo in varstvo okolja na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Zasnovan je bil kolonski poskus, kjer smo uporabili plastične kolone. Poskus smo zasnovali v obliki naključnih skupin v štirih ponovitvah za vsako koncentracijo EDDS ter kontrole brez dodatka EDDS. Poskusne kombinacije so bile: kontrole, EDDS v koncentracijah $2,5$, 5 in 10 mmol kg^{-1} tal brez dodatka hidrogela, dodatek EDDS v koncentracijah 0 , $2,5$, 5 in 10 mmol kg^{-1} tal z dodatkom $0,1\%$ hidrogela ter EDDS v koncentracijah 0 , $2,5$, 5 , in 10 mmol kg^{-1} tal z dodatkom $0,2\%$ hidrogela, tako da smo na koncu imeli 48 kolon, katerih poskusna obravnavanja so bila izbrana z naključnim izborom.

Posamezna kolona je bila sestavljena iz podstavka s petimi odprtinami za cevke ter dveh PVC obročev višine 10 cm in premera 15 cm , ki smo jih med seboj zlepili s silikonskim gelom, spojni del pa zatesnili z gumijastim elastičnim trakom. Zatem smo na dno vsake kolone položili plastično mrežico z $0,2 \text{ mm}$ odprtnicami, ki je bila namenjena za zadrževanje talnih delcev. V odprtine na dnu vsake kolone smo namestili PVC cevke preko katerih se je v plastenke z volumnom $1,5 \text{ l}$ zbirala odcedna voda.

Kolone smo napolnili do višine 18 cm s 4600 g zračno suhih tal, ki smo jih prej presejali skozi 4 mm sito. V zgornji 8 cm sloj zemlje smo primešali 0 , $0,1\%$ ali $0,2\%$ hidrogela, da bi z njim povečali sposobnost zadrževanja vodne raztopine biološko razgradljivega liganda

v tleh. Tla v kolonah smo pred presaditvijo sadik zalili z 200 ml vode in 200 ml pripravljene hranilne raztopine in jih pustili dva tedna, da se stabilizirajo.

Tri tedne stare sadike testne rastline kitajskega kapusa, smo presadili na sestavljene kolone. Izbrali smo najlepše in najbolj izenačene sadike ter z žrebom za vsako sadiko naključno izbrali številko kolone kamor smo jo presadili. 23. dan po sajenju v kolone, smo za povečanje mobilnosti Pb, tlem dodali ligand EDDS, v koncentracijah 2,5, 5 in 10 mmol/kg tal z 200 ml deionizirane vode. Rastline smo 28. dan po presaditvi v kolone porezali 1 cm nad zemljo, jih dobro sprali z deionizirano vodo, jih dali v papirnate vrečke in sušili v sušilniku pri 30°C do popolne suhosti rastline oz. konstantne mase. Suhe vzorce rastlin smo stehali in jih zmleli v titanovem centrifugalnem mlinu. Mase stehanih suhih vzorcev rastlin so navedene v prilogi B. Tako pripravljene rastlinske vzorce smo uporabili v postopku mikrovalovnega razklopa z dušikovo kislino.



Slika 11: Kolonski poskus v rastlinjaku CPVO na Biotehniški fakulteti. Vse testne rastline so pred dodatkom liganda EDDS.

Kolone brez rastlin smo zalivali dvakrat tedensko v odmerkih 200 ml vodovodne vode na kolono in začeli z izpiranjem Pb iz tal. Plastenke z odcedno vodo smo izpraznili dvakrat, 14. in 28. dan po dodatku liganda. Odcedne vode smo filtrirali skozi filter papir Whatman No.1 ter jih shranili pri 4°C za nadaljne analize težkih kovin, izpranih iz tal. Volumi odcednih vod so navedeni v prilogi A. Po končanem poskusu smo kolone razdrli in volumne tal v posameznih obročih vzorčili in analizirali na vsebnost kovin.

3.5 ANALITSKE METODE

3.5.1 Analiza svinca v tleh – kislinski razklop

Za analizo koncentracij Pb v talnih vzorcih smo najprej vzorce tal zmleli v ahatnem mlinu (10 min) in nato presejali skozi sito z odprtnicami 150 μm . V reakcijsko posodo za razklop smo zatehtali 3 g vzorca, ga navlažili z 1 ml vode, mu med mešanjem dodali 2 ml solne kisline (HCl) in po kapljicah 7 ml dušikove kisline (65% HNO_3). Vzorec smo nato pustili stati 16 ur pri sobni temperaturi. Ko je pretekel čas smo vzorec 2 uri postopoma segrevali v posodi s povratnim hladilnikom in ga nato ohladili. S tem smo preprečili izgube v obliki hlapov. Ohlajeno vsebino posode smo nato prefiltrirali v 100 ml bučko in jo do oznake razredčili z deionizirano vodo. V ekstraktu smo izmerili Pb z metodo FAAS - plamensko atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo (atomska absorpcijska spektrofotometer 1100 B).

3.5.2 Analiza svinca v rastlinah – kislinski razklop

Zatehtali smo približno 0,3 g zmletega, zračno suhega rastlinskega vzorca, ga razredčili z 2 ml deionizirane vode in mu med mešanjem dodali še 2 ml dušikove kisline (65% HNO_3). Vzorce smo razkrojili v mikrovalovni pečici MDS-2000, CEM (s frekvenco mikrovalov 2450 MHz in nastavitvijo mikrovalovne moči 0-630 W). Vzorce smo nato ohladili do sobne temperature ter jih z deionizirano vodo razredčili do 25 ml. Vsebnost Pb v razklopu so določili sodelavci CPVO z metodo plamenske atomske absorpcijske spektrofotometrije (FAAS).

