

1. Dan MR O-2

**1. Dan mladih raziskovalk in mladih raziskovalcev
na
Odseku za znanosti o okolju (O-2)**

19. april 2006

pričetek ob 9.00

**Velika predavalnica
Izobraževalnega centra za jedrsko tehnologijo Milana Čopiča**

ZBORNİK PRISPEVKOV

Uredila: Milena Horvat in Ivan Kobal

Tehnično uredil: Marjan Verč

1st MR O-2

**First One-day Meeting of Research Students
at the Department of Environmental Sciences (O-2)**

April 19, 2006

Beginning at 9.00 a. m.

**Large Lecture Room
Milan Čopič Nuclear Training Centre**

BOOK OF CONTRIBUTIONS

Editors: Milena Horvat and Ivan Kobal

Technical editor: Marjan Verč

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

	ime	naslov	ura
1. Biološki učinki onesnažil in biomonitoring voditeljica: Milena Horvat			
1.1	Nataša Nolde	Pretvorbe živega srebra (Hg) in njegovi učinki na kopenske rake enakonožce (Isopoda, Crustacea)	9.00
1.2	Darija Gibičar	Ocena bioloških kazalcev ledvičnih poškodb in oksidativnega stresa pri poklicni in splošni izpostavljenosti živemu srebru	9.30
1.3	Suzana Žižek	Vloga perifitona pri pretvorbah živega srebra v rečnih ekosistemih, obremenjenih z živim srebrom	10.00
1.4	Tanja Mrak	Arzen in njegove interakcije v lišajskih steljkah	10.30
2. Analizne metode voditeljica: Radmila Milačič			
2.1	Urška Repinc	Razvoj postopkov za določanje sledov nekaterih elementov z NAA na osnovi induciranih kratkoživih nuklidov	12.00
2.2	Andrej Osterc	Razvoj metode za določanje ^{129}I v vzorcih iz okolja	12.30
2.3	Blaž Kralj	Speciacija aluminija v čaju	13.00
2.4	Tadeja Milivojevič Nemanič	Primerjava ekstrakcijskih metod za določanje organokositrovih spojin v sedimentih in školjkah v morskem okolju	13.30
2.5	Simona Murko	Uporaba matričnih modifikatorjev za določanje Cd, Pb in As v sedimentih z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo	14.00
3. Kroženje snovi v porečjih voditeljica: Nives Ogrinc			
3.1	Tjaša Kanduč	Kroženje ogljika v rečnih sistemih (reka Sava v Sloveniji)	15.00
3.2	David Kocman	Razvoj erozijskega modela za transport živega srebra v porečju Idrije	15.30
3.3	Roland Markovics	Geochemical investigation of the Sava river basin: Stable isotope approach	16.00
4. Ocena vplivov na okolje voditelj: Branko Kontić			
4.1	Davor Kontić	Industrijsko tveganje in upravljanje z okoljem	16.30
4.2	Špela Uršej	Vloga lastnosti prostora na površju pri usmerjanju postopka iskanja lokacije posega v podzemlju	17.00
5. Okoljske tehnologije voditelj: Branko Kontić			
5.1	Tina Kosjek	Odstranjevanje ostankov zdravilnih učinkovin na čistilnih napravah	17.30

1st MR O-2, April 19, 2006

	name	title	time
1. Biological effects of contaminants and biomonitoring			
Chairperson: Milena Horvat			
1.1	Nataša Nolde	Transformations and effects of mercury (Hg) on terrestrial isopods (<i>Isopoda, Crustacea</i>)	9.00
1.2	Darija Gibičar	Evaluation of biomarkers of kidney damage and oxidative stress in populations occupationally and generally exposed to mercury	9.30
1.3	Suzana Žižek	The role of <i>periphyton</i> in mercury transformations in river ecosystems polluted with mercury	10.00
1.4	Tanja Mrak	Interactions of arsenic in lichen <i>thalli</i>	10.30
2. Analytical methods			
Chairperson: Radmila Milačič			
2.1	Urška Repinc	Development of procedures for determination of some trace elements <i>via</i> induced short-lived nuclides using neutron activation analysis	12.00
2.2	Andrej Osterc	Development of a method for ¹²⁹ I determination and its application to environmental samples	12.30
2.3	Blaž Kralj		13.00
2.4	Tadeja Milivojevič Nemanič	Comparison of various extraction methods for the determination of organotin compounds in sediments and mussels from the marine environment	13.30
2.5	Simona Murko	Use of various matrix modifiers for the determination of Cd, Pb and As by ETAAS in sediment	14.00
3. Mass cycling in river catchments			
Chairperson: Nives Ogrinc			
3.1	Tjaša Kanduč	Carbon cycling in river systems (River Sava in Slovenia)	15.00
3.2	David Kocman	Development of an erosion model for transport of mercury in the Idrijca catchment – GIS based soil erosion model	15.30
3.3	Roland Markovics	Geochemical investigation of the Sava river basin: a stable isotope approach	16.00
4. Assessment of environmental impact			
Chairperson: Branko Kontić			
4.1	Davor Kontić	Hazardous industrial installations and environmental management	16.30
4.2	Špela Uršej	The role of surface characteristics in directing underground spatial planning processes	17.00
5. Environment-friendly technologies			
Chairperson: Branko Kontić			
5.1	Tina Kosjek	Removal of pharmaceutical residues from pilot waste water treatment plants	17.30

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

1. Biološki učinki onesnažil in biomonitoring

1.1. Pretvorbe živega srebra (Hg) in njegovi učinki na kopenske rake enakonožce (Isopoda, Crustacea)

Nataša Nolde

Institutska mentorica: Milena Horvat

Fakultetna mentorica: Damjana Drobne, Oddelek za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

V posebnem poskusnem sistemu smo s pomočjo radioaktivnega sledilca (^{203}Hg) študirali pretvorbe anorganskega živega srebra ($^{203}\text{Hg}^{2+}$) (redukcijo do hlapnega $^{203}\text{Hg}^0$ in metilacijo do organskega Me^{203}Hg) v *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) in v njegovem okolju (hrana, iztrebki) ter asimilacijo in porazdelitev T^{203}Hg in Me^{203}Hg po živali. V nadaljevanju smo ugotavljali učinek povišanih koncentracij Hg^{2+} v hrani na (1) prehranjevalno aktivnost *P. scaber* (standardni laboratorijski toksikološki testi) in (2) stabilnost lizosomske membrane (SLM) na celotnih prebavnih žleznih cevkah *P. scaber*. SLM smo ocenjevali z oceno lizosomske latence (LL) in oceno zadrževalnega časa (retence) barvila nevtral rdeče v lizosomih (NRR). Ocenjevanje SLM smo izvedli še na živalih iz neonesnažene (Maribor) in onesnaženih (Idrija, Velenje) lokacij po Sloveniji. Dnevni potek in količina nastalega $^{203}\text{Hg}^0$ je odvisna od koncentracije $^{203}\text{Hg}^{2+}$ na listih. Pomembno vlogo pri redukciji $^{203}\text{Hg}^{2+}$ imajo predvsem prvi dan poskusa bakterije v okolju; prispevek črevesne mikroflore *P. scaber* je neznat. V vlažnem okolju se do $^{203}\text{Hg}^0$ pretvori 15 do 35 – krat več $^{203}\text{Hg}^{2+}$ kot v suhem okolju. Živali iz hrane v dveh tednih asimilirajo približno 3% T^{203}Hg in le 2% Me^{203}Hg . Nizko asimilacijo Me^{203}Hg in primanjkljaj v seštevku asimilirane in izločene količine Me^{203}Hg v primerjavi s pojedeno lahko razložimo s predpostavko, da v prebavilu *P. scaber* prevladuje demetilacija Me^{203}Hg nad metilacijo $^{203}\text{Hg}^{2+}$. Prehranjevalna aktivnost živali 5 tednov laboratorijsko izpostavljenih povišanim koncentracijam Hg^{2+} v hrani se ne zmanjša v primerjavi s kontrolno skupino niti pri 300 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ suhe teže, medtem ko se SLM zniža že po 3 dneh izpostavitve 5 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$. Lizosomi hepatopankreasa laboratorijsko izpostavljenih živali (5 in 50 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$) so bili bolj prizadeti od lizosomov živali iz Idrije (260 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$ hrane, 1600 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$ prsti), kar kaže na odpornost živali iz okolja na Hg in/ ali nižjo dostopnost Hg iz okolja. SLM živali iz Velenja (0,010-0,028 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$ hrane, 1,17 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$ prsti) je bila najnižja, najverjetneje zaradi sinergističnega učinka onesnažil, katerih izvor so emisije termoelektrarne Šoštanj.

1st MR O-2, April 19, 2006

1. Biological effects of contaminants and biomonitoring

1.1. Transformations and effects of mercury (Hg) on terrestrial isopods (Isopoda, Crustacea)

Nataša Nolde

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Milena Horvat

Supervisor at the university: Damjana Drobne, Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Transformations of inorganic mercury ($^{203}\text{Hg}^{2+}$) (reduction to $^{203}\text{Hg}^0$ and methylation to organic Me^{203}Hg) in *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) and its environment were studied, using a purpose - built experimental set-up where Hg cycling was followed using $^{203}\text{Hg}^{2+}$ tracer, including assimilation and distribution of T^{203}Hg and Me^{203}Hg in the animals at low Hg concentrations (0.5 and 5 $\mu\text{g Hg/g}$). In continuation, the effects of elevated concentrations of Hg^{2+} in the food on (1) feeding activity by standard laboratory toxicity test protocols, and (2) on the lysosomal membrane stability (LMS) of *P. scaber* digestive gland tubes (hepatopancreas) *in toto*, by lysosomal latency (LL) assay and the neutral red retention (NRR) assay were investigated. LMS was assessed on animals exposed in the laboratory to elevated Hg concentrations in their food, and animals collected at unpolluted (Maribor) and polluted (Idrija, Velenje) locations in Slovenia. The formation of $^{203}\text{Hg}^0$ depended on the $^{203}\text{Hg}^{2+}$ concentration in the leaves, moisture and bacteria, which had an important role in reduction of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ to $^{203}\text{Hg}^0$, especially in the first day of the experiment. The contribution of the isopod's digestive flora to reduction was negligible compared to the reduction of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ to $^{203}\text{Hg}^0$ in the environment. Approximately 3 % of T^{203}Hg and only 2 % of Me^{203}Hg consumed was assimilated by the animals. The low Me^{203}Hg assimilation and the loss of Me^{203}Hg when comparing assimilated and excreted Me^{203}Hg versus consumed Me^{203}Hg may be explained by the assumption that demethylation of MeHg prevailed over methylation of Hg^{2+} in the animal's digestive system. Feeding activity of laboratory animals fed with 300 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ dry weight for five weeks was not significantly affected compared to the control group of animals. However, LMS decreased already after 3 days of exposure to 5 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight. LMS in the hepatopancreas of animals from a highly mercury polluted environment (260 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of food, 1600 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of soil) was less affected than in laboratory animals fed with 5 and 50 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight for three days. This probably indicates tolerance of *P. scaber* to mercury in the mercury polluted environment and/ or lower bioavailability of environmental Hg. In animals from Velenje (0.010–0.028 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of food, 1.17 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of soil) LMS was severely affected, most probably due to the synergistic effect of pollutants originating from Šoštanj thermal power plant emissions.

Pretvorbe živega srebra (Hg) in njegovi učinki na kopenske rake enakonožce (Isopoda, Crustacea)



Mlada raziskovalka: Nataša Nolde

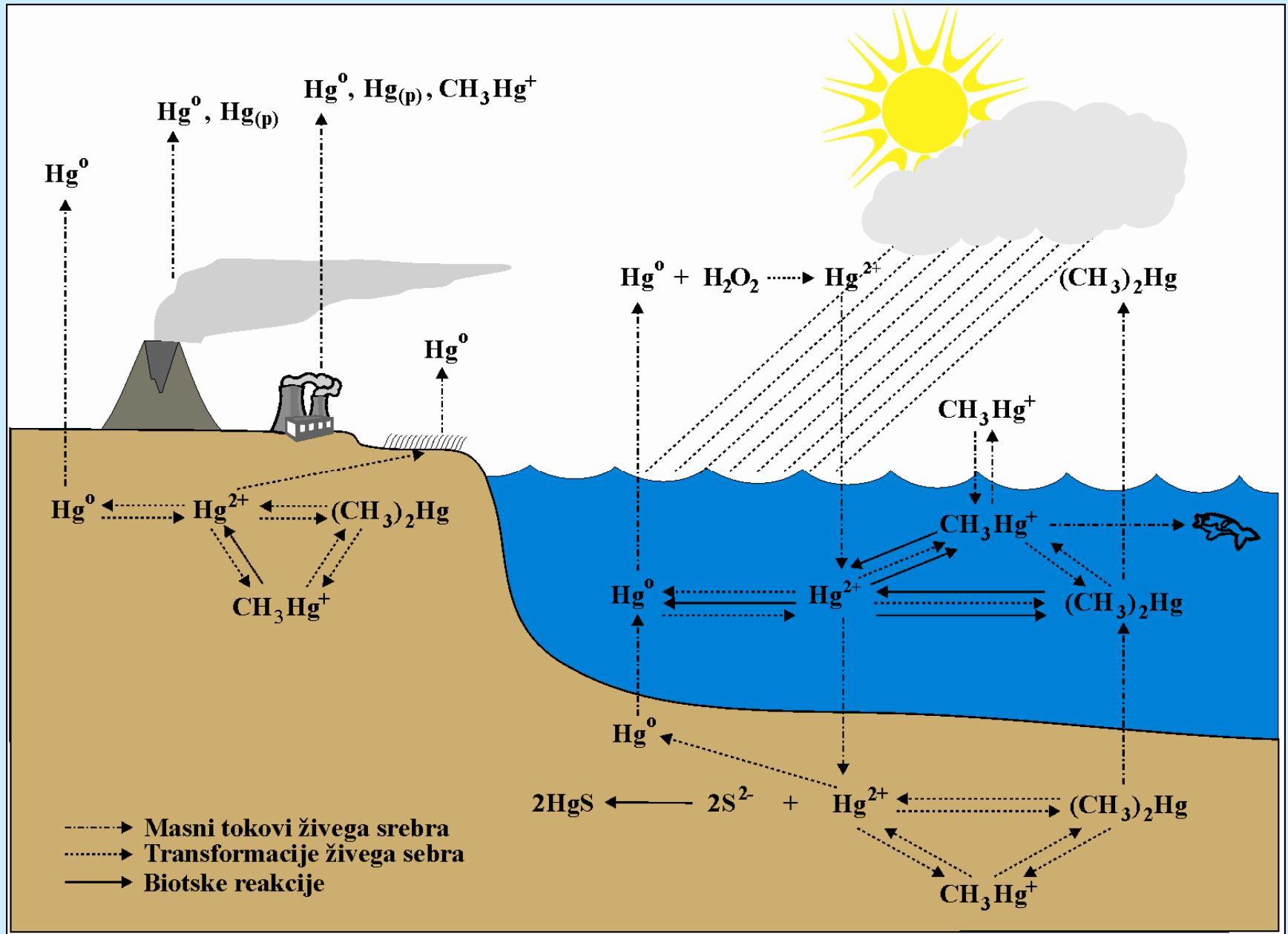
Institutska mentorica:izr. prof. dr. Milena Horvat

Fakultetna mentorica:izr. prof. dr. Damjana Drobne

(Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo)



Biogeokemijski cikel Hg v okolju (Mason in Fitzgerald, 1996)

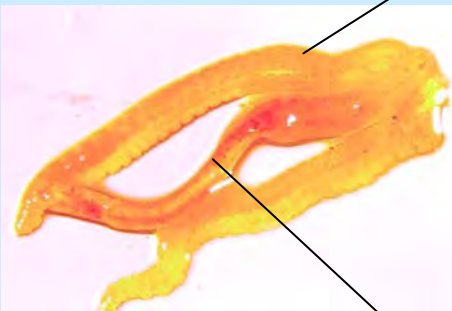


Porcellio scaber, Isopoda, Crustacea

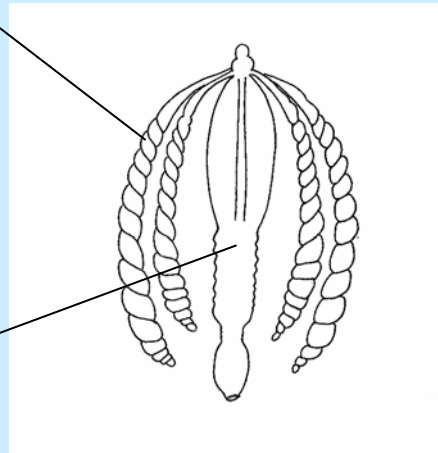


- eden najbolj proučevanih organizmov na področju kopenske ekofiziologije in ekotoksikologije
- razgradnja organske snovi
- kroženje snovi in pretok energije v kopenskih ekosistemih (črevesne bakterije!)