3.5.3 Analiza svinca v odcednih vodah

Pred analizo smo izmerili volumen odcednih vod (priloga A) in jih prefiltrirali s pomočjo vakumske črpalke skozi filter papir Whatman št. 1. Vsebnost Pb v odcednih vodah smo določali direktno z ICP – atomsko emisijsko spektrometrijo (Perkin-Elmer 1100 B Atomic Absorption Spectrophotometer). Za vsak vzorec vode sta se izvedli dve meritvi težkih kovin. Analizo so izvedli sodelavci CPVO. Kontrola analitskih postopkov je bila zagotovljena s slepimi vrednostmi in standardnim referenčnim materialom (BCR 60 in BCR 141R, Community Bureau of Reference).

3.5.4 Statistična analiza

Podatke meritev in kemijskih analiz smo statistično obdelali. Da bi lahko izvedli analizo variance, smo naredili 4 ponovitve za vsako poskusno kombinacijo. Statistično značilne razlike med obravnavaji smo ugotavljali po metodi analize variance (ANOVA) in Tukeyevega testa mnogoterih primerjav. Upoštevali smo 5% tveganje ($P=0,05$).

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 RAST IN RAZVOJ RASTLIN

Rastline so v kolonah prve tri tedne pred dodatkom liganda rastle hitro in izenačeno. Po dodatku različnih koncentracij ligandov pa so se pojavile razlike v izgledu med rastlinami. Na rastlinah v kolonah, katerim smo dodali najvišjo koncentracijo liganda, 10 mmol kg⁻¹ EDDS, so se pojavili vizualni simptomi toksičnosti. Skoraj v celoti so se začele sušiti in njihovi zunanji listi so čisto odmrli. Učinki liganda pa so bili močnejše razvidni tudi pri nižjih koncentracijah, saj so se po nekaj dneh po dodatku 5 mmol kg⁻¹ EDDS sprva pojavile kloroze oz. svetle lise nato pa so se listi tudi začeli sušiti, vendar v blažji obliki. Rastline, katerim smo dodali 2,5 mmol kg⁻¹ EDDS niso kazale vidnejših sprememb na zelenih delih glede na kontrolo. Slika 12 prikazuje učinke različnih koncentracij ligandov na testno rastlino kitajski kapus.



Slika 12: Učinek različnih koncentracij odmerkov EDDS na kitajski kapus. Od leve proti desni kontrola (brez dodatka liganda), 2,5 mmol, 5 mmol in 10 mmol kg⁻¹.



Slika 13: Odmiranje listov testne kastline, kateri smo dodali 10 mmol kg^{-1} EDDS.

4.2 MODIFIKACIJA SORPTIVNE KAPACITETE TAL ZA VODO Z DODATKOM HIDROGELA

Kot smo že omenili so hidrogeli zelo uporabni v kmetijstvu in hortikulturi saj povečujejo kapaciteto za zadrževanje vode, zmanjšujejo globoko pronicanje vode in minimizirajo izgube vodne raztopine z izpiranjem. Poljska kapaciteta tal za vodo (zmožnost tal da zadržijo gravitacijsko vodo) smo povečali iz začetnih 24,6% do 28,5% in nenazadnje do 31,3% vlage v tleh, ki smo jim dodali 0,1% in 0,2% (w/w) hidrogela. Dodatek hidrogela tlem zviša tudi točko veneja, to je količino vode dostopne rastlinam. Al-Darby (1996) ter Hüttermann in sod. (1999) so poročali, da se zadrževanje vode v tleh povečuje eksponencialno z višanjem koncentracij hidrogela. Naši rezultati kažejo manjšo učinkovitost hidrogelnega nosilca, najverjetneje zato, ker so imela tla uporabljena v našem poskusu naravno visoko kapaciteto za zadrževanje vode. Po opisu proizvajalca hidrogela, je maksimalna absorpcijska kapaciteta hidrogela za destilirano vodo veliko višja kot pa za raztopine. Zaradi tega so na CPVO testirali hidrogelsko sorpcijsko kapaciteto za različne koncentracije raztopin z ligandi. Ti testi so razkrili, da povečane koncentracije raztopin z ligandi, pomembno zmanjšajo sorptivno kapaciteto hidrogelov.

4.3 VSEBNOST SVINCA V ZELENIH DELIH TESTNE RASTLINE

Analiza s kislinskim razklopom posušenega in zmletega rastlinskega tkiva je pokazala, da dodatek biorazgradljivega liganda EDDS v tla poveča dostopnost in vnos Pb v zelene dele kitajskega kapusa (preglednica 4). Kot smo pričakovali smo največji učinek akumulacije Pb v zelene dele rastline dosegli z najvišjim odmerkom 10 mmol kg⁻¹ EDDS. Dosegli smo tudi 50,1-krat večji vnos Pb v testno rastlino, kot pri kontroli. Pri obeh manjših odmerkih liganda, 5 in 2,5 mmol kg⁻¹ EDDS, se je koncentracija Pb v zelenih delih rastline povečala bistveno manj, vendar je bila pri obeh skoraj enaka (slika 14). To je v nasprotju z rezultati, ki so jih pridobili Blaylock in sod. (1997), ki poročajo, da je vnos Pb v rastline linearno narašča s koncentracijo liganda.

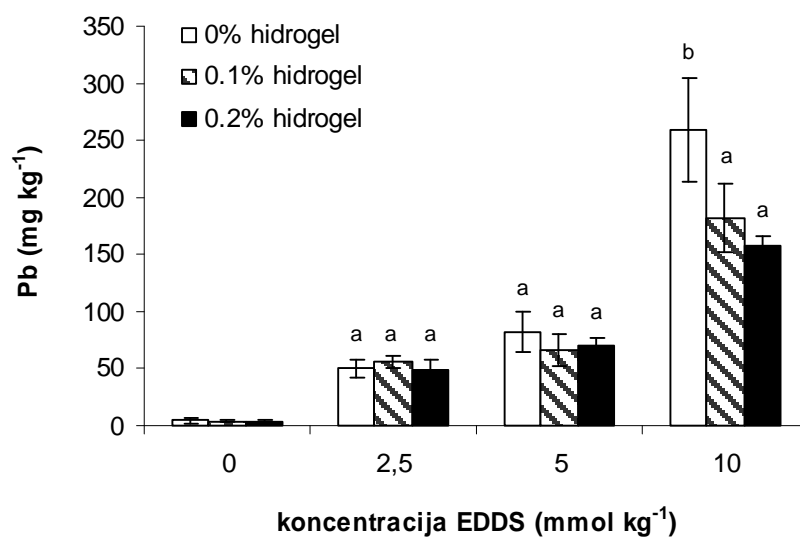
Največja koncentracija Pb v rastlinskih vzorcih je bila skoraj 260 mg kg⁻¹, kar pa je polovico manj kot pri obravnavanjih z EDTA, ko je koncentracija dosegla skoraj 500 mg kg⁻¹ suhe biomase rastline (Kos in Leštan, 2003). Manjša učinkovitost fitoekstrakcije Pb z [S,S]-EDDS, primerjalno z EDTA bi bila lahko posledica biorazgradljivosti EDDS.

0,1% in 0,2% dodatka hidrogela tlem ni imelo nobenega statistično značilnega vpliva na vnos Pb v rastlino v obravnavanjih z 2,5 in 5 mmol kg⁻¹ EDDS. V obravnavanjih z 10 mmol kg⁻¹ EDDS je koncentracija Pb v rastlinski biomasi upadala z naraščanjem količine hidrogela (slika 14). Koncentracije Pb v rastlinskih tkivih v obravnavanjih brez dodanega hidrogela, so bile statistično znatno višje kot v obravnavanjih, kjer smo dodali kolonom 0,2% hidrogela. Verjetno je hidrogel v tleh vsrkal del raztopine z ligandom in zmanjšal količino liganda proste za mobilizacijo Pb. V prilogi B so za vsako kolono razvidne vsebnosti Pb vnešenega iz tal v rastlinsko biomaso.

V vseh obravnavanjih, kjer smo dodali 10 mmol kg⁻¹ EDDS, so se pojavili na rastlinskih listih vizualni simptomi, kot so kloroze, sušenje zunanjih listov, itd. Toksični učinek je bil veliko manj izrazit pri obravnavanjih z nižjimi količinami liganda.

Preglednica 4: Povprečja koncentracij Pb in delež Pb v listih kitajskega zelja. Rezultate podajamo kot povprečje štirih ponovitev \pm standardna deviacija ($P=0.05$).

Koncentracija liganda	Hidrogel (%)	Pb v listih (mg kg^{-1})	Pb (%)
Kontrola	0	$5,16 \pm 2,57$	$<0,002$
	0,1	$4,11 \pm 0,71$	$<0,002$
	0,2	$3,97 \pm 1,04$	$<0,002$
EDDS $2,5 \text{ mmol kg}^{-1}$	0	$50,16 \pm 7,98$	$0,010 \pm 0,002$
	0,1	$56,14 \pm 4,83$	$0,012 \pm 0,001$
	0,2	$48,71 \pm 9,89$	$0,010 \pm 0,002$
EDDS 5 mmol kg^{-1}	0	$82,32 \pm 18,26$	$0,017 \pm 0,005$
	0,1	$66,28 \pm 13,65$	$0,013 \pm 0,003$
	0,2	$69,80 \pm 7,22$	$0,015 \pm 0,001$
EDDS 10 mmol kg^{-1}	0	$258,65 \pm 45,99$	$0,051 \pm 0,009$
	0,1	$181,82 \pm 30,33$	$0,037 \pm 0,006$
	0,2	$157,98 \pm 8,70$	$0,034 \pm 0,004$



Slika 14: Koncentracije Pb akumuliranega v nadzemnih rastlinskih tkivih kitajskega kapusa, kot odziv na dodajanje 0, 2,5, 5 in 10 mmol kg^{-1} [S,S]-EDDS. Tlem smo dodali 0, 0,1 in 0,2% (w/w) poliakrilamidnega hidrogela. Rezultate podajamo kot povprečje štirih ponovitev \pm standardna deviacija. a in b pa predstavljata statistično značilne razlike glede na Tukey-ev test ($P = 0.05$).

4.4 DINAMIKA IZPIRANJA SVINCA V IZCEDNIH VODAH

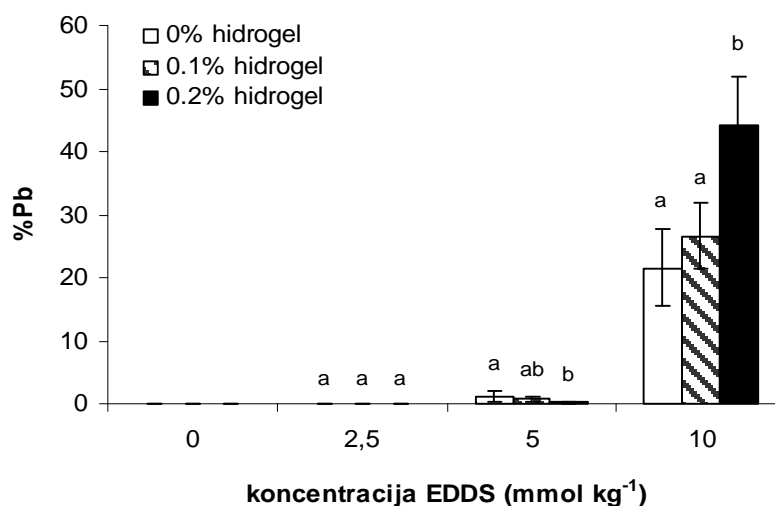
Poleg akumulacije Pb v testni rastlini smo merili tudi količine Pb, spranega z odcednimi vodami. Izprani Pb je bil v kontrolah (brez dodatka ligandov) ter v obravnavanjih, kjer smo v tla dodali najnižjo koncentracijo liganda $2,5 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$, s hidrogelom oz. brez njega, pod mejo detekcije inštrumentna ($<0,3 \text{ mg l}^{-1}$). Pb je ostal vezan na talne koloide in na hidrogel, zato pri kolonah s kontrolnimi obravnavanji ter pri dodatku najnižje koncentracije EDDS ni prišlo do njegovega izpiranja (slika 15). V obravnavanjih s $5 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$, se je izpralo le nekaj Pb, največ med prvima dvema tednoma po dodatku liganda. Kot je razvidno iz priloge C, so koncentracije Pb v izcednih vodah 4 tedne po dodatku liganda postopoma upadale, vendar pa je bil pri koncentraciji $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ in $0,2\%$ dodanega hidrogela zabeležen močan porast v prisotnosti Pb v izcednih vodah. Izpiranje Pb iz kolon s $5 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ in $0,2\%$ hidrogela je bilo statistično značilno manjše, kot pri tleh z isto koncentracijo EDDS, katerim nismo dodali nič hidrogela (preglednica 5). V tleh z dodatkom hidrogela se je izpralo le $0,2\%$ začetnega skupnega Pb. Majhno izpiranje Pb pri teh obravnavanjih je po vsej verjetnosti povezano z biorazgradljivostjo liganda EDDS. Ko se ioni Pb sprostijo iz kelatno-kovinskega kompleksa, se lahko trdno vežejo na talne delce in tako niso več podvrženi izpiranju. Povečana sorptivna kapaciteta tal za vodo ob dodatku hidrogela tlom po vsej verjetnosti povzroča daljše zadrževanje raztopine EDDS v tleh in tako še podaljša čas za razgradnjo.