Prebavna žleza (hepatopankreas)



Črevo

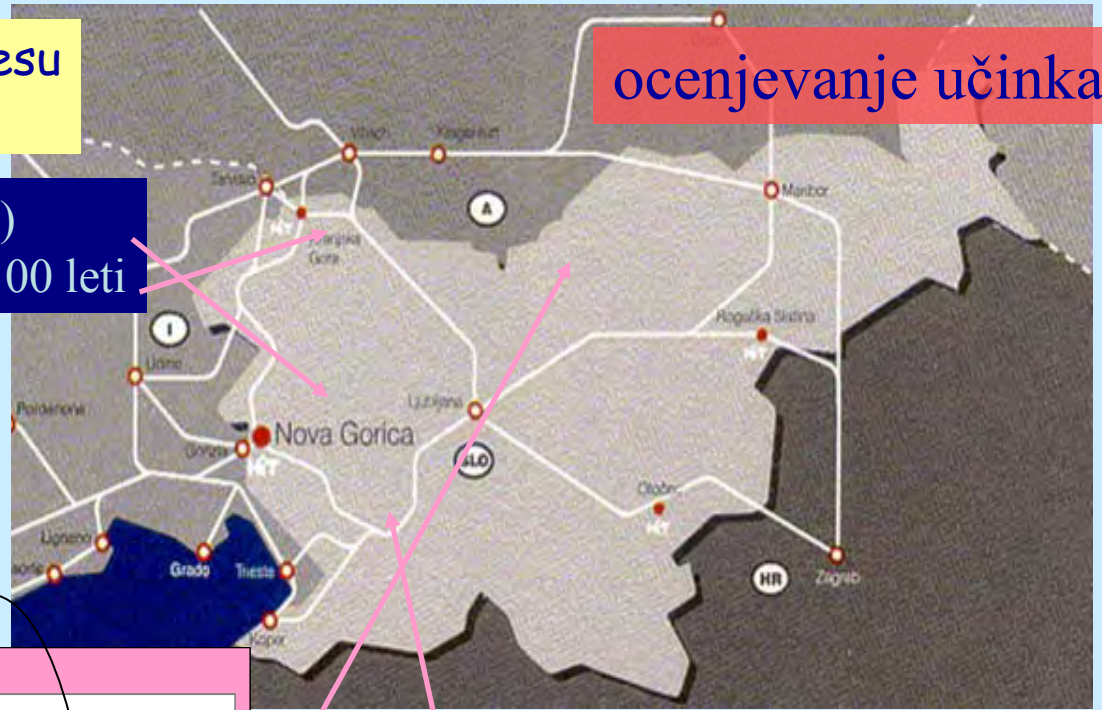


na Hg odporne bakterije v črevesu *P. scaber*

ocenjevanje učinka

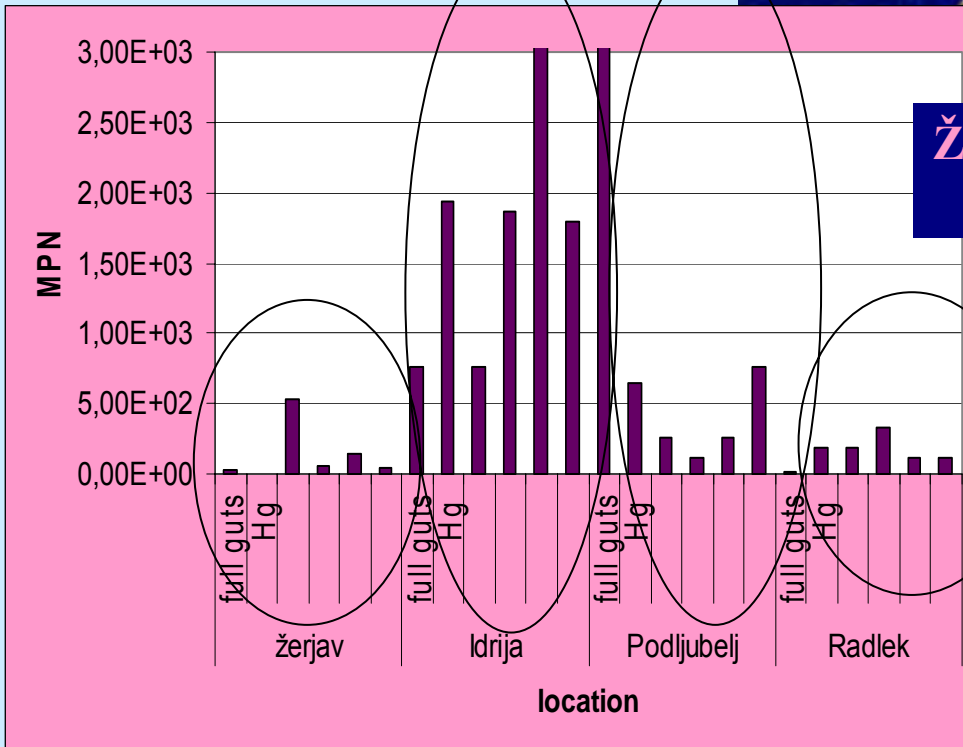
Idrija- rudnik Hg (500 let rudarjenja)

Podljubelj- rudnik Hg pred 100 leti



Žerjav- rudnik Pb (150 let rudarjenja)

Radlek- referenčno mesto



analize DNA

Lapanje, 2005

Biomarkerji

biološki odzivi na različne kemikalije ali mešanice kemikalij, kot mera izpostavitve ali kvarnega učinka (Peakall 1994).

- Biomarkerji** pokažejo
- izpostavitvev kemikalijam
 - učinek kemikalij
- in posledično
- stanje v okolju

genetic

biochemical

cellular

immunological

histopathological

physiological

bioenergetic

behaviour

reproductive

populations

communities

Namen dela:

• Spremljati/ slediti pretvorbam Hg v *Porcellio scaber* in njegovem okolju;

-redukcija Hg^{2+} do Hg^0 ; (biotska, abiotska redukcija; vlaga)

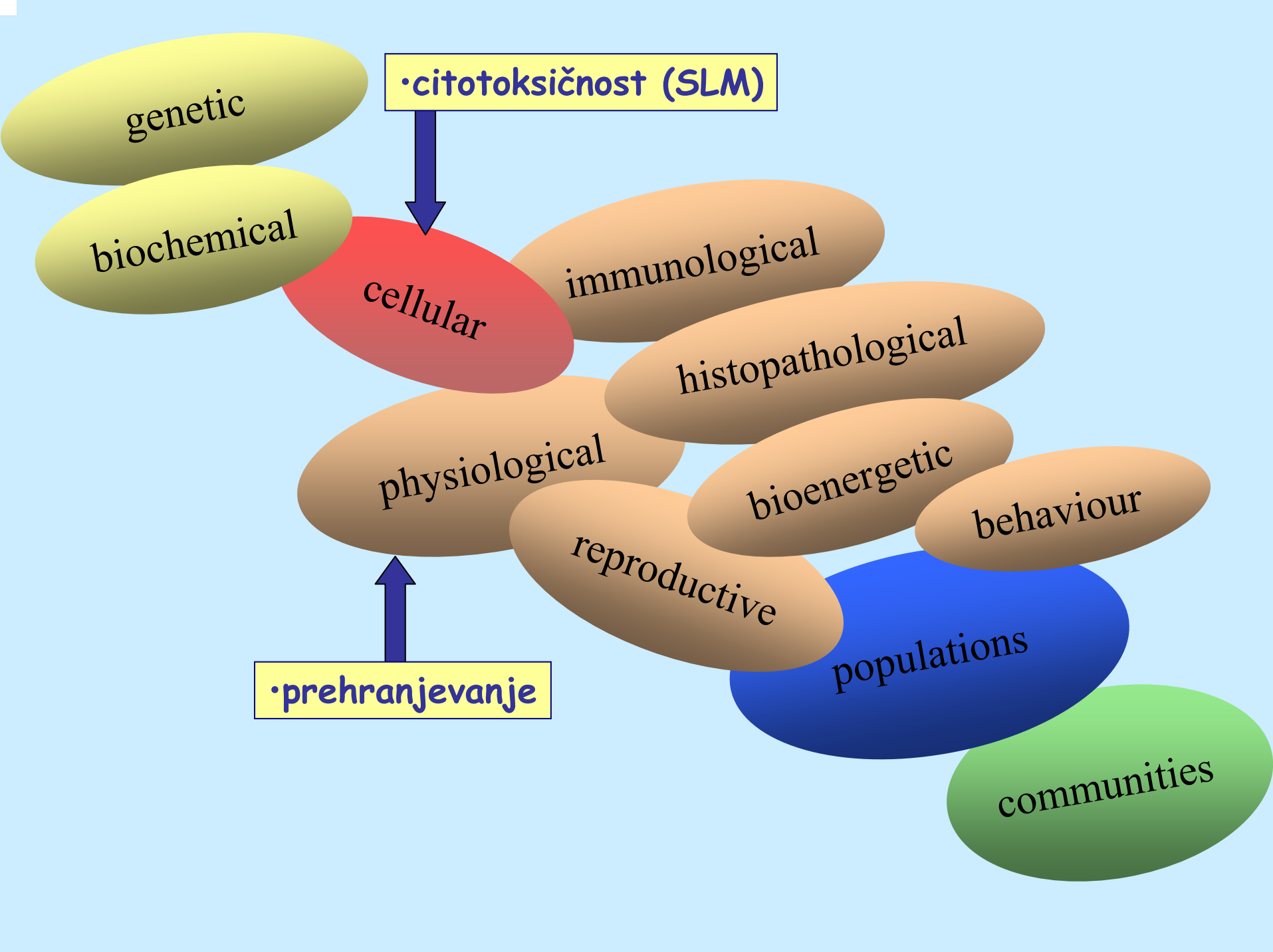
-metilacija Hg^{2+} do CH_3Hg^+

• Asimilacija in porazdelitev Hg^{2+} in CH_3Hg^+ po živali

• Študirati učinke povišanih koncentracij Hg v hrani na:

-prehranjevanje *P. scaber* (fiziološki nivo biološke organizacije)

-stabilnost lizosomske membrane - **SLM** (celični nivo biološke organizacije)



•citotoksičnost (SLM)

genetic

biochemical

cellular

immunological

histopathological

physiological

bioenergetic

behaviour

reproductive

populations

communities

•prehranjevanje

METODE: ^{203}Hg

Poskus **brez** *P. scaber*

Poskus **s** *P. scaber*

Nanos radioaktivnega sledilca $^{203}\text{Hg}^{2+}$ na liste

Vlaga

Sterilni pogoji

Nesterilni pogoji

Prvi poskus

Drugi poskus

$5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista

$5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista

$5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista

$0,5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista
 $5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista

$5 \mu\text{g } ^{203}\text{Hg}^{2+}/\text{g}$
suhe mase lista

- “suho”
- “vlažno”
- “mokro”

Sušenje listov čez noč

Dnevne meritve nastalega $^{203}\text{Hg}^0$

Izpostavitev živali

Dnevne meritve nastajanja $^{203}\text{Hg}^0$

21 dni

18 dni

14 dni

“čista hrana”

Štetje aktivnosti gama ($^{203}\text{Hg}^0$, T^{203}Hg)

Sekcija

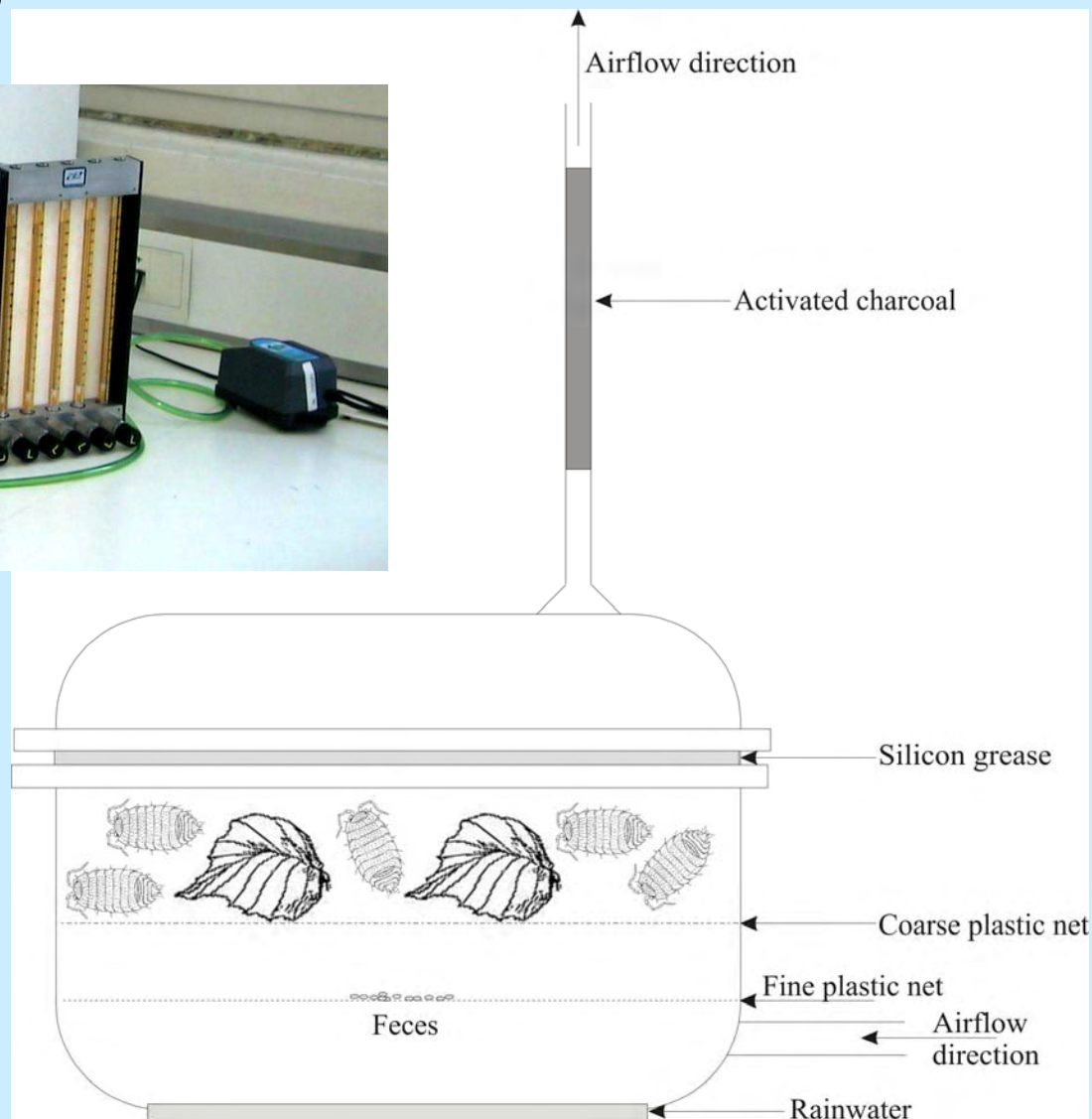
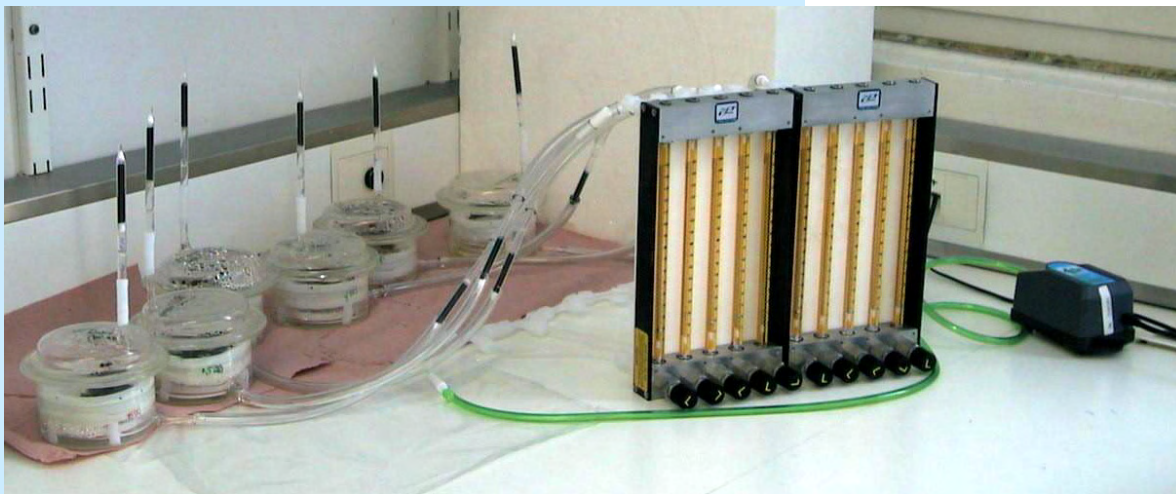
Določanje Me^{203}Hg in T^{203}Hg : Czuba et al. 1981,
Jereb et al. 2003

Določanje
 Me^{203}Hg in T^{203}Hg

- celotna žival
- hepatopankreas
- črevo
- preostanek

- listi
- iztrebki

METODE - ^{203}Hg



Poskusna posoda

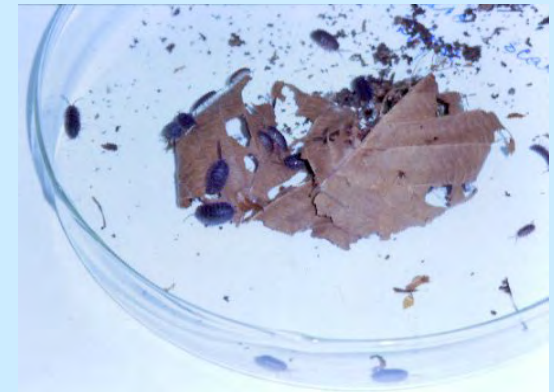
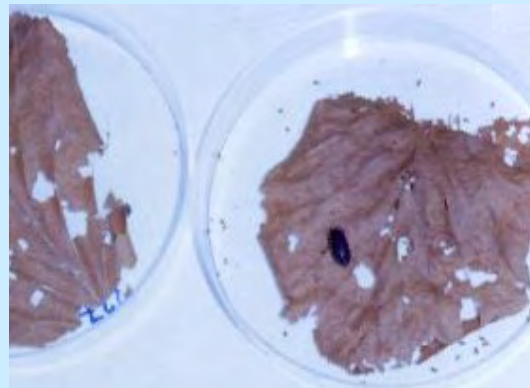
METODE - Prehranjevanje (fiziološki nivo):

Klasični laboratorijski toksikološki test (Drobne in Hopkin, 1995)

• 1. poskus: 38 dni
(0, 10, 30, 50, 100 μg Hg/g s.s.)

• 2. poskus: 35 dni
(0, 10, 30, 50, 100, 200, 300 μg Hg/g s.s.)