Izpiranje Pb iz kolon s koncentracijami $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ je bilo veliko večje kot pri obravnavanjih z manjšimi koncentracijami liganda. Učinek dodatka hidrogela je bil nasproten kot pri obravnavanjih z nižjimi dodatki liganda. Dodatki hidrogela so povečali izpiranje Pb (preglednica 6, slika 15). Najvišja izmerjena koncentracija izpranega Pb je bila pri obravnavanju z $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ in dodatkom $0,2\%$ hidrogela, kjer se je po štirih tednih izpralo kar 44% vsega Pb. Domnevamo, da bi lahko bile večje koncentracije EDDS toksične za talne mikroorganizme. Na ta način bi prišlo do manjše mikrobiološke razgradnje liganda in njegovih kompleksov s TK. V tleh z dodatkom hidrogela se je večina Pb sprostila in sprala v zadnjih dveh tednih po dodatku ligandov, medtem ko se je v tleh brez dodatka hidrogelov, večina Pb sprala v prvih dveh tednih (preglednica 6).

V obravnavanjih z $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ in dodatkom hidrogela se je vnos Pb v rastlino zmanjšal (slika 15), medtem ko je isto obravnavanje vodilo do višjih količin sproščenega in biododstopnega Pb ter njegovega povečanega izpiranja. Možna razlaga tega rezultata je, da se je del raztopine EDDS-a zadržal s hidrogelom in ni bil dostopen za mobilizacijo Pb med fitoekstrakcijskim procesom, ampak je bil sproščen po žetvi rastlin.

Preglednica 5: Povprečne mase izpranega svinca po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda, skupna masa svinca ter masa preostalega svinca v koloni. Rezultate podajamo kot povprečje štirih ponovitev \pm standardna deviacij.

Obravnavanje		Povprečna masa izpranega Pb (mg)		Skupna masa Pb (mg)	Pb v koloni (mg)
EDDS (mmol kg ⁻¹)	Hidrogel (%)	2.teden	4. teden		
Kontrola	0	0,08 \pm 0,06	0,00 \pm 0,00	0	5060
	0,1	0,00 \pm 0,00	0,02 \pm 0,05	0	5060
	0,2	0,10 \pm 0,15	0,04 \pm 0,07	0	5060
2,5	0	0,14 \pm 0,11	0,00 \pm 0,00	0	5060
	0,1	0,07 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01	0	5060
	0,2	0,07 \pm 0,08	0,01 \pm 0,00	0	5060
5	0	60,06 \pm 51,32	0,75 \pm 0,50	61	4999
	0,1	38,33 \pm 23,25	1,12 \pm 0,79	39	5021
	0,2	8,86 \pm 6,99	1,65 \pm 1,48	11	5049
10	0	763,73 \pm 72,94	324,96 \pm 250,64	1089	3971
	0,1	663,43 \pm 52,22	685,43 \pm 231,33	1349	3711
	0,2	470,90 \pm 116,64	1764,03 \pm 478,02	2235	2825



Slika 15: Odstotek začetnega skupnega izpranega Pb v prvih štirih tednih po dodatku liganda. Od leve proti desni kontrola, 2,5, 5 in 10 mmol kg⁻¹ [S,S]-EDDS. Tlem je bilo dodanega 0, 0,1 in 0,2% (w/w) hidrogela. Rezultate predstavljamo kot povprečja štirih ponovitev \pm standardna deviacija. a in b pa predstavljata statistično različna obravnavanja glede na Tukey-ev test ($P=0.05$).

Preglednica 6: Odstotki skupnega izpranega svinca po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda ter totalni delež izpranega svinca. Rezultate podajamo kot povprečje štirih ponovitev \pm standardna deviacija.

Konc. liganda (mmol kg ⁻¹ tal)	Dodatek hidrogela (%)	% izpranega Pb		
		2. teden	4. teden	Skupaj
Kontrola	0	NZ	NZ	NZ
	0,1	NZ	NZ	NZ
	0,2	NZ	NZ	NZ
EDDS (2,5 mmol kg ⁻¹)	0	NZ	NZ	NZ
	0,1	NZ	NZ	NZ
	0,2	NZ	NZ	NZ
EDDS (5 mmol kg ⁻¹)	0	1,19 \pm 1,01	0,01 \pm 0,01	1,20 \pm 1,02
	0,1	0,79 \pm 0,46	0,02 \pm 0,02	0,78 \pm 0,46
	0,2	0,18 \pm 0,14	0,03 \pm 0,03	0,21 \pm 0,13
EDDS (10 mmol kg ⁻¹)	0	15,09 \pm 1,44	6,42 \pm 4,95	21,52 \pm 6,13
	0,1	13,11 \pm 1,03	13,55 \pm 4,57	26,66 \pm 5,25
	0,2	9,31 \pm 2,31	34,86 \pm 9,45	44,17 \pm 7,92