Tedenska produkcija iztrebkov, količina zaužite hrane, levitev, masa živali



Lizosomi

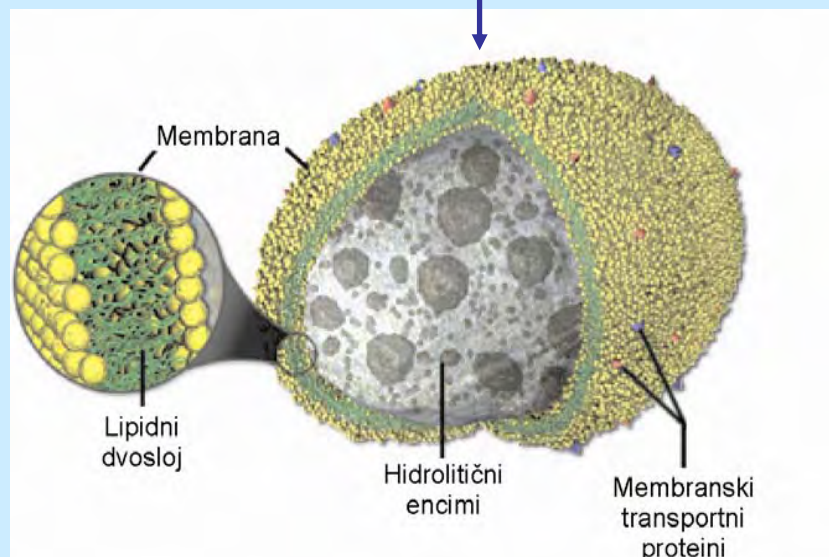
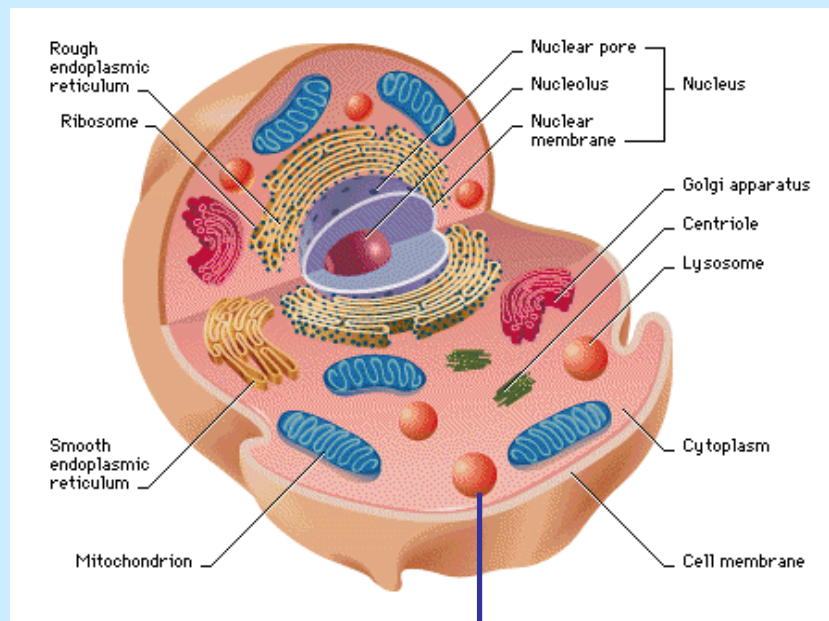
- z membrano obdani celični organeli
- hidrolitski encimi
- znotrajcelična prebava, avtofagija, apoptoza
- izolacija kovin in drugih onesnaževal, detoksifikacija



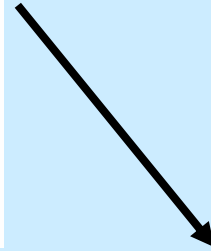
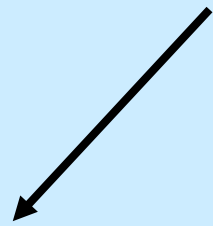
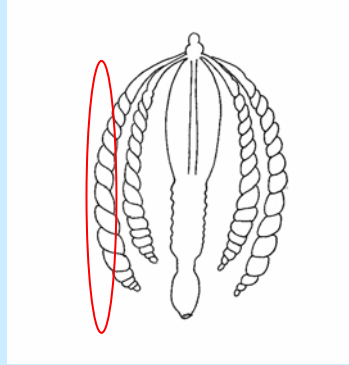
poškodbe zaradi posrednega ali neposrednega delovanja kovin (oksidativni stres, lipidna peroksidacija)



Destabilizacija membrane

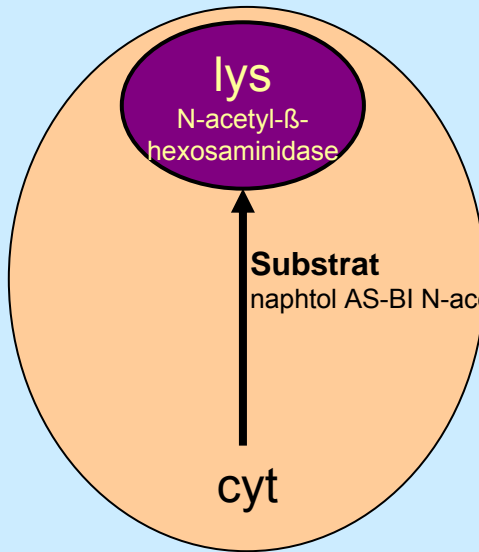
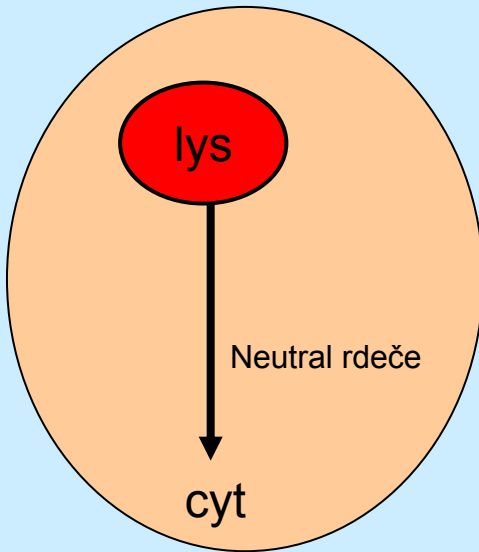


METODE - Stabilnost lizosomske membrane (SLM)



Ocena NRR
(ocena zadrževalnega časa
barvila nevtral
rdeče v lizosomih)

Ocena latence lizosomov (LL)
Citokemijska metoda (UNEP 1999)
aktivnost lizosomskega encima N-acetyl- β -hexosaminidase



- Max količina obarvanih lizosomov
- Obarvanje citoplazme

Ocena latence lizosomov

Prirejanje citokemijske metode (UNEP 1999)

Entire d.g.tubes (*Porcellio scaber*)

Lysosomal membrane labilising buffer

0.1 M Na-citrate buffer - 2.5% NaCl w:v, pH 4.5

0,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,
160,170 or **180** min at 37°C

Substrate incubation medium

Naphtol AS-BI N-acetyl- β -glucosaminide

20 min at 37°C

Physiological solution

2-3 min at 37°C

Diazonium dye - Fast Violet B salts

10 min at room T

Tap water

5 min

Calcium formol

10 min, 4°C

Distilled water

Mounting medium

Kaiser glycerine gelatin

Inspection under light microscope

Ocena NRR

Prirejanje protokola po Ringwood in sod.
(2005)

Stock solution: 4mg NR in 1 ml DMSO
Working solution: 0,1 ml stock solution in
9,9 ml physiological solution for *P. scaber*

Entire d.g.tubes (*Porcellio scaber*)

40 μ l working solution

20 minutes in humidity chamber

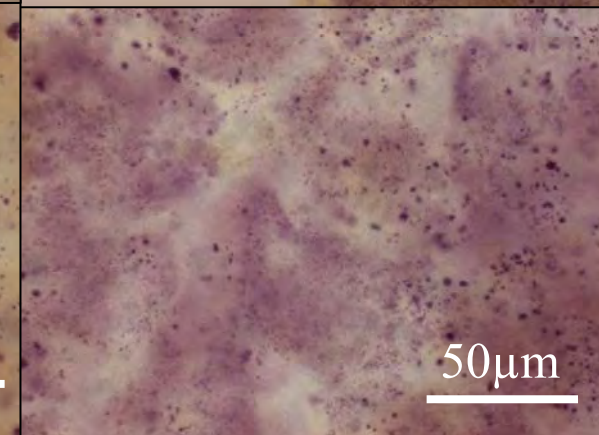
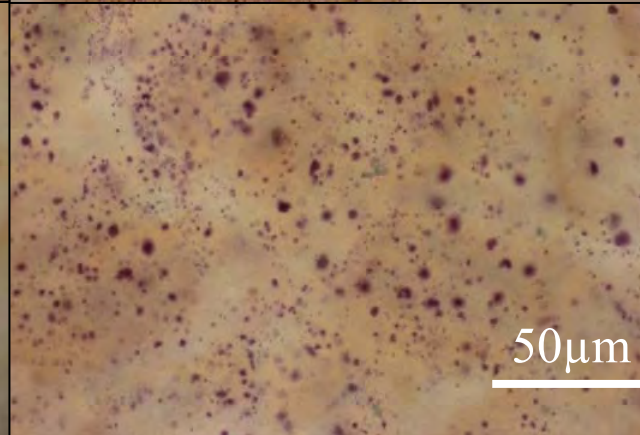
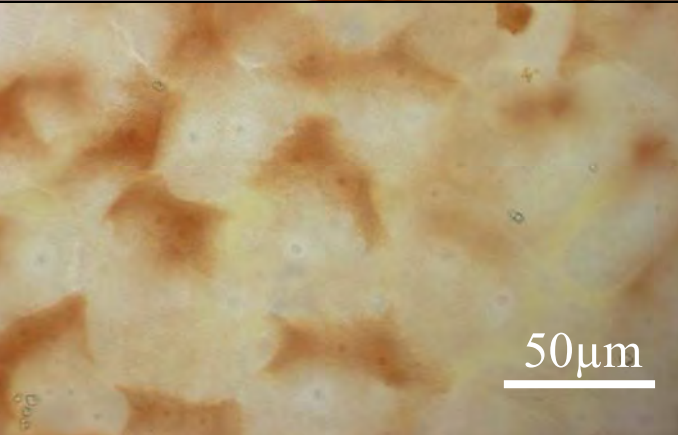
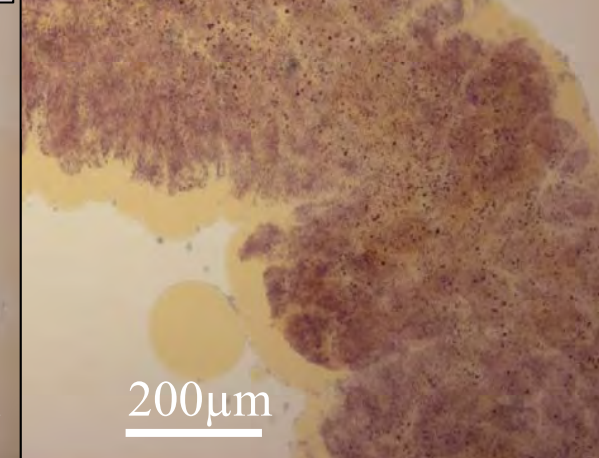
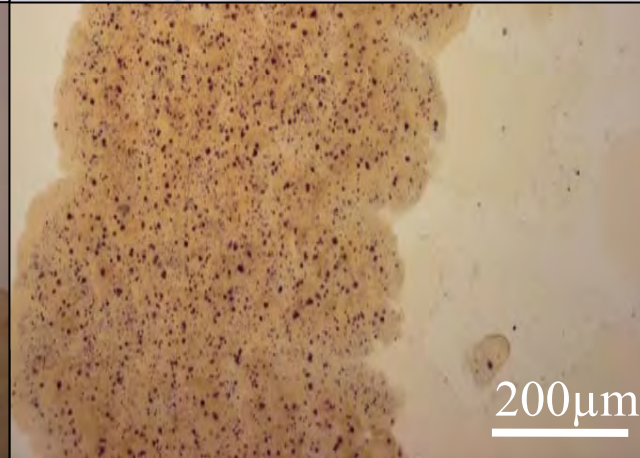
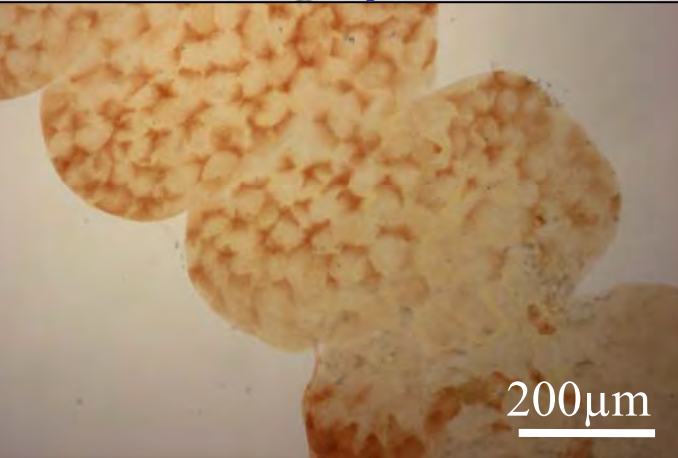
Inspection under light microscope every 30
minutes

**Prehajanje barvila nevtral rdeče
iz lizosomov v citoplazmo**

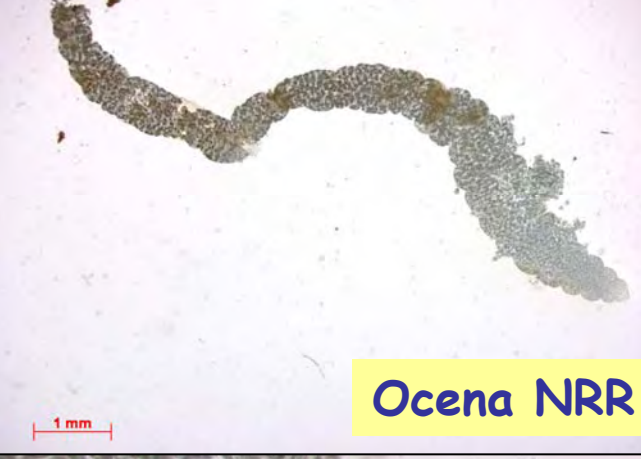
Maksimalna količina obarvanih lizosomov

Obarvanje citoplazme

Ocena latence lizosomov

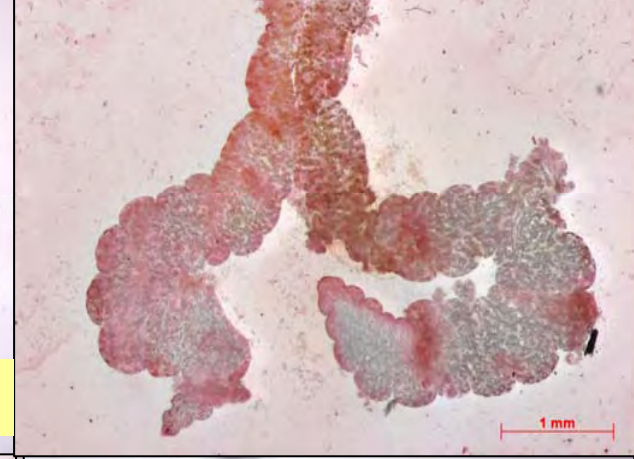


Pred inkubacijo v NR

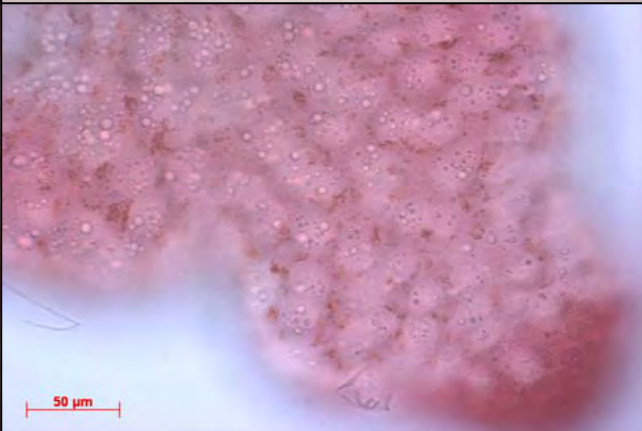
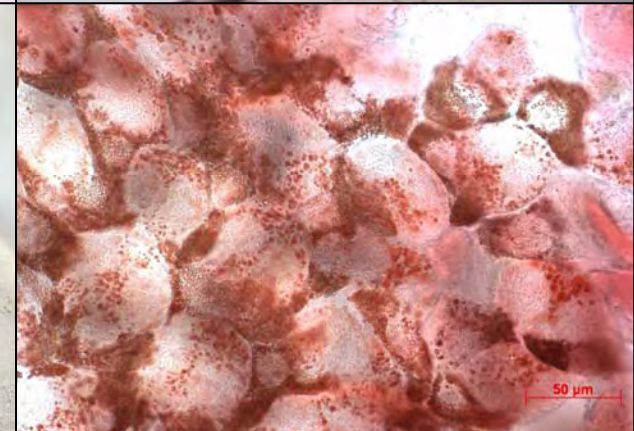
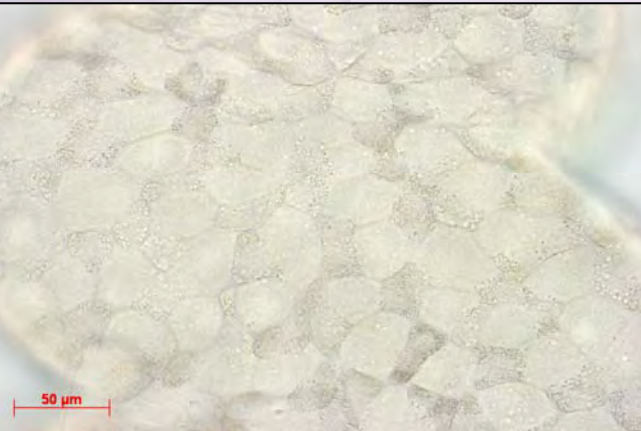
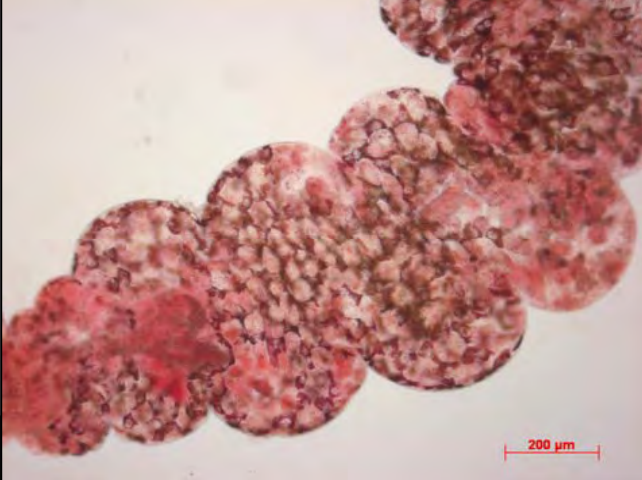
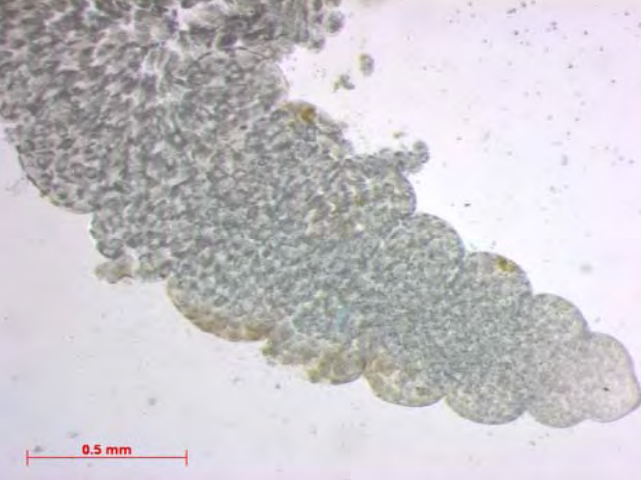
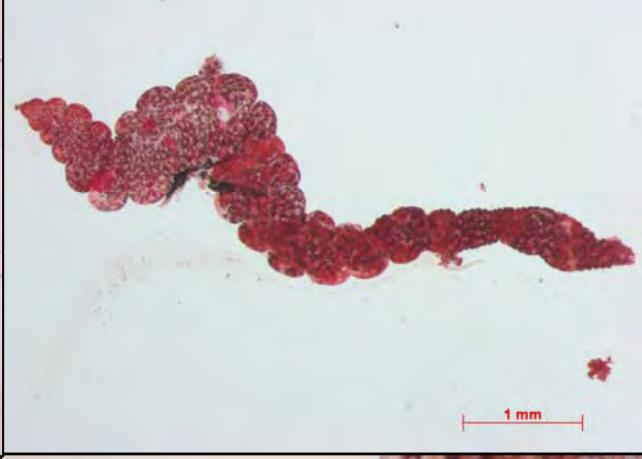


Ocena NRR

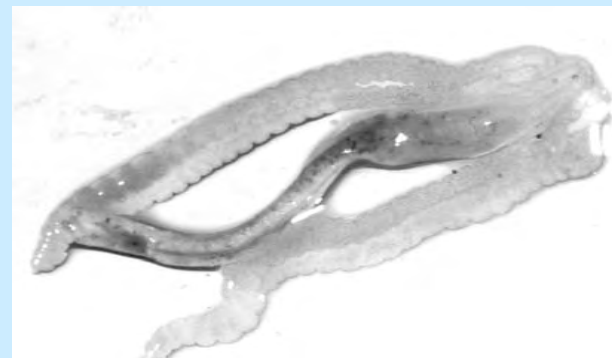
Delno destabilizirane žlezne cevke



100% destabilizirana žlezna cevka



Ocena SLM



I. Prirejanje metod

Ocena latence lizosomov
Ocena NRR

Pozitivni test:
inkubacija izoliranih prebavnih
žlez v Cu raztopinah (0, 50 in
100 $\mu\text{g Cu/L}$) izpostavitve "*in
vitro*"

II. Akutna izpostavitvev 3 dni izpostavitvev Hg "*in vivo*"

- 0 (kontrola)
- 5 $\mu\text{g Hg/g}$ suhe teže lista
- 50 $\mu\text{g Hg/g}$ suhe teže lista

III. Nabiranje *P. scaber* v neonesnaženih in onesnaženih lokacijah Slovenije



METODE - ocena SLM

SLM - podlaga za arbitrarne kriterije za ocenjevanje stanja živali, okolja!

Določanje THg v vzorcih

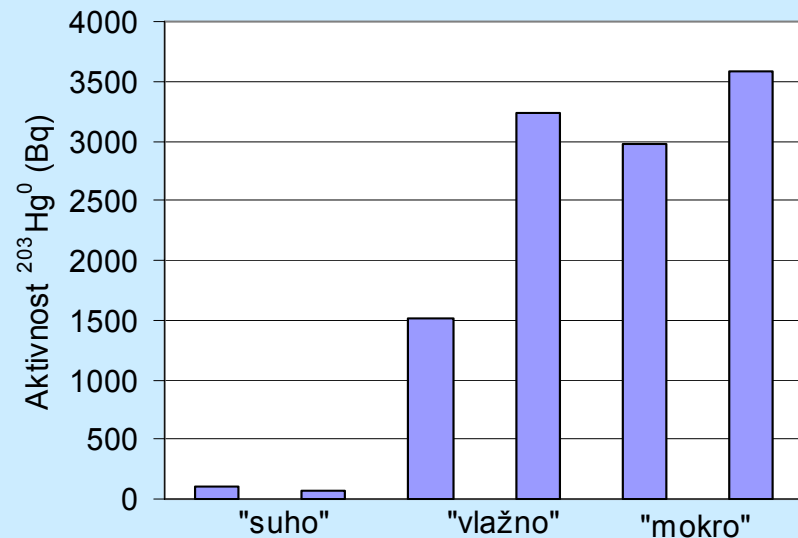
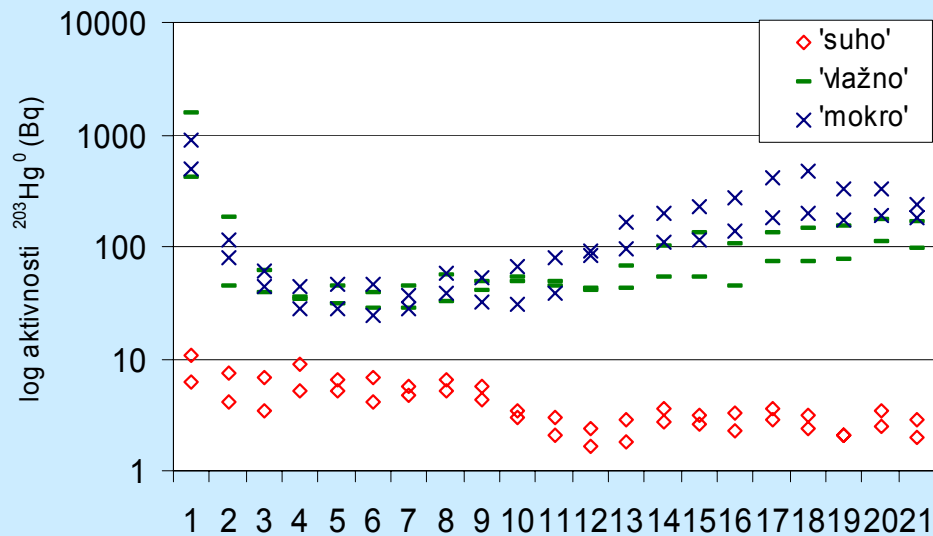
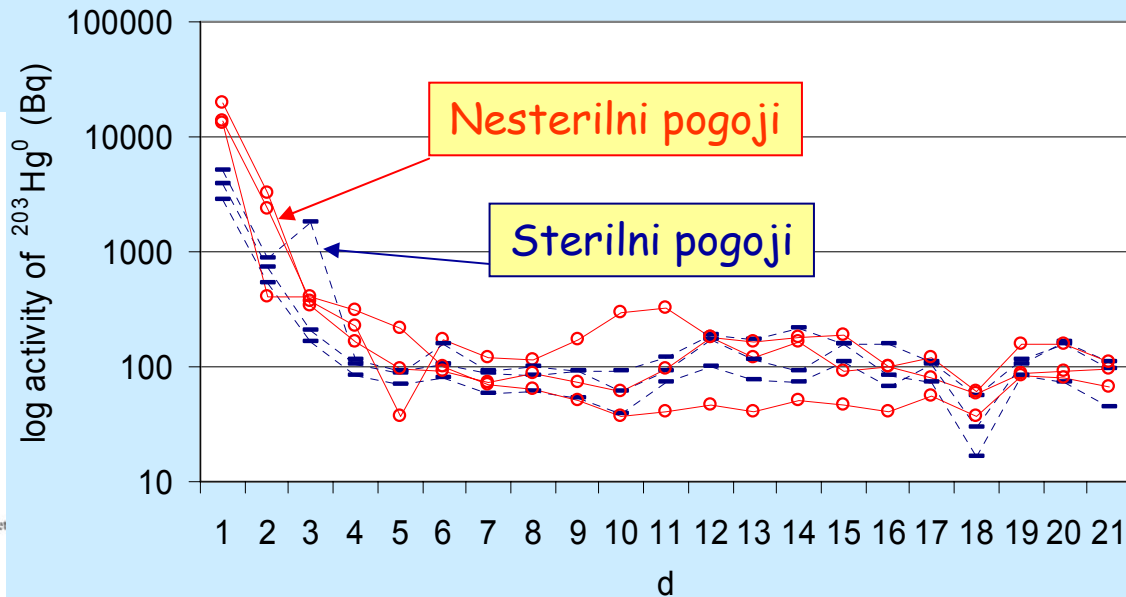
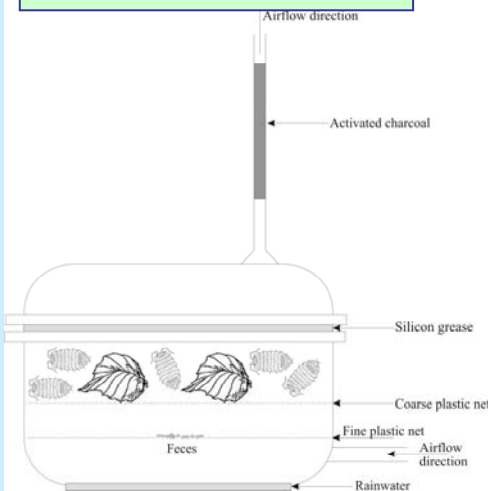
•Kislinski razkroj vzorcev (HNO_3 , H_2SO_4); AAS HP

Statistična obdelava podatkov

•Kruskal-Wallis, Mann-Whitney
•SPSS 12.01

REZULTATI- dnevna redukcija ($^{203}\text{Hg}^{2+}$ od $^{203}\text{Hg}^0$)

Poskusi brez *P. scaber*



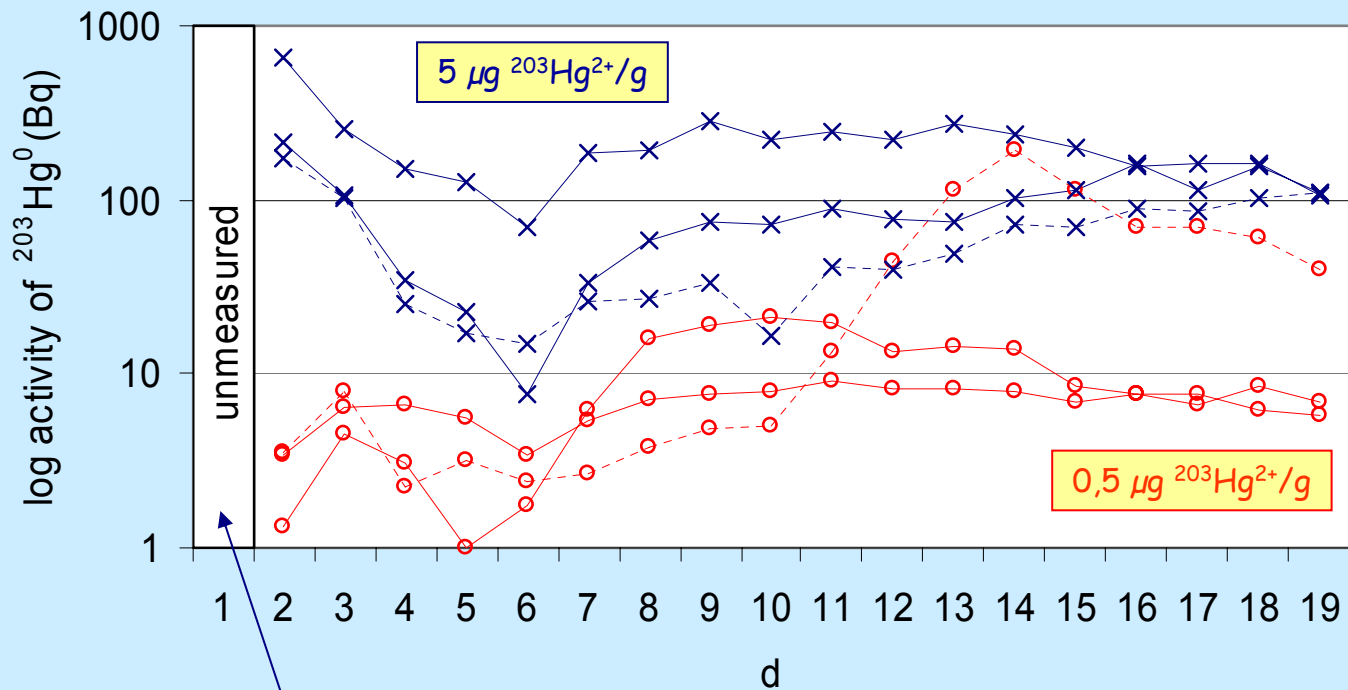
Vlaga - dnevni potek

d

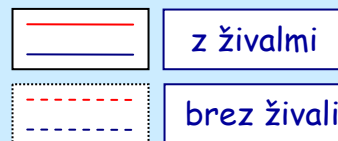
Vlaga - celotni poskus

REZULTATI

Poskus s *P. scaber*

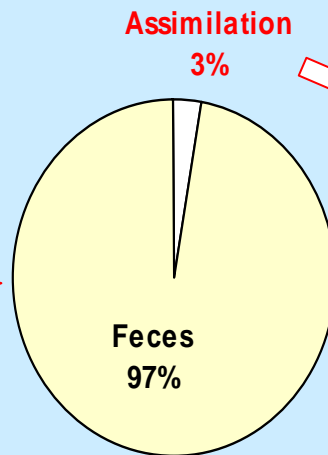
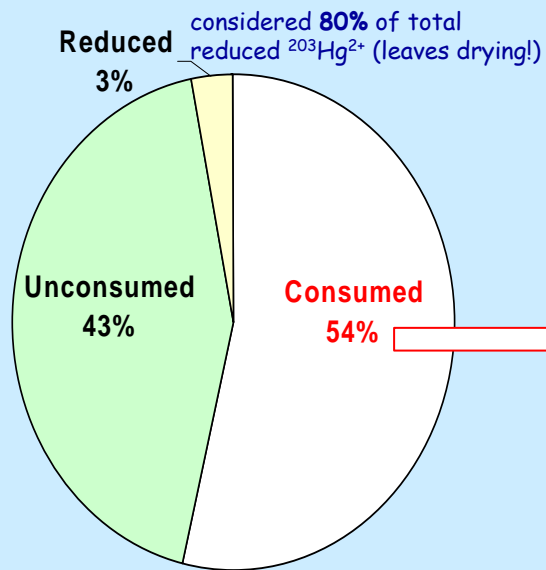


Sušenje listov čez noč:
Pretvori se 80% od
vsega reduciranega
 $^{203}\text{Hg}^{2+}$