NZ ni zaznано

5 SKLEPI

Rezultati našega poskusa so pokazali, da dodatek najvišje koncentracije (10 mmol kg^{-1}) biorazgradljivega liganda EDDS brez dodatka hidrogela, poveča največ vnos Pb v rastlino. Vendar pa velike količine izpranega Pb pri obravnavanjih z 10 mmol kg^{-1} EDDS in 0,2% hidrogela po štirih tednih po dodatku liganda pomenijo, da te obravnave oz. koncentracije niso primerne za okoljsko varno fitoekstrakcijo. Dodatek največje koncentracije hidrogela (0,2%) kolonom pri dodatku največje koncentracije liganda (10 mmol kg^{-1}), ni imelo bistvene vloge, saj se je kapaciteta tal za zadrževanje vode zelo poslabšala ter se je s tem spralo več Pb kot pa v kolonah, kjer nismo dodali hidrogela. Izpiranje Pb iz tal, katerim smo dodali nižje koncentracije EDDS (5 mmol kg^{-1}), je bilo zelo majhno in je celo upadalo, ko smo kapaciteto tal za vodo izboljšali z dodatkom akrilamidnega hidrogela.

Majhen fitoekstrakcijski potencial rastlin je eden izmed osnovnih problemov pri fitoekstrakciji Pb. V nedavnih raziskavah so odkrili, da vnos genov za peptide oz. majhne proteine, ki vežejo TK, lahko poveča translokacijo in akumulacijo Cd v nadzemnih delih rastline tobaka (*Nicotiana tabacum*) (Kärenlampi in sod., 2000). Razvoj transgenih rastlin z veliko biomaso in zvišanim potencialom za hiperakumulacijo Pb je zato bistven za še bolj učinkovito in uspešno inducirano fitoekstrakcijo z biorazgradljivimi ligandi.

Naša raziskava da slutiti, da je uporaba biorazgradljivega liganda v kombinaciji z izboljšanjem bioloških in fizikalno-kemijskih lastnosti tal, lahko odločilnega pomena za kelatno kinetiko razgrajevanja in potemtakem tudi za izpiranje kelatno-kovinskega kompleksa skozi talni profil, ter za razvoj inovativnih tehnik uporabe ligandov oz. kontroliranega dodajanja ligandov. To bi lahko vodilo k okoljsko varni z ligandi povečani fitoekstrakcijski tehnologiji. Naša raziskava nam da vedeti, da uporaba sintetičnih akrilamidnih hidrogelov kot izboljševalcev lastnosti tal ni bila najbolj uspešna in je zato potrebno nadaljno raziskovanje v smeri preprečevanja izpiranja svinca (npr. uporaba aktivnih permeabilnih horizontalnih pregrad) v nižje plasti tal in podtalnico.

6 POVZETEK

Svinec prištevamo med TK. V tleh je naravno prisoten, vendar pa je njegova koncentracija v tleh pogosto povečana zaradi antropogenega onesnaževanja. Taka tla je potrebno zaradi nevarnosti, ki jo predstavljajo za zdravje ljudi, živali in rastlin, narediti okolju neškodljiva. Še posebno nevarnost predstavljajo TK ob ponavljajočih vnosih nizkih koncentracij, ki naj bi bile organizmu neškodljive. Ker pa se TK v organizmu kopičijo, lahko njihov dolgotrajen vnos privede do zastrupitev. V telo vstopajo preko hrane, ingestije onesnaženih tal in vdihavanjem prašnih talnih delcev. V visokih koncentracijah TK povzročajo deaktivacijo encimov, blokirajo funkcionalne skupine biološko pomembnih molekul, poškodujejo biomembrane, lahko zamenjajo druge za organizem potrebne kovinske ione ali povzročijo spremembo strukture bioloških molekul.

Ena izmed največjih omejitev fitoekstrakcije je premajhna topnost in mobilnost TK v tleh ter posledično premajhen sprejem le teh v rastline. Velik problem za fitoekstrakcijo je Pb, ki je v tleh močno vezan na organsko snov in glinene delce ter minerale, zaradi česar je njegova biodostopnost majhna. Do danes za Pb ne poznamo hiperakumulatorske rastline. Fitoekstrakcija Pb je tako možna le z inducirano fitoekstrakcijo, ki je ob uporabi liganda lahko učinkovita. Učinkovitost je odvisna predvsem od biomase uporabljene rastline in uspešnosti mobilizacije Pb s pomočjo ligandov.

Cilj diplomske naloge je bil ovrednotiti vpliv biološko razgradljivega liganda ([S,S'] EDDS) in vnosa akrilamidnega hidrogela v tla na izpiranje Pb iz tal ter sprejem v nadzemne dele testne rastline. V eksperimentalnem delu smo s Pb onesnaženim tlom (1100 mg kg^{-1}) iz Mežiške doline, dodali različne koncentracije raztopin EDDS ter hidrogela, ter merili učinkovitost akumulacije v nadzemne dele testne rastline kitajski kapus (*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*), ter izpiranje Pb iz kolon. EDDS je tvoril s Pb kompleks (koordinacijsko spojino), ki je v vodi topen in tako prevedel Pb iz trdne v tekočo fazo tal. Tako mobiliziran Pb je dostopen rastlinam, ki ga lahko akumulirajo. Na ta način smo odstranili le manjši del Pb iz tal. Ostali Pb se je premestil po talnem profilu navzdol.