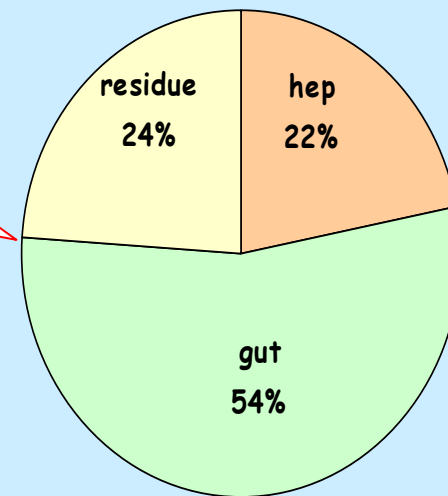


REZULTATI - Ocena masne bilance

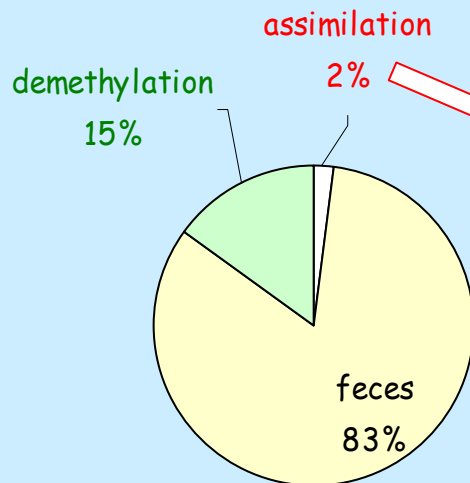
T²⁰³Hg



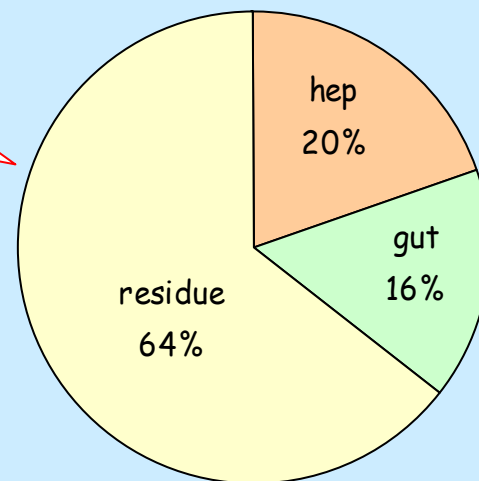
Porazdelitev T²⁰³Hg po *P. scaber*



Me²⁰³Hg

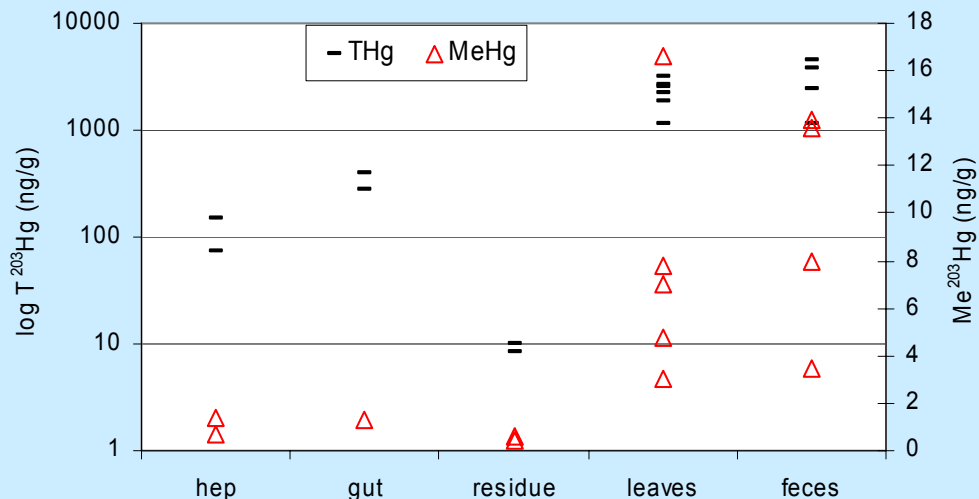


Porazdelitev Me²⁰³Hg po *P. scaber*



REZULTATI

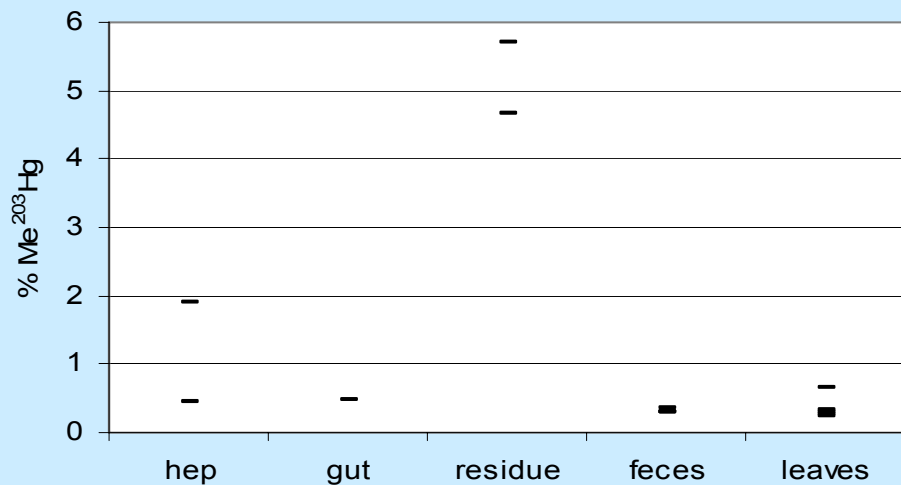
Koncentracije $T^{203}\text{Hg}$ in Me^{203}Hg



• Koncentracije $T^{203}\text{Hg}$ in Me^{203}Hg v listih in iztrebkih - isti velikostni razred, vendar višje kot v živalih

Prisotnost Me^{203} v listih - metilacija!

% Me^{203}Hg glede na $T^{203}\text{Hg}$



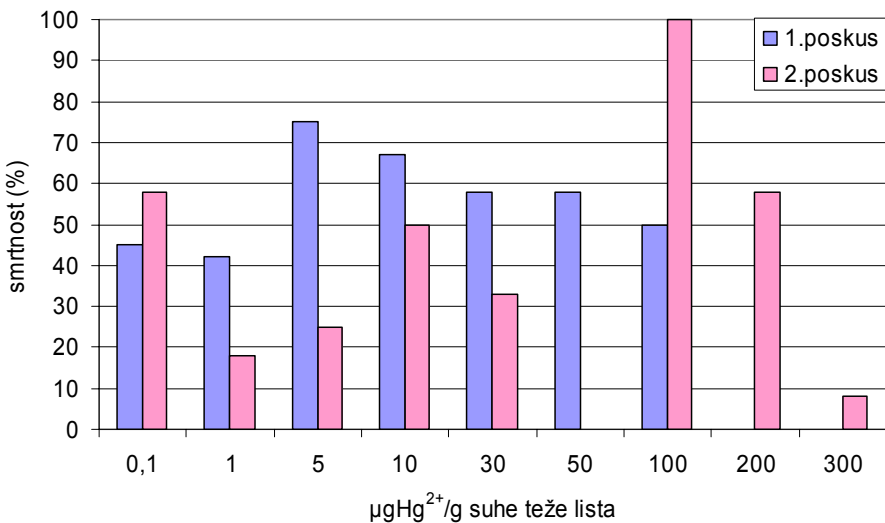
• Nizek % MeHg v organih

• Najvišji % v preostanku

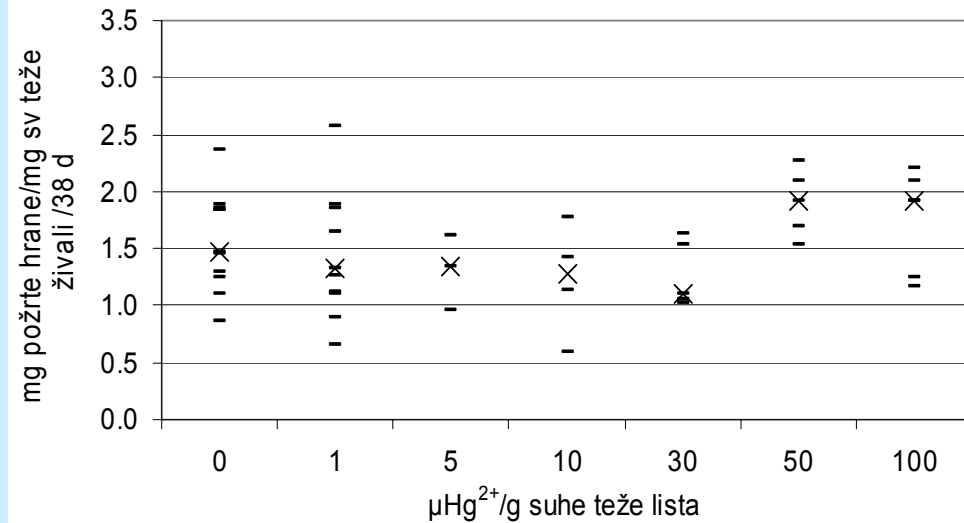
• % MeHg v listih in iztrebkih nižji kot v živalih

REZULTATI - Prehranjevanje (fiziološki nivo):

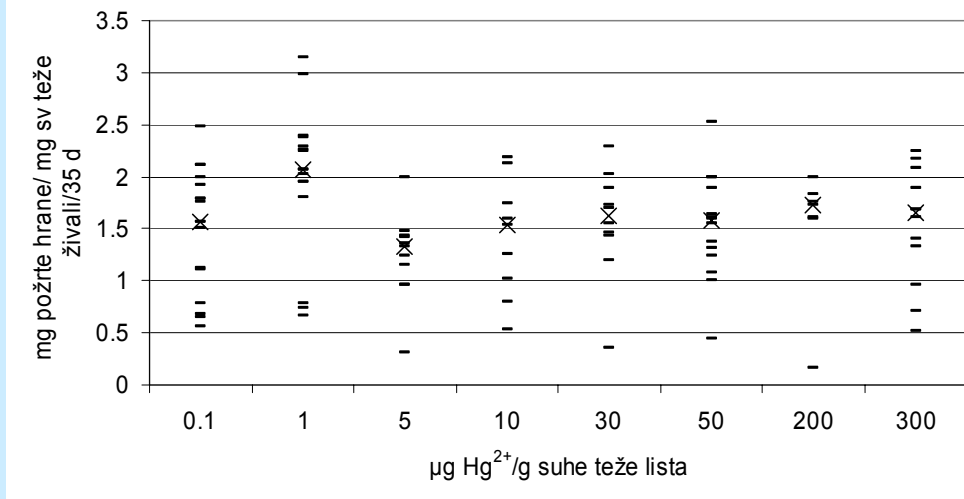
Smrtnost



Prehranjevanje - 1. poskus



Prehranjevanje - 2. poskus



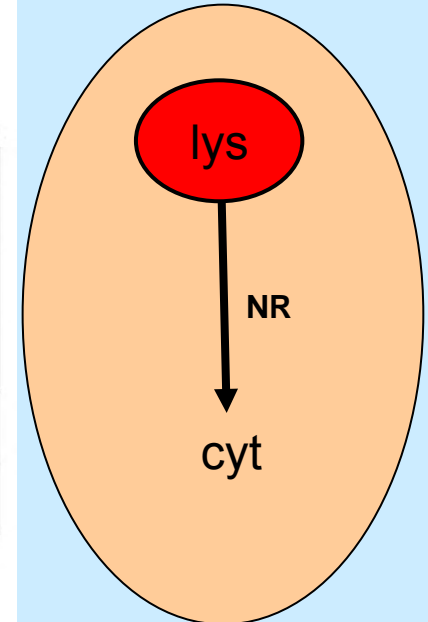
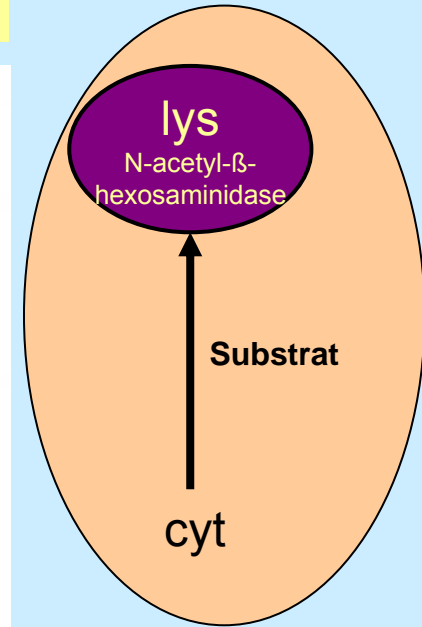
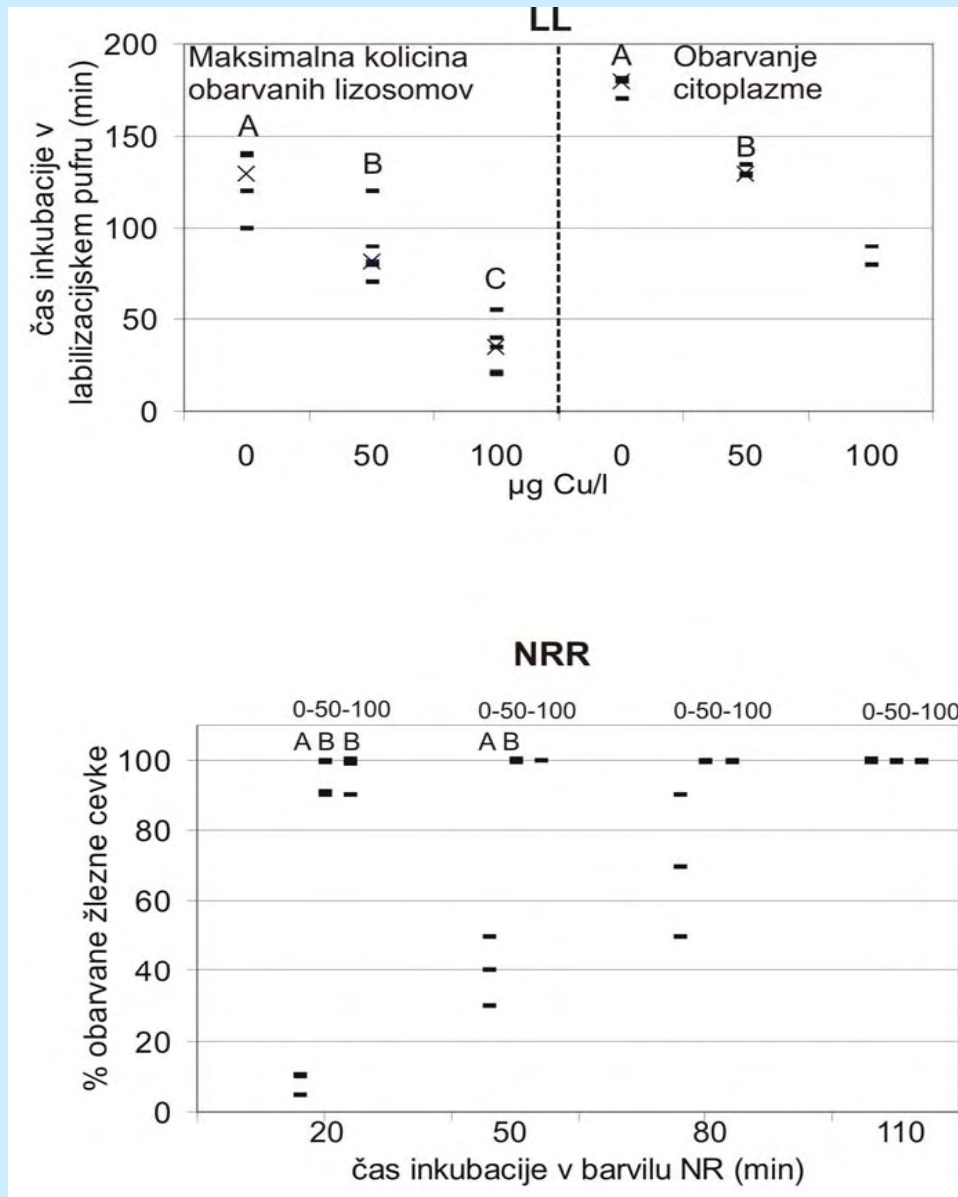
REZULTATI - celični nivo

Pozitivni test

Ocena lizosomske latence

Mann-Whitney test
 $p < 0,05$

Ocena NRR

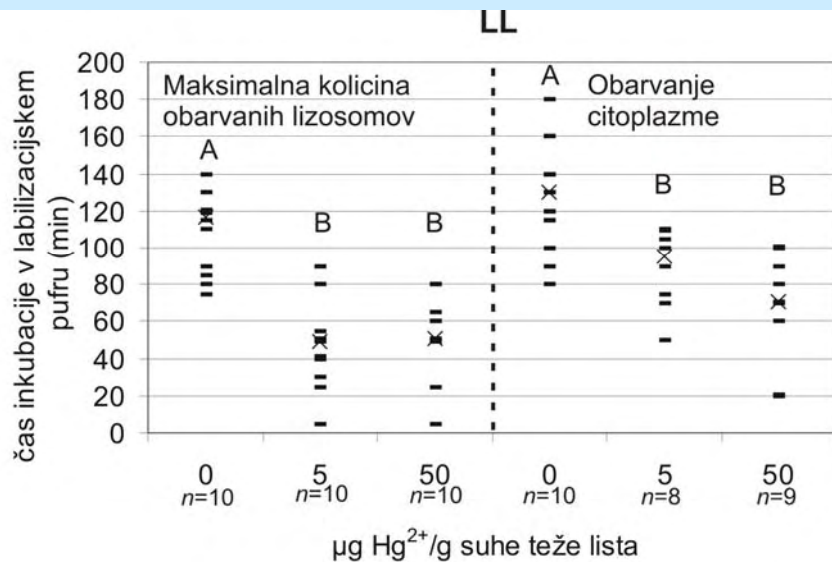


REZULTATI - celični nivo

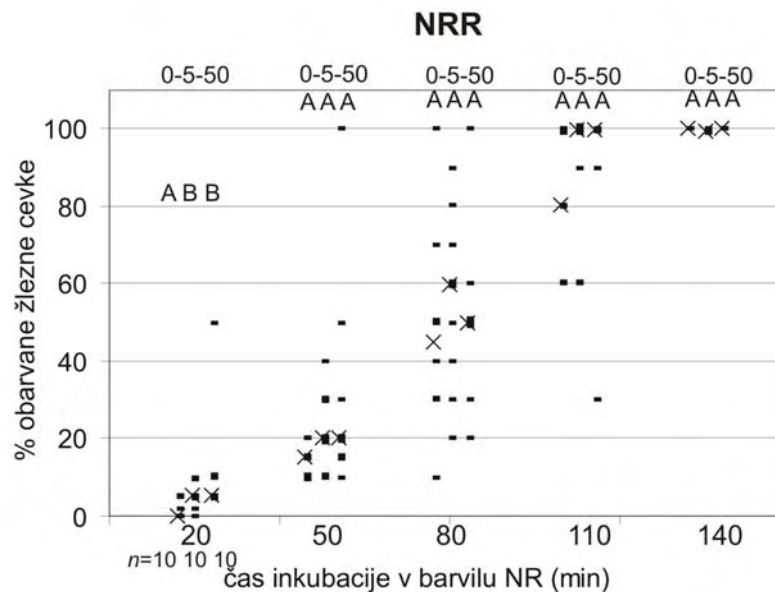
Laboratorij - izpostavitve Hg "in vivo"

Ocena lizosomske latence

Mann-Whitney test
 $p < 0,05$



Ocena NRR



REZULTATI - celični nivo

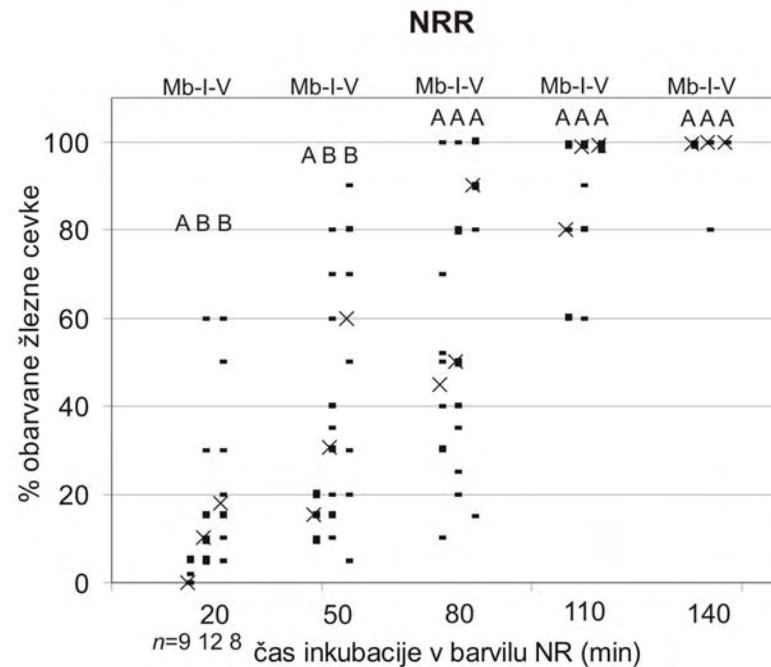
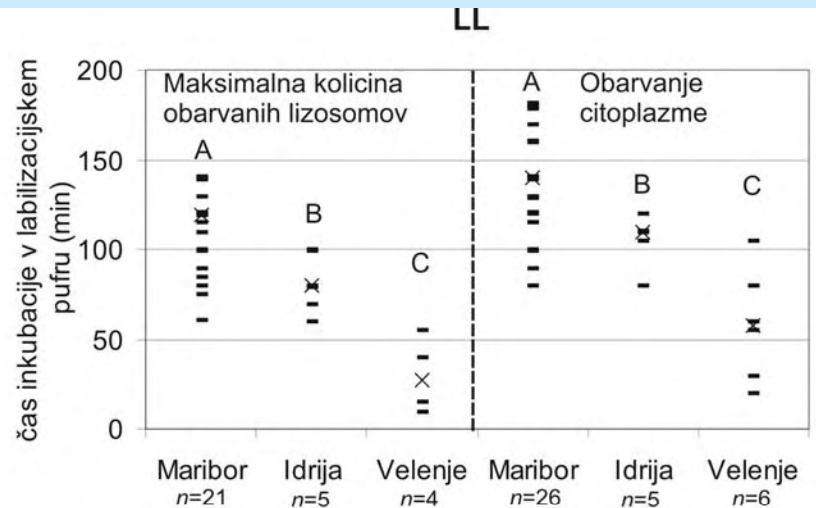
Živali iz okolja

Ocena lizosomske latence

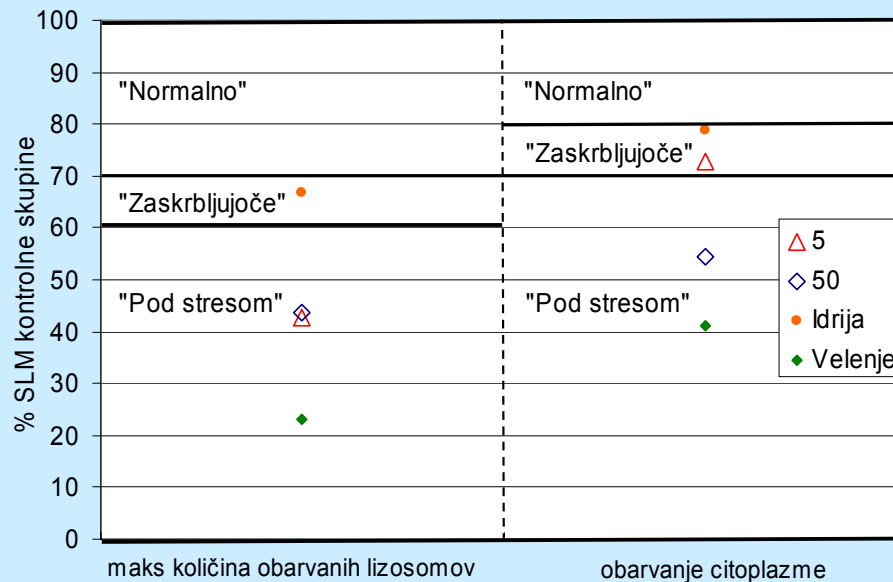
Mann-Whitney test
 $p < 0,05$

Ocena NRR

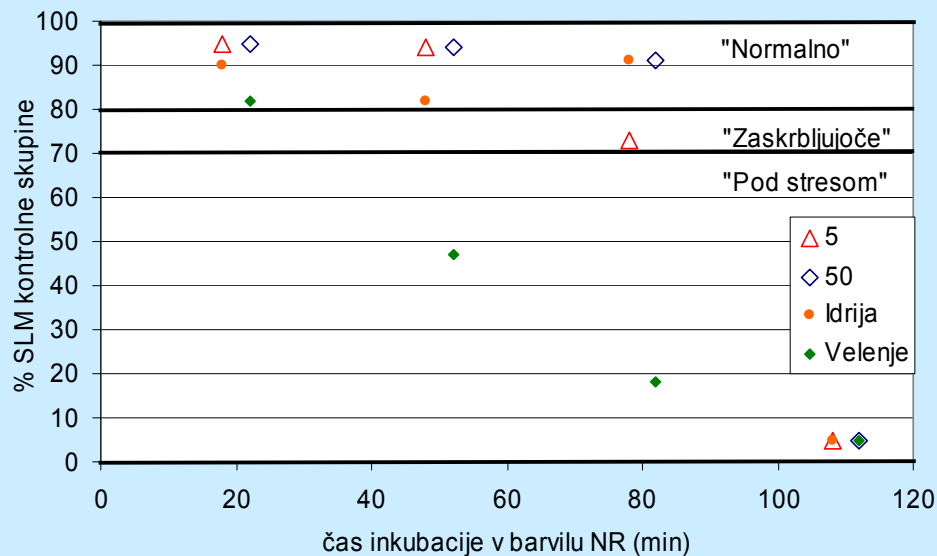
Lokacija	THg ($\mu\text{g/g}$)		
	prst	stelja	les
Velenje	1.17	0.010	0.028
Idrija Tomšičeva	1611	262	



Ocena lizosomske latence



Ocena NRR



1. Dan MR O-2, 19. april 2006

1. Biološki učinki onesnažil in biomonitoring

1.2. Ocena bioloških kazalcev ledvičnih poškodb in oksidativnega stresa pri poklicni in splošni izpostavljenosti živemu srebru

Darija Gibičar

Institutska mentorica: Ingrid Falnoga

Fakultetni mentor: Peter Stegnar, Varstvo okolja na Biotehniška fakulteti Univerze v Ljubljani

Komentor: Sašo Džeroski, Računalništvo in informatika na Fakulteta za računalništvo in informatiko Univerze v Ljubljani

Škodljivost in strupenost živega srebra sta dobro poznani, manj pa se ve o učinkih živega srebra na človeka kot posledica dolgotrajne izpostavljenosti nižjim koncentracijam v poklicnem in bivalnem okolju. Kot biološki kazalec dolgotrajne izpostavljenosti anorganskemu živemu srebru uporabljamo vsebnost celokupnega živega srebra v urinu, na katerega poleg števila amalgamskih zalivk vplivajo tudi uživanje kontaminirane hrane, kajenje, žvečenje, starost in spol. Biološki kazalci za odkrivanje zgodnjih bioloških učinkov oziroma začetne prizadetosti funkcij posameznih tarčnih organov pri kronični izpostavljenosti nižjim koncentracijam Hg, so pogosto premalo občutljivi in specifični, saj jih lahko povzročajo tudi ostali ksenobiotiki, prisotni v okolju. Namen disertacije je oblikovati integrirano bazo podatkov, ki vključuje podatke pridobljene iz vprašalnikov in analiz bioloških kazalcev izpostavljenosti živemu srebru in biološke kazalce prizadetosti organov pri trenutno poklicno izpostavljeni populaciji, preteklo poklicno izpostavljeni populaciji in splošni populaciji, ki je bivalno izpostavljena živemu srebru. Z metodami strojnega učenja (regresijska drevesa in klasifikacijska pravila v programu WEKA) smo skušali izluščiti zakonitosti v zbranih podatkih ter tako poiskati možne nezaželene ali subklinične učinke živega srebra na funkcijo ledvic ter na oksidativne poškodbe DNA ali lipidno peroksidacijo..

Ker še ni razjasnjeno, ali zadrževanje živega srebra v ledvicah lahko vpliva na funkcijsko sposobnost ledvic tudi v obdobju po prenehanju izpostavljenosti, smo pri populaciji upokojenih rudarjev ocenili krivuljo izločanja Hg v urinu po prenehanju izpostavljenosti.

1st MR O-2, April 19, 2006

1. Biological effects of contaminants and biomonitoring

1.2. Evaluation of biomarkers of kidney damage and oxidative stress in population occupationally and generally exposed to mercury

Darija Gibičar

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Ingrid Falnoga

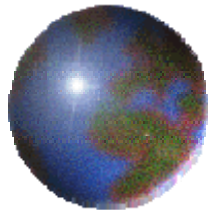
Supervisor at the university: Peter Stegnar, Environmental Protection, Biotechnical faculty, University of Ljubljana

Co-Supervisor: Sašo Džeroski, Computer Science and Informatics, Faculty of Electrical Engineering and Computer Science, University of Ljubljana

The harmfulness and toxicity of mercury are well known; less known are the effects of long-term low-level mercury exposure in the general population and populations that are exposed occupationally. As a biomarker of long-term mercury exposure, concentrations of total mercury in urine are used, which are affected by the number of amalgam fillings, ingestion of contaminated food, smoking, chewing gum, age, and gender. Biomarkers for detecting early biological effects or initially damaged function of target organs because of chronic low-level mercury exposure are usually insensitive and unspecific, and can be a result of other xenobiotics present in the environment.

The goal of this research is to form an integrated database that includes data obtained from questionnaires and analyses of biomarkers of mercury exposure and biomarkers of damaged function of target organs in populations that are currently and/or were previously exposed to mercury either occupationally and/or generally.

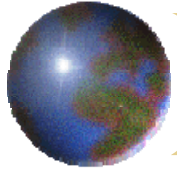
Using machine-learning methods (regression trees and classification rules in the WEKA program) I tried to extract new knowledge from data gathered about the adverse or sub clinical effects of mercury on kidney function and on oxidative damage to DNA and lipids. Since it is as yet unknown whether accumulation of mercury in the kidneys can affect their function even in the period after exposure, the excretion curves of mercury in urine after exposure of retired mercury miners was evaluated.



*Ocena bioloških kazalcev ledvičnih
poškodb in oksidativnega stresa pri
poklicni in splošni izpostavljenosti
živemu srebru*

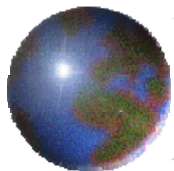
Darija Gibičar

Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju



Short CV:

- Graduated in 2002 at Biotechnical Faculty of Ljubljana, Department of Zootechnics (*Arsenic species in eggs of hens fed with As_2O_3*). Experimental work was done on JSI, Department of Environmental Sciences under the mentorship of dr. Vekoslava Stibilj, dr. Ingrid Falnoga and prof. dr. Antonija Holcman
- 2003 – 2007: young researcher at JSI, Department of Environmental Sciences, PhD student of Biotechnical Faculty of Ljubljana, Department of Biology, PhD title: ***Assessment of biomarkers of kidney damage and oxidative stress in population exposed to mercury***
 - Faculty mentor: dr. Peter Stegnar
 - Working mentor: dr. Ingrid Falnoga
 - Working comentor: dr. Saša Džeroski

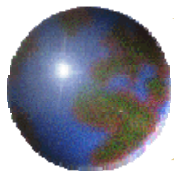


In cooperation with

- Environmental study **EMECAP** (*European Mercury Emission from Chlor-Alkali Plants*, EU project, 2001-2004):
 - Scuola Superiore di Studi Universitari e di Perfezionamento S. Anna (SSSA), Italy.
 - Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR.IB), Italy.
 - Swedish Environmental Research Institute Ltd. (IVL).
 - Goeteborg University (UGOT), Sweden.
 - Norwegian Institute for Air Research (NILU).
 - Lund University (LUND), Sweden.
 - Kayser Italia s.r.l.(KAYSER), Italy.
 - Synapsis s.r.l. (SYNAP), Italy.
 - Institute for Ecology of Industrial Areas (IETU), Poland.
 - Institute of Occupational Medicine and Environmental Health (IOMEH), Poland.
 - University of Bucharest.
 - JSI, Department of Environmental Sciences (M. Horvat)

- *Effect of elemental mercury on lipid peroxidation and function of target organs in population living in Idrija* (Ministry of Science and Technology, J3-3076-0312-01, 1997 – 2004): J. Osredkar (Institute of clinical chemistry and biochemistry, KC), A. Kopal (Mercury Mine in Idrija), M. Horvat (JSI).

- JSI, Department of Knowledge technologies: dr. Sašo Džeroski, Bernard Ženko, Dragi Kocev



MAIN MERCURY ABSORPTION ROUTES IN HUMANS

Respiratory routes

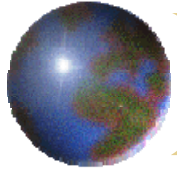
Dietary routes

Estimated average daily intakes and retention (in $\mu\text{g}/\text{day}$) of different mercury forms in the general population not occupationally exposed (IPCS, 1991):

Exposure	Elemental Hg vapour	Inorganic Hg compounds	Methylmercury
Air	0.03 (0.024)	0.002 (0.001)	0.008 (0.0069)
Dental amalgams	3.8-21 (3-17)	-	
Food			
-fish	-	0.60 (0.042)	2.4 (2.3)
-non-fish	-	3.6 (0.25)	not known
Drinking water	-	0.050 (0.0035)	-
Total	3.9-21 (3-17)	4.3 (0.3)	2.41 (2.31)

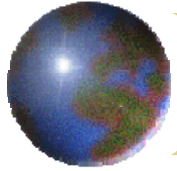
The data in parenthesis represent retained Hg in the body of an adult.

The occupational groups are primarily exposed through mercury vapour.



Effect of Hg

- Depends on length and dose of exposure.
- Depends on type of Hg (elemental, organic, inorganic).
- Young children and fetuses are more sensitive to Hg than adults.

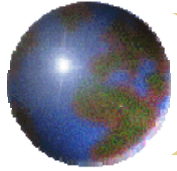


High and/or chronic levels of exposure

- Brain-methyl/inorganic Hg
 - ▣ Permanent brain damage
 - ▣ Mental retardation
 - ▣ Blindness/Hearing changes
 - ▣ Polyneuropathy
 - ▣ Seizures/Tremors
 - ▣ Inability to speak
 - ▣ Irritability/shyness
- Permanent Kidney Damage
 - ▣ Damages distal and proximal tubule
- Corrosive damage to the Digestive System
- Reproductive Toxicity

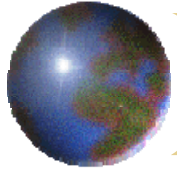
High and Short-Term/Acute exposures cause:

- diarrhea, lung damage, nausea, vomiting, skin rashes, eye irritation, and hypertension.



Low and chronic levels of exposure to Hg

- Toxic effects of mercury are well known in the case of occupational exposure to elemental mercury vapor (Hg^0). Most frequent symptoms: erythrysmus, increased irritability, depression, insomnia, psychotic disturbances, and tremor.
- Less known are the effects of a longtime mercury exposure at low concentrations - subtoxic effects of mercury.
- Subtoxic effects can promote oxidative damage of DNA and lipids, accumulation and retention of Hg in CNS, pineal gland, hypophysis, thyroid, testis and kidney.



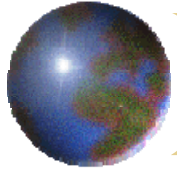
The assessment of Hg exposure – USE OF BIOMARKERS

1. Biomarkers of exposure: concentration of Hg in blood, **hair, urine**, exhaled hair, cord-blood, teeth, nails,...

Hg in organism can be elevated because of: occupational exposure (inhalation of Hg⁰), ingested food with high amount of Hg (fish consumption - MeHg), dental amalgam, chewing of dental amalgam, other accidental exposures.

2. Biomarkers of effect:

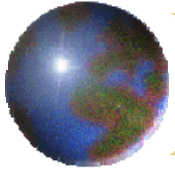
- ❏ Damaged kidney function (detected in urine): creatinine, albumine, NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase), A1M (α -1-microglobuline),..
- ❏ Damaged DNA because of elevated ROS species (oxidative stress): 8-OH-dG marker (8-hidroxy-2'-deoksyguanosine) .
- ❏ Unfortunately, they are not specific markers for Hg exposure, thus can be elevated because of some other xenobiotic exposure or illness!!
- ❏ Factors that influence biomarkers of effect are also age, gender, health status, smoking, alcohol/drug abuse, ...and of course genetic polymorphism.



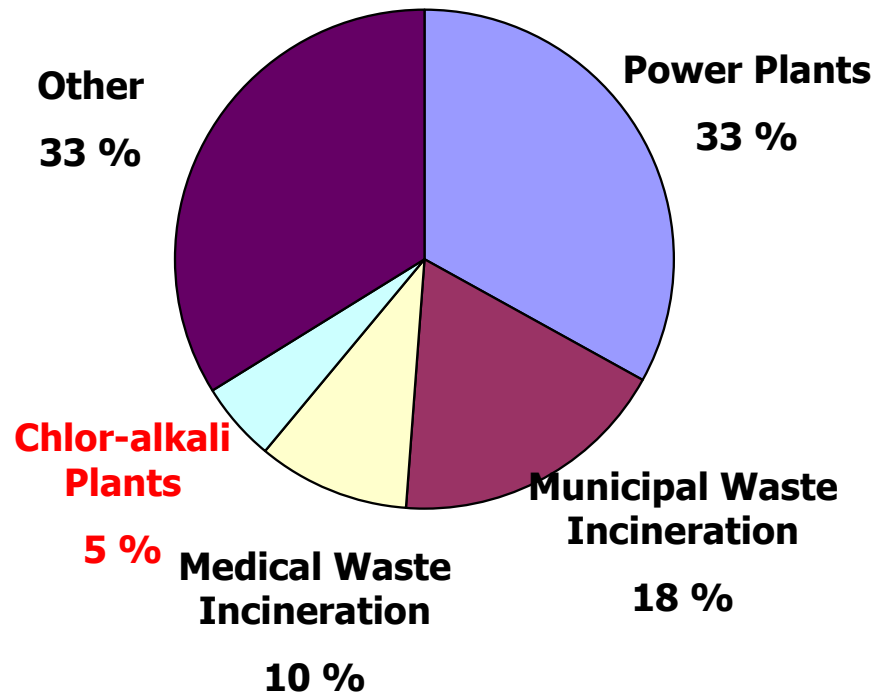
Research hypothesis:

Low level mercury exposure can:

- Damage kidney function.
- Promote oxidative stress.
- Effect beside occupationally exposed population also general population via dental amalgam and contaminated food.