Iz rezultatov analiz zelenih delov rastlin in odcednih voda smo ugotovili, da je imel dodatek največjega odmerka 10 mmol EDDS , največji učinek na akumulacijo oz. na izpiranje Pb. Rastline, katerim smo dodali največjo koncentracijo 10 mmol EDDS in nič hidrogela, so v svojih zelenih delih akumulirale največ Pb, skoraj 260 mg Pb na kg suhe snovi. Učinek dodatka hidrogela je bil nasproten pričakovanemu saj je bilo izpiranje Pb iz kolon s koncentracijami $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ veliko večje kot pri obravnavanjih z manjšimi koncentracijami liganda. Dodatki hidrogela so povečali izpiranje Pb. Najvišja izmerjena koncentracija izpranega Pb je bila pri obravnavanju z $10 \text{ mmol EDDS kg}^{-1}$ in dodatkom $0,2\%$ hidrogela, kjer se je po štirih tednih izpralo kar 44% vsega Pb.

Tretje hipoteza, kjer smo predvideli, da z dodatkom akrilamidnega hidrogela tlem, lahko dosežemo počasnejše sproščanje EDDS, kar naj bi omejilo spiranje Pb iz tal in ga obenem naredilo bolj dostopnega rastlinam se torej ni uresničila, saj se je ob dodatku $0,2\%$ hidrogela izpralo največ Pb.

7 VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

Adriano D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, Springer-Verlag: 533 str.

Agencija Republike Slovenije za Okolje.

http://www.arso.gov.si/podro~cja/tla/poro~cila_in_publikacije/ROTS2005.pdf
(19.1.2007)

Al-Darby A.M. 1996. The hydraulic properties of sandy soil treated with gel-forming soil conditioner. *Soil & Technology*, 9: 15-28.

Alloway B.J. 1990. The origin of heavy metals in soils. V: Heavy metals in soils. Alloway B.J. (ed.). London, New York, Wiley: 29-39.

Blaylock M.J., Salt D.E., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B.D. and Raskin I., 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology*, 31: 860-865.

Bolton H., Gorby Y.A. 1995. An overview of the bioremediation of inorganic contaminants. V: Bioremediation of inorganics. Hinchee R.E. in Burris D.R. (eds.). Collumbus, Ohio, Battelle Press: 1-17.

Bucheli–Witschel M. and Egli T. 2001: Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiological Reviews*, 25: 69-106.

Cooper E. M., Sims J. T., Cunningham S.D., Huang J.W. and Berti W.R. 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1709-1719.

Council Directive 86/278/EEC 1986: On the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *EC Official Journal*, L181.

Cunningham S.D., Berti W.R. 1999. V: Phytoremediation of contaminated soil and water. Terry N., Banuelos G.S., (eds.). Boca Raton, CRC: 359-376.

Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13: 393-397.

Eriksson J. E., 1989. The influence of pH, soil type and time of adsorption and uptake by plants of Cd added to the soil. *Water, Air, Soil Pollution*, 48: 317 – 335.

Flathman P. E., Lanza G. R. 1998. Phytoremediation: Current views on an emerging green technology. *Journal of Soil Contamination*, 7: 415-432.

Garbisu C., Alkorta I. 2001. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77: 229-236.

Grčman H., Vodnik D., Velikonja-Bolta Š., Leštan D. 2003: Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 32: 500-506.

Hartman F.A., Perkins C.M. 1987. Detergent composition containing ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid. US Patent No. 4704233.

Huang J.W., Chen J. and Cunningham S.D. 1997. Phytoextraction of lead from contaminated soils. *Environmental Remediation*, 21: 283-298.

Huang J.W., Chen J., Berti W.R., Cunningham S.D. 1997. Phytoremediation of lead contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science & Technology* 3. 800-805.

Huang J.W. and Cunningham S.D. 1996. Lead phytoremediation: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134: 75-84.

Hütterman A., Zommodi M. and Reise K. 1999. Addition of hydrogels to soil for prolonging the survival of *Pinus Halepensis* seedling subjected to drought. *Soil Tillage Research*, 50, 295-304.

Jaworska J. W., Schowanek D., Fejtel T.C.J. 1999. Environmental risk assessment for trisodium (S,S)-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent application. *Chemosphere*, 38: 3597-3625.

Jones P.W., Williams D.R. 2001. Chemical speciation used to assess [S,S']-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) as a readily-biodegradable replacement for EDTA in radiochemical decontamination formulations. *Applied Radiation and Isotopes*, 54: 587-593.

Kärenlampi S., Schat H., Vagrönsvel J., Verkleij J.A.C., van der Lelie D., Mergeay M. and Tervahauta A.I. 2000. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* 107, 225-231.

Kos B. 2004. Inducirana fitoekstrakcija z *in situ* izpiranjem svinca iz onesnaženih tal. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za agronomijo: 90 str.

Kos B., Leštan D. 2003: Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers. *Environmental Science & Technology*, 37: 624-629.

Kos B., Leštan D. 2003: Influence of a biodegradable (S,S-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant and Soil*, 253: 403-411.

Lasat M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31:295-304.

Leštan D. 1999. Osnove toksikologije in ugotavljanja tveganja. V: Študijsko gradivo za dodiplomski študij ekopedologije. Leštan D. (ed.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za agronomijo (interno gradivo).

Leštan D. 2000. Študijsko gradivo za dodiplomski študij ekopedologije. Leštan D. (ur). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za agronomijo (interno gradivo).

Leštan D., Grčman H. 2001. Speciation of lead, zinc and cadmium in contaminated soils from Mežica valley. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo*, 77: 205-214.

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 Contaminants*, 12: 507-522.

Levy D.B., Barbarick K.A., Siemer E.G., Sommers L.E. 1992. Distribution and partitioning of trace metals in contaminated soils near Leadville, Colorado. *Journal of Environmental Quality*, 21: 185-195.

Lombi E. 2001. Role and management of rhizosphere processes in phytoremediation. V: »IP Socrates Vienna 2001« (Gradivo razdeljeno na predavanju).

Mengel K., Kirkby E.A. 1987. Principles of plant nutrition. Worblaufen-Bern/Switzerland, International Potash Institute: 686 str.

Ministrstvo za Okolje in Prostor.

<http://www.gov.si/mop/zakonodaja/okolje.htm> (19.1.2007)

Mulligan C.N., Young R.N., Gibbs B.F. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60: 193-207.