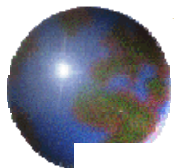


Human-caused sources of Mercury Emissions

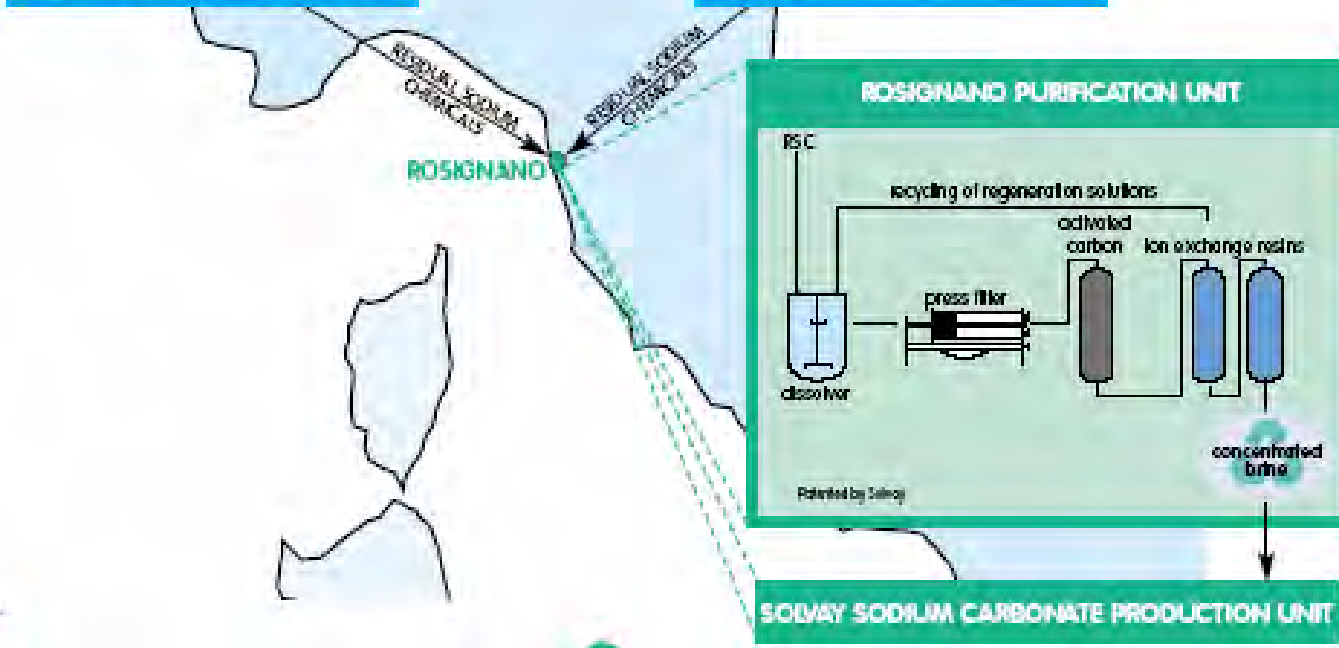
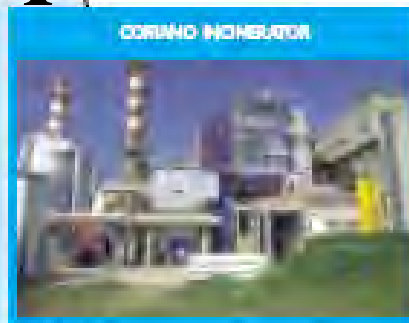


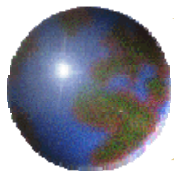
AIM OF THE EMECAP STUDY:

To assess exposure to mercury and the potential association with biomarkers of early renal dysfunction in subjects living close to chlor-alkali plants, in reference areas, and in occupationally exposed chlor-alkali (CA)



Rosignano Solvay Chlor-Alkali komplex





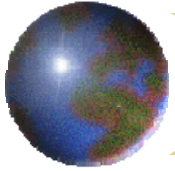
Rosignano Solvay Chlor-Alkali komplex

In operation since 1920
12-14 t Hg /y of flowed into the
sea through a discharge dish from
1950-1973
400-500 kg Hg /y discharged into
the sea at present
120,000 t chlorine /y produced
1990: 150 kg Hg/y emitted in air



Rosignano Solvay village: 15,000 inhabitants

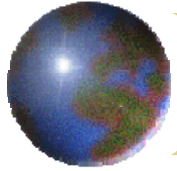
Donoratico, the control station: 20 km south from
Rosignano Solvay



Study population

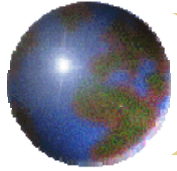
- 66 workers from CA
- 111 living around CA (1,5 km radius)
- 128 controls from Donoratico





Methodology:

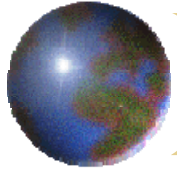
- All subjects completed **a questionnaire** containing questions on the location of their residence and workplace, occupational history including possible exposure to mercury, the number of teeth filled with amalgam, as well as on the consumption of various types of fish, and whether they suffered from kidney disease, diabetes, or hypertension.
- **Urine** and **hair** samples were analysed for Hg content.
- **Urine** was analysed for biomarkers of kidney and DNA damage and Se content.
- **DATA MINING:**
 - Statistical analysis with SPSS software (ONE-way ANOVA to find differences between the groups, Pearson's correlation coefficient to find relationships between the exposure and other variables).
 - Machine learning methods with WEKA software: use of regression trees and model trees: to find possible explanations of associations between the target variables (kidney and DNA damage) and biomarkers of Hg exposure in combination with covariables on the subgroup level.



Exclusion criteria:

- To study the associations between exposure to mercury and biological markers of early kidney damage, we excluded subjects reporting kidney disease, hypertension or diabetes, as these clinical conditions may affect kidney function.
- Subjects with extreme creatinine concentrations (<0.3 g/L or >3 g/L) were excluded to eliminate potentially unreliable results.
- A1M was below the DL in 71 % of studied subjects, NAG and albumine were below DL in 18 %.

	Age	Fish/ week	Amlg	HgU	Crea	Alb	A1M	NAG	SeU	HgH	MeHg
Worker (66)	39	0.97	2.7	7.27	1.50	10.4	3.01	1.04	262	3.15	2.16
RS pop (111)	37.7	1.1	1.9	1.66	1.32	5.73	2.91	0.74	304	2.21	1.43
Control (128)	37.3	0.99	2.6	2.14	1.26	7.41	3.57	0.85	344	1.71	1.65

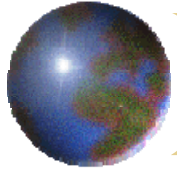


Results of statistical analysis for general population

- There was no effect on urinary mercury of living near MCCA plant as compared to living in reference areas.
- Urinary mercury was higher in subjects with dental amalgams.
- A positive association with chewing on amalgams was found, as well as with fish consumption.
- Regardless of amalgam fillings, urinary mercury was higher in women.
- Significant positive associations between U-NAGC and age was found, and sex (higher in women) in the whole general population.
- In women U-AlbC was significantly higher in the reference area, In the Italian men U-AlbC increased with age.
- No statistically significant associations between urinary mercury and kidney markers have been detected in subjects from the general population.

Results of statistical analysis for chlor-alkali workers

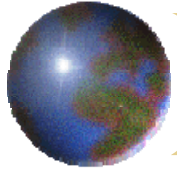
- As compared to other workers, subjects with U-HgC higher than 35 $\mu\text{g/gC}$ had statistically significantly higher U-NAGC and U-A1MC, but not U-AlbC.
- There was no statistically significant difference in age between the two groups.



Main factors associated with urinary mercury in the general population, with separate results for the subjects without dental amalgams

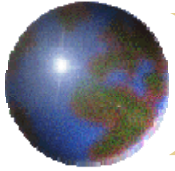
Variable	All	no amalgam
Sex (women)	+	0
Age	0	0
Dental amalgams	+	n.a.
Chewing on amalgams	0	
Total fish consumption	+	+
Living close to plant	-	+
Country		

Symbols used: + statistically significant increase; - statistically significant decrease; 0 no statistically significant effect; (n.a.) not applicable

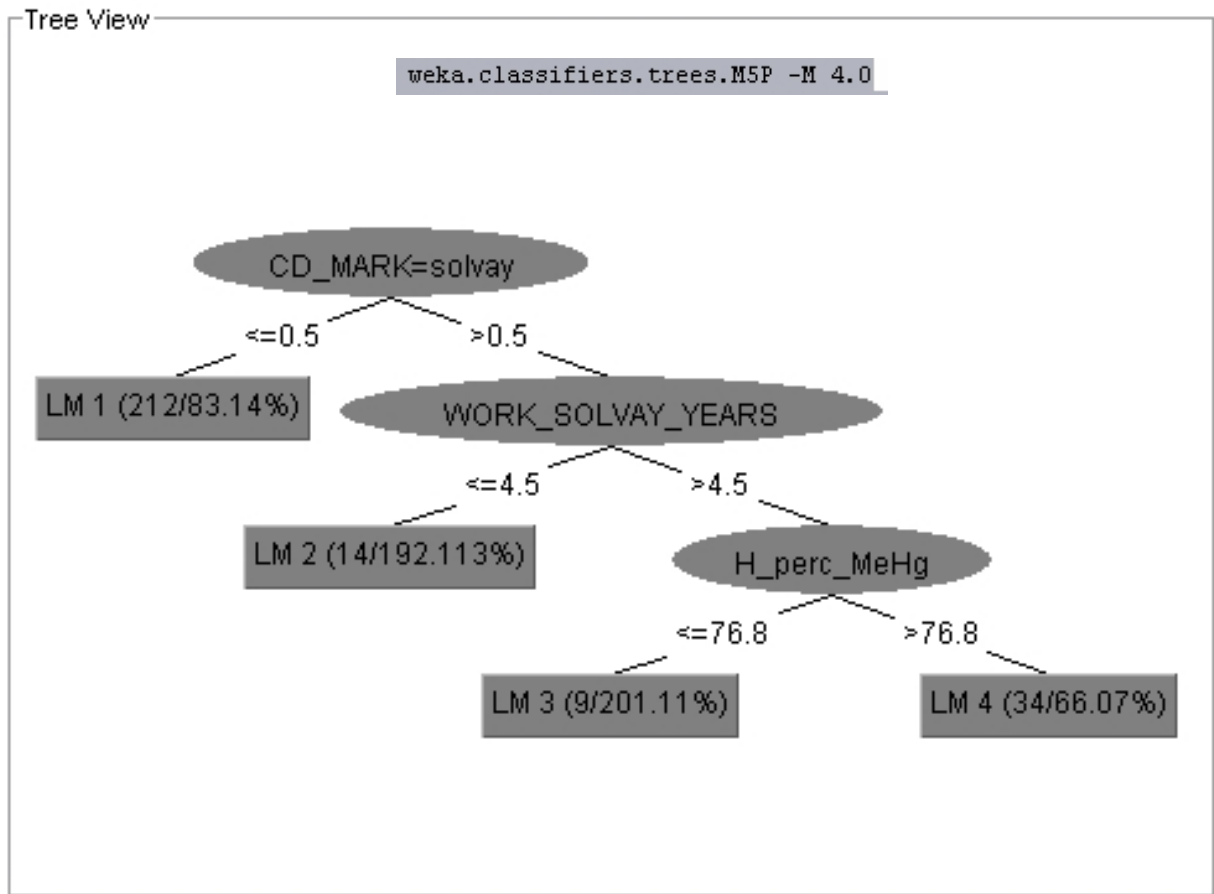


Machine learning methods

- Software WEKA: Regression trees and model trees (M5P).
- Models were built for each biomarker (A1M, NAG, albumine, 8-OHdG, U-Hg, H-Hg, U-Se) as an independent variable.
- For dependent variables we used:
 - Attributes and other biomarkers
 - Attributes without other biomarkers
- Correlation coefficients were compared between different models.



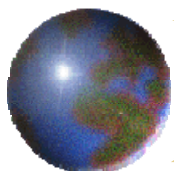
Concentration of Hg in urine:



Instances: 269
 Attributes: 28

- CD_MARK
- AGE
- WORK_SOLVAY_YEARS
- WORK_TYPE
- FL_WORK_WITHIN_yes000M
- FL_LIVE_WITHIN_yes000M
- DT_LIVE_SINCE_YEAR
- FL_EAT_VEGETABLES_IN_Y_GARDEN
- FL_SMOKER
- FL_DAILY_CHEW_GUM
- FL_TAKE_MEDICINE_REGULARLY
- FL_AMALGAM_FILLINGS
- MR_AMALGAM_FILLINGS
- FL_AMALGAM_REMOVED
- MR_SWFISH_PER_WEEK
- MR_TIMES_SWFISH_LAST_MONTH
- Predatoryfish
- CD_KIND_OF_SALTWATER_FISH
- CD_SALTWATER_FISH_ORIGIN
- FL_SEX
- ALM_(mg/gcreatinine)
- Albumine_(mg/gcreatinine)
- NAG_(U/gcreatinine)
- U_Hg_(?g/gcreatinine)
- U_Se_(?g/gcreatinine)
- U_80Hg_(?g/gcreatinine)
- H_THg_(?g/g)
- H_perc_MeHg

Test mode: 10-fold cross-validation



Concentration of Hg in urine:

```
LM num: 1
U_Hg_(?g/gcreatinine) =
  0.526 * CD_MARK=solvay
  - 0.0232 * AGE
  - 0.0129 * WORK_SOLVAY_YEARS
  + 0.2644 * NR_AMALGAM_FILLINGS
  - 0.0084 * NR_TIMES_SWFISH_LAST_MONTH
  + 0.0578 * CD_KIND_OF_SALTWATER_FISH=fresh_Deep_frozen,deep_frozen,Deep_frozen_Frozen
  + 0.1458 * AIM_(mg/gcreatinine)
  + 0.0377 * U_Se_(?g/gcreatinine)
  + 0.7674
```

```
LM num: 2
U_Hg_(?g/gcreatinine) =
  1.6584 * CD_MARK=solvay
  - 0.1129 * AGE
  - 0.0407 * WORK_SOLVAY_YEARS
  + 0.4898 * NR_AMALGAM_FILLINGS
  - 0.0264 * NR_TIMES_SWFISH_LAST_MONTH
  + 5.7622 * CD_KIND_OF_SALTWATER_FISH=fresh_Deep_frozen,deep_frozen,Deep_frozen_Frozen
  - 0.7603 * AIM_(mg/gcreatinine)
  + 0.0081 * U_Se_(?g/gcreatinine)
  - 0.0577 * H_perc_MeHg
  + 16.186
```

```
LM num: 3
U_Hg_(?g/gcreatinine) =
  1.6584 * CD_MARK=solvay
  - 0.0565 * AGE
  - 0.0407 * WORK_SOLVAY_YEARS
  + 0.0618 * NR_AMALGAM_FILLINGS
  - 0.0264 * NR_TIMES_SWFISH_LAST_MONTH
  + 0.982 * CD_KIND_OF_SALTWATER_FISH=fresh_Deep_frozen,deep_frozen,Deep_frozen_Frozen
  + 0.8386 * CD_SALTWATER_FISH_ORIGIN
  + 0.0081 * U_Se_(?g/gcreatinine)
  - 0.0575 * H_perc_MeHg
  + 10.5727
```

```
LM num: 4
U_Hg_(?g/gcreatinine) =
  1.6584 * CD_MARK=solvay
  - 0.0565 * AGE
  - 0.0407 * WORK_SOLVAY_YEARS
  + 0.0618 * NR_AMALGAM_FILLINGS
  - 0.0264 * NR_TIMES_SWFISH_LAST_MONTH
  + 0.982 * CD_KIND_OF_SALTWATER_FISH=fresh_Deep_frozen,deep_frozen,Deep_frozen_Frozen
  + 0.0081 * U_Se_(?g/gcreatinine)
  - 0.0429 * H_perc_MeHg
  + 9.4208
```

```
CD_MARK=solvay <= 0.5 : LM1 (212/83.14%)
```

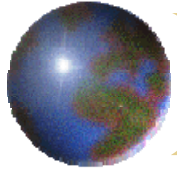
```
CD_MARK=solvay > 0.5 :
```

```
| WORK_SOLVAY_YEARS <= 4.5 : LM2 (14/192.113%)
```

```
| WORK_SOLVAY_YEARS > 4.5 :
```

```
| | H_perc_MeHg <= 76.8 : LM3 (9/201.11%)
```

```
| | H_perc_MeHg > 76.8 : LM4 (34/66.07%)
```



V prihodnje

- Obdelava podatkov pridobljenih iz Idrijske študije: rudarji, upokojeni rudarji in kontrolna skupina.
- Ocenitev krivulje izločanja Hg v urinu po prenehani izpostavljenosti pri populaciji upokojenih rudarjev.
- Interpretacija rezultatov.