Nishikiori T., Okuyama A., Naganawa T., Hamida M., Takeuchi T., Aoyagi T. And Umezawa H. 1984. Production of actinomycetes of (S,S)-N,N'-ethylenediamine-disuccinic acid, an inhibitor of phospholipase. *Journal of Antibiotics*, 37: 426-427.

Norwell W.A. 1984. Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. *Soil Science Society of America Journal*, 48: 1285-1292.

Nowack B., Tandy S., Bossart K., Mueller R., Ritschel J., Hauser L., Scgulin R. 2003. Remediation of heavy metal polluted soils using biodegradable chelating agent S,S'-EDDS.

Oliver M.A. 1997. Soil and human health: A review. *European Journal of Soil Science*, 48: 573-592.

Polyacrylates.

<http://www.pslc.ws/mactest/acrylate.htm> (11.6.2007)

Puschenreiter M. 2003. Rhizosphere processes involved in phytoremediation of contaminated soils. V: »Seminar na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, 2003« (Gradivo razdeljeno na seminarju).

Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., Salt E.A. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 285-290.

Ross S.M. 1994. V: Toxic metals in soil plant sistem. New York, John Wiley and Sons: 469 str.

Ruby M.V., Schoof R., Brattin W., Goldade M., Post G., Harnois M., Mosby D.E., Casteel S.W., Berti W., Carpenter M., Edwards D., Cragin D. and Chappell W. 1999. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science & Technology*, 32: 3697-3705.

Rudzinski W.E., Dave A.M., Vaishnav U.H., Kumbar S.G., Kulkarni A.R., Aminabhavi T.M. 2002. Hydrogels as controlled release devices in agriculture. *Designed Monomers and Polymers*, 5, 1: 39-65.

Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annual review. Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643-668.

Schowaneck D., Feijtel T.C.J., Perkins C.M., Hartman F.A., Federlen T.W. and Larson R.J., 1997. Biodegradation of [S,S], [R,R] and mixed stereoisomers of ethylene diamine disuccinic acid (EDDS), a transition metal chelator. *Chemosphere*, 34, 11: 2375-2391.

Skoog D. A., West D.M., Holler F.J. V: 1988 Analytical Chemistry. New York, Chicago, San Francisco, Sunderes College Publishing: 894 str.

Smith L.A., Houthoofd J.M. 1996. Considerations in deciding to treat contaminated soils in situ. *Bioremediation of Inorganic*, 43: 149-163.

Taylor G.J. 1987. Exclusion of metals from symplas: A possible mechanism of metal tolerance in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 10: 1213-1222.

University of Bristol, School of Chemistry.
<http://www.chm.bris.ac.uk> (11.6.2007)

Uradni list Republike Slovenije, Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Ur.l. RS št. 68/1996
<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=199668&stevilka=3722> (11.1.2007)

Vandevivere P.C., Saveyn H., Verstraete W., Feijtel T.C.J. and Schowanek D.J. 2001b. Biodegradation of metal-[S,S]-EDDS complexes. *Environmental Science & Technology*, 35: 1765-1770.

Vangronsveld J., Clijsters H. 1994. Toxic effects of metals. V: *Plant and the Chemical Elements*. Farago M.G., Weinheim V.C.H. (eds.). New York, Basel: 147-177.

Vidic Jaecks N. 1995. Material za vaje iz geologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Katedra za pedologijo, prehrano rastlin in ekologijo (interno gradivo).

Vidic N.J., Ivacič M., Zupan M. 1997. A case study of heavy metal pollution along roadways in Slovenia. V: *Fourth international conference on the biogeochemistry of trace elements*, 23-26. junij 1997. Berkley, California. Iskander I.K., Hardy S.E., Chang A.C., Pierzyski (eds.). Extended abstracts: 45-46.

Wenzel W.W., Adriano D.C., Salt D.E., Smith L.A. 1999. Phytoremediation: A plant-microbe-based remediation system. *Agronomy Monograph*, 37: 457-508.

Wu J., Hsu F.C., Cunningham S.D. 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation. *Environmental Science & Technolgy*, 33: 1898-1904.

Zaleznik V. 2002. Uporaba hidrogelnih nosilcev za aplikacijo etilen diamin tetraacetata pri fitoekstrakciji tal onesnaženih s svincem, Diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Oddelek za agronomijo: 52 str.

Zupan M. 1999. Vpliv emisij iz deponije žlindre na Javorniku, na kvaliteto tal (poročilo). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Center za pedologijo in varstvo okolja: 20 str.

Zupan M. 2006. Raziskave onesnaženosti tal Slovenije (poročilo za leto 2005). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, BF, Center za pedologijo in varstvo okolja: 122 str.

Xiong Z.-T. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hiperaccumulator *Brassica Pekinensis* Rupr. *Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 285-291.

7.2 OSTALI VIRI

Grčman H., Velikonja-Bolta Š., Vodnik D., Kos B. and Leštan D. 2001: EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil*, 235: 105-114.

Hudnik V., Zupan M., Lobnik F., Kozak Legiša Š. 1994. Bioavailability assessments of Cd, Zn and Pb in polluted soils with the indicator plant (*Plantago lanceolata* L.). *Environmental Geochemistry and Health*, 16: 39-51.

ISO/DIS 11047. Soil quality - Determination of cadmium, chromium, cobalt, copper, lead, manganese, nickel and zinc - Flame and electrothermal atomic absorption spectrometric methods. 1995: 7 str.

Lobnik F., Zupan M., Hudnik V., Vidic N.J. 1994. Soil and Plant Pollution Case Study in Industrial Areas of Slovenia, Biogeochemistry of trace elements. *Environmental Geochemistry and Health*, 16: 287-300.

Salt D.E., Blaylock M., Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. 1995: Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Biotechnology*, 13: 468-474.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Domnu Leštanu za mentorstvo ter dr. Boštjanu Kosu za strokovno pomoč pri izvedbi poskusa.

Za mnoge koristne nasvete ter pomoč se zahvaljujem tudi sodelavcem iz Centra za pedologijo in varstvo okolja Biotehniške fakultete.

Prav tako se zahvaljujem mojim najbližjim za potrpežljivost in vzpodbudo.

Priloga A

Volumi odcednih vod, ki smo jih zbirali v 1,5 l plastenke po dveh tednih in po štirih tednih po dodatku liganda EDSS

Varianta		Št.kolone	Volumen odcednih vod [L]	
Hidrogel %	EDDS (mmol/kg)		2. teden	4. teden
0	0	9	0,490	0,300
		13	0,780	0,225
		22	0,505	0,235
		45	0,325	0,180
0,1	0	2	0,320	0,345
		37	0,480	0,065
		40	0,385	0,250
		47	0,305	0,125
0,2	0	16	0,280	0,235
		36	0,350	0,060
		43	0,320	0,070
		46	0,575	0,235
0	2,5	4	0,500	0,330
		12	0,595	0,325
		18	0,550	0,140
		35	0,535	0,170
0,1	2,5	17	0,275	0,135
		19	0,340	0,230
		20	0,275	0,135
		48	0,255	0,090
0,2	2,5	3	0,545	0,415
		28	0,325	0,055
		29	0,350	0,150
		30	0,390	0,100
0	5	15	0,690	0,365
		38	0,690	0,120
		41	0,480	0,135
		44	0,505	0,130
0,1	5	11	0,405	0,385
		14	0,580	0,395
		32	0,490	0,140
		33	0,385	0,155
0,2	5	1	0,210	0,280
		27	0,210	0,230
		31	0,290	0,145
		42	0,220	0,165
0	10	6	0,760	0,490
		7	0,795	0,400
		23	0,830	0,300
		34	0,815	0,160
0,1	10	5	0,645	0,485
		25	0,540	0,180
		26	0,580	0,220
		39	0,675	0,235
0,2	10	8	0,350	0,400
		10	0,360	0,430
		21	0,510	0,350
		24	0,330	0,340

Priloga B

Masa zračno suhe, zelene snovi rastlin ter vsebnost svinca (mg) v nadzemnih delih kitajskega kapusa

Varianta		Št.kolone	Masa suhe snovi [g]	Masa Pb v rastlini [mg]
Hidrogel %	EDDS (mmol/kg)			
0	0	9	11,81	0,026
		13	10,21	0,052
		22	10,9	0,054
		45	9,67	0,082
0,1	0	2	12,62	0,051
		37	12,66	0,045
		40	13,37	0,069
0,2	0	47	12,66	0,047
		16	12,87	0,050
		36	9,72	0,025
0	2,5	43	12,03	0,057
		46	12,86	0,061
		4	10,07	0,418
0,1	2,5	12	10,32	0,597
		18	10,13	0,460
		35	10,18	0,569
		17	11,18	0,564
0,2	2,5	19	10,54	0,592
		20	11,54	0,719
		48	10,86	0,605
		3	11,12	0,561
0	5	28	10,93	0,378
		29	10,98	0,631
		30	9,37	0,491
		15	9,47	0,673
0,1	5	38	10,92	1,193
		41	10,02	0,781
		44	10,68	0,758
		11	10,51	0,539
0,2	5	14	9,33	0,560
		32	10,75	0,764
		33	10,26	0,849
		1	10,52	0,774
0	10	27	11,44	0,724
		31	10,72	0,689
		42	10,78	0,842
		6	9,9	2,899
0,1	10	7	9,83	1,946
		23	10,02	2,964
		34	9,94	2,465
		5	10,04	1,693
0,2	10	25	9,58	1,813
		26	10,59	2,331
		39	10,92	1,630
		8	10,67	1,715
0,2	10	10	11,24	1,834
		21	9,97	1,446
		24	11,54	1,881

Priloga C

Mase izpranega svinca po posameznih kolonah, po prvih dveh tednih in četrti teden po dodatku liganda ter skupna masa izpranega svinca.

Varianta		Št.kolone	Masa izpranega Pb (mg)		Skupna masa izpr. Pb
Hidrogel %	EDDS (mmol/kg)		2. teden	4. teden	
0	0	9	0,095	0,000	0,09
		13	0,155	0,000	0,16
		22	0,049	0,000	0,05
		45	0,008	0,000	0,01
0,1	0	2	0,000	0,094	0,09
		37	0,000	0,000	0,00
		40	0,000	0,000	0,00
0,2	0	47	0,000	0,000	0,00
		16	0,000	0,143	0,14
		36	0,104	0,003	0,11
0	2,5	43	0,312	0,000	0,31
		46	0,000	0,000	0,00
		4	0,019	0,000	0,02
0,1	2,5	12	0,145	0,000	0,14
		18	0,092	0,000	0,09
		35	0,286	0,000	0,29
		17	0,085	0,024	0,11
0,2	2,5	19	0,104	0,030	0,13
		20	0,051	0,013	0,06
		48	0,047	0,018	0,07
		3	0,193	0,007	0,20
0	5	28	0,033	0,014	0,05
		29	0,036	0,018	0,05
		30	0,030	0,011	0,04
		15	129,375	1,358	130,73
0,1	5	38	67,620	0,463	68,08
		41	28,080	0,957	29,04
		44	15,150	0,239	15,39
		11	22,478	2,017	24,49
0,2	5	14	72,500	1,351	73,85
		32	33,320	0,990	34,31
		33	25,025	0,121	25,15
		1	4,620	3,842	8,46
0	10	27	11,025	1,185	12,21
		31	17,690	0,963	18,65
		42	2,090	0,602	2,69
		6	805,600	482,160	1287,76
0,1	10	7	781,485	558,800	1340,29
		23	811,740	257,100	1068,84
		34	656,075	1,760	657,84
		5	735,300	962,725	1698,03
0,2	10	25	622,620	789,660	1412,28
		26	668,740	496,540	1165,28
		39	627,075	492,795	1119,87
		8	416,500	1616,000	2032,50
0,2	10	10	416,520	2379,190	2795,71
		21	645,660	1233,750	1879,41
		24	404,910	1827,160	2232,07