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

1. Biološki učinki onesnažil in biomonitoring

1.3. Vloga perifitona pri pretvorbah živega srebra v rečnih ekosistemih, obremenjenih z živim srebrom

Suzana Žižek

Institutska mentorica: Radmila Milačič

Institutska komentorica: Milena Horvat

Fakultetni mentor: Mihael J. Toman, Oddelek za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

V Idriji je pol tisočletja deloval drugi največji rudnik živega srebra na svetu. Leta 1994 je rudarska dejavnost prenehala in rudnik je trenutno v fazi postopnega zapiranja. Učinkovitost pridobivanja rude je bila le okoli 73%, preostanek pa se je sproščal v okolje. Zato so v Idriji in okolici močno povišane ravni živega srebra v prsti. Odcedne vode iz rudnika se izlivajo v reko Idrijco, ki prenaša velike množine živega srebra s svojim tokom vse do Tržaškega zaliva. Čeprav v reko Idrijco prihaja živo srebro v anorganski obliki, so visoke tudi koncentracije metil živega srebra, ki se po toku navzdol še povečujejo. Glavni metilatorji so sulfat reducirajoče bakterije, ki se nahajajo v sedimentih in v združbi perifitona. Naša raziskava se bo osredotočila na proučevanje metilacije Hg v perifitonu reke Idrijce.

Delo bo potekalo na terenu in v laboratoriju. Sistematične meritve bodo opravljene na 4 lokacijah vzdolž reke Idrijce. Na teh lokacijah bodo redno izvedene meritve Hg in njegovih oblik v tekoči vodi in porni vodi (THg, Hg(0), MeHg, Hg(II), DMeHg), sedimentih (THg, MeHg), perifitonu in ostalih organizmih na nižji stopnji prehranjevalnih verig in opravljene bodo biološke analize perifitonske združbe. Čas vzorčenja bo izveden glede na letne čase, hidrometeorološke pogoje ter hidrološke razmere. Razen živega srebra in njegove speciacije bodo analize zajemale tudi splošne parametre kvalitete vode kot so določitev nutrientov, redoks potencial, pH, BOD, raztopljen organski ogljik, itd. Vzoredno z rednim opazovanjem v Idriji bomo uporabili tudi umetne substrate, na katerih se bo razvila perifitonska združba, predvsem z namenom boljšega razumevanja akumulacije Hg in njegovih pretvorb v perifitonu in za nadaljnje delo v laboratoriju.

V laboratorijskih razmerah bomo uporabili radioaktivne izotope, s katerimi bomo preučevali osnovne pretvorbe Hg (redukcija, metilacija in demetilacija) v vzorcih iz Idrijce. Delo bo potekalo s pomočjo radioaktivno označenega sledilca ¹⁹⁷Hg. Pričakujemo, da bomo s pomočjo ¹⁹⁷Hg lahko sledili procesu metilacije v perifitonski združbi in določili, kolikšen delež živega srebra se tam metilira.

1st MR O-2, April 19, 2006

1. Biological effects of contaminants and biomonitoring

1.3. The role of periphyton in mercury transformations in river ecosystems, polluted with mercury

Suzana Žižek

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Radmila Milačič


Co-supervisor at the Jožef Stefan Institute: Milena Horvat

Supervisor at the university : Mihael J. Toman, Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

In the town of Idrija (Slovenia) the world's second largest mercury mine was operational for 500 years. In 1994 the mining activities ceased and the mine is currently in the phase of closure. The efficiency of ore processing was only about 73%, the rest of the mercury being released into the environment. Therefore, mercury levels in the soil around Idrija are strongly elevated. Drainage waters from the mine flow in the river Idrijca, which carries large amounts of mercury all the way to the Gulf of Trieste (Adriatic Sea). Although mercury enters the river Idrijca in inorganic form, also methyl mercury (MeHg) concentrations are high and grow even higher downstream. The most important organisms in mercury methylation processes are sulphate reducing bacteria, which live in sediments and in the periphyton community. This investigation focuses on the study of mercury methylation in the periphyton of the Idrijca river.

The work is divided between the field and laboratory. Systematic measurements will be performed at four locations along the Idrijca river. At these locations, Hg measurements and speciation will be done in running water, pore water, sediments, and in periphyton and other organisms (macroinvertebrates) on the lower levels of the food chain. Biological analyses of periphyton will also be performed. Sampling will be planned in such a way to encompass all seasonal and hydrological and meteorological conditions. Beside mercury, other measured parameters will include nutrient loading, redox potential, pH, BOD, DOC etc. Parallel to constant observations in the Idrijca river, artificial substrates will be used, on which a periphyton community will develop, for use in further research in the laboratory.

Work in the laboratory will make use of radioactive isotopes for the study of basic mercury transformations (reduction, methylation and demethylation) in Idrijca samples. The work will involve a radioactively labelled tracer ¹⁹⁷Hg. With this tracer we will be able to follow the process of methylation in periphyton and estimate the relative amount of mercury in Idrijca that is methylated in this way.



Vloga perifitona pri pretvorbah živega srebra v rečnih ekosistemih, obremenjenih z živim srebrom

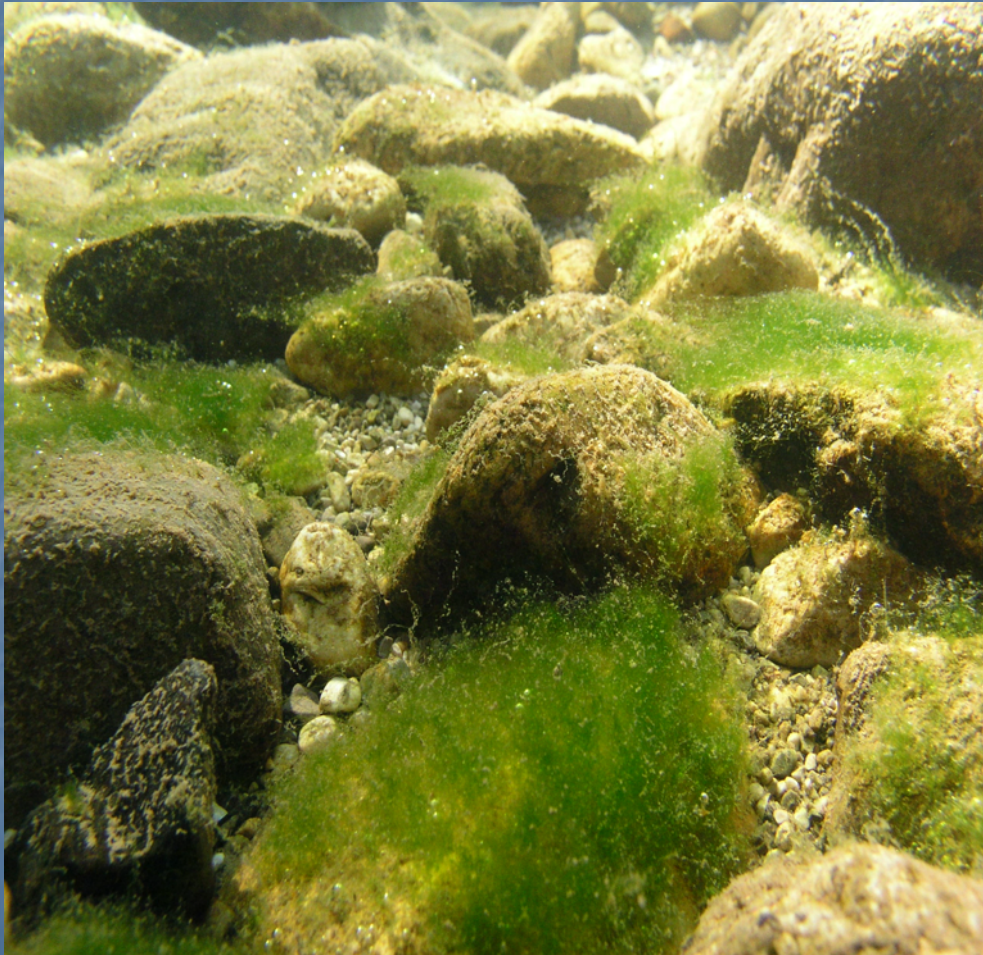
Suzana Žižek, univ.dipl.biol

Fakultetni mentor: prof.dr. Mihael J. Toman

Somentor: prof.dr. Milena Horvat

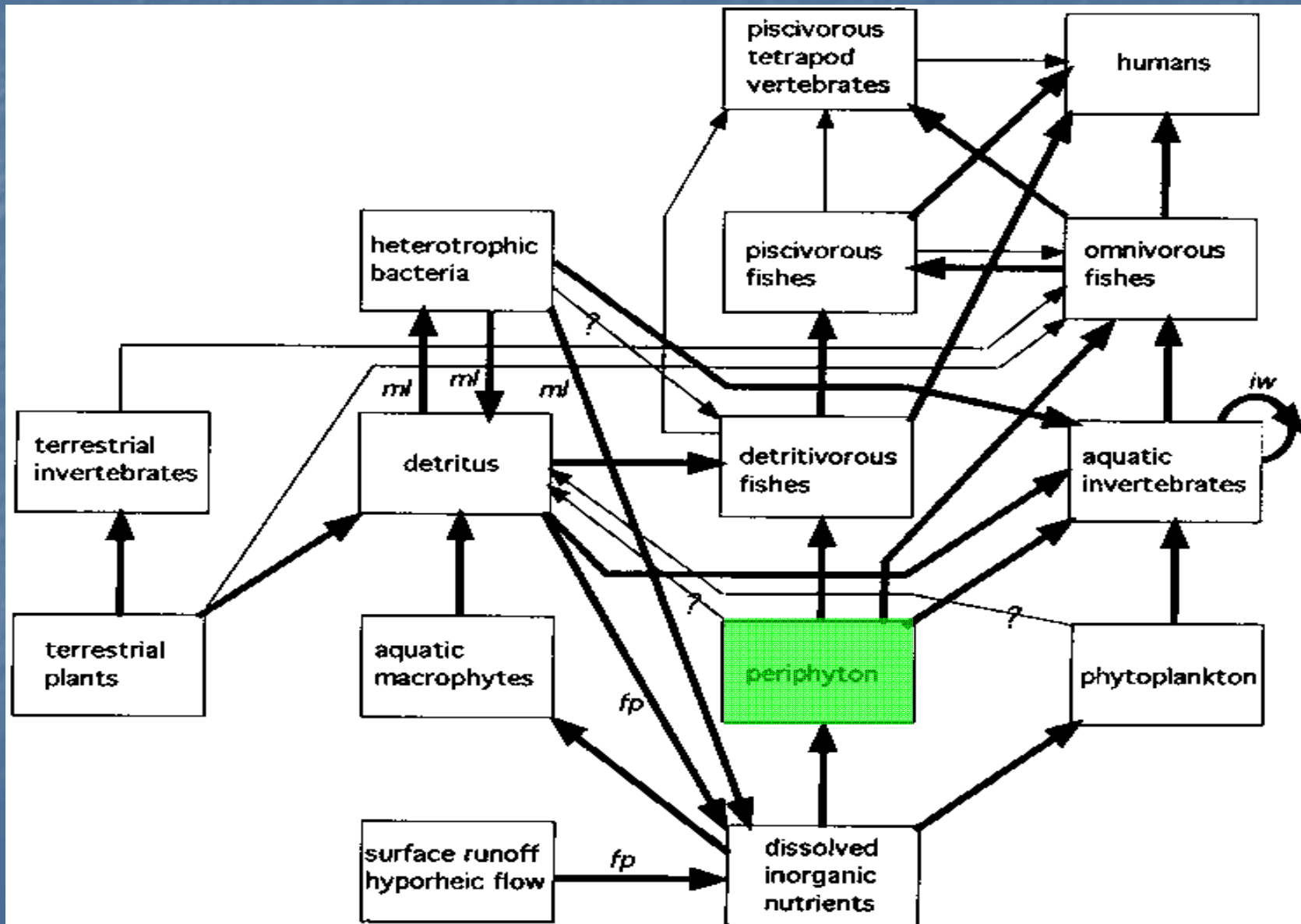
Delovni mentor: dr. Radmila Milačič

Perifiton



Združba obrasti na rečnem dnu, ki jo sestavljajo primarni producenti (nitaste zelene alge ter enocelične alge in cianobakterije) ter heterotrofni organizmi (bakterije, glive)

Rečni prehranski splet



Prifiton v reki Idrijci



Rast perifitonske združbe na umetnih substratih

- Najbolj reprezentativna združba perifitona v vodotoku je tista, ki se razvije na naravnem substratu, vendar je v nekaterih primerih vzorčenje iz naravnega substrata za namene raziskave neuporabno, zato si pomagamo z umetnimi substrati.
- Umetni substrati so zelo uporabno orodje za monitoring stanja voda in za primerjavo različnih ekosistemov.
- Material je potrebno izbrati glede potrebe raziskave. Standardizacija ni mogoča zaradi velike heterogenosti naravnega okolja in različnih potreb.

- Prednosti umetnih substratov:

- Umetni substrati omogočajo vzorčenje tudi na mestih, kjer je leto ponavadi oteženo (npr. ni trdega substrata, globoka voda, hiter tok).
- Z umetnimi substrati je odpravljena subjektivnost vzorčenja.
- Zmanjšane so razlike med habitati, saj umetni substrat predstavlja standardiziran mikrohabitat.
- Variabilnost vzorcev je zmanjšana zaradi homogenosti umetnih substratov, zato je večja verjetnost prostorske in časovne podobnosti vzorcev.
- Za vzorčenje z umetnimi substrati je potrebno manj znanja in spretnosti kot za neposredno vzorčenje iz naravnih substratov.

- Pomanjkljivosti umetnih substratov:

- Potrebno se je vrniti na mesto vzorčenja, kar je v velikih državah in v raziskavah z omejenimi finančnimi sredstvi lahko problem.
- Umetni substrati se lahko izgubijo, lahko pride do naravnih nesreč ali vandalizma.
- Material, ki ga izberemo za umetni substrat, vpliva na vrstno in številčno sestavo združbe.
- Orientacija umetnega substrata in čas izpostavljenosti vplivata na vrstno in številčno sestavo združbe

Živo srebro v rečnih ekosistemih

- V vodnem okolju je živo srebro lahko v treh oksidacijskih stanjih: elementarno Hg (Hg^0), dvo- (Hg^{2+}) in enovalentno Hg_2^{2+} (na to vplivajo mnogi parametri, npr. pH, temperatura, redoks potencial ter narava in koncentracija anionov, ki z živim srebrom tvorijo stabilne spojine).
- V vodi se živo srebro lahko veže na suspendirano snov (t.i. partikularno Hg), ali pa ga najdemo v raztopljeni obliki. Koeficient porazdelitve med partikularnim in raztopljenim Hg je v sladkovodnih sisteme v velikostnem razredu 1×10^5 . Vezava živega srebra na suspendirane delce igra pomembno vlogo pri odstranjevanju živega srebra iz vodnega stolpca s pomočjo usedanja in sedimentacije.

Metilacija živega srebra

- Glavni metilatorji anorganskega živega srebra so sulfat reducirajoče bakterije
- Metilacija je lahko biotski ali popolnoma kemični proces.
- Večjo vlogov rečnih ekosistemih pripisujejo mikrobnim metilaciji.
- Metil živo srebro (MeHg) ima sposobnost bioakumulacije in biomagnifikacije

Delovne hipoteze

- Pretvorbe živega srebra v rečnih ekosistemih so odvisne od različnih okoljskih faktorjev, kot so: hidrologija, letni časi, temperatura, obremenitev z živim srebrom, kemijske lastnosti vode, prisotnost bakterij
- Koncentracije MeHg v perifitonskih združbah so dober indikator procesov metilacije v vodnih ekosistemih (voda in sedimenti) in lahko služijo kot zgodnje opozorilo (early warning system) o aktivni metilaciji in vnosu toksičnega MeHg v višje trofične nivoje.

Metode dela

- Na terenu:
 - Sistematične meritve na 4 lokacijah vzdolž reke Idrijce. Meritve Hg in njegovih oblik v tekoči in porni vodi (THg, Hg(0), MeHg, Hg(II), DMeHg), v sedimentih (THg, MeHg), perifitonu in ostalih organizmih na nižjih stopnjah prehranskega spleta. Čas vzorčenja bo izveden glede na letne čase, hidrometeorološke pogoje ter hidrološke razmere.
 - Meritve nutrientov, redoks potenciala, pH, BOD, raztopljenega organskega ogljika.
 - Uporaba umetnih substratov, na katerih se bo razvila perifitonska združba, z namenom boljšega razumevanja akumulacije Hg in njegovih pretvorb v perifitonu in za nadaljnje delo v laboratoriju.
- V laboratoriju:
 - Delo z radioaktivnimi izotopi, s katerimi bomo preučevali osnovne pretvorbe Hg (redukcija, metilacija in demetilacija) v vzorcih iz Idrijce.

Terminski načrt

- Z meritvami in izpostavitvijo umetnih substratov bomo pričeli maja 2006.
- Ta del bo trajal 1 leto, tako da bodo zajeti vsi letni časi in prevladujoči rečni režimi
- Po enem letu meritev ter opazovanj rasti perifitona in proučevanju njegove sestave bomo začeli z delom v laboratoriju (določanje metilacije, demetilacije in redukcije živega srebra)

Pričakovani rezultati

- Predvidevamo, da nam bo raziskava dala rezultate, iz katerih bo mogoče sklepati, kolikšen je pomen prifitonske združbe pri metilaciji živega srebra ter to uporabiti pri zgodnjem prepoznavanju procesov metilacije v vodnih sistemih.
- Raziskava bo dala pomemben doprinos k poznavanju kroženja Hg v kontaminiranih rečnih ekosistemih, ki so v splošnem zelo slabo raziskani (v glavnem je največ raziskav narejenih v jezerih, akumulacijskih bazenih in morskem okolju).
- Delo bo prispevalo tudi k metodologijam upravljanja porečja reke Idrijce in Soče, ki je zaradi preteklega rudarjenja močno obremenjeno s Hg.

Pričakovani problemi pri raziskavi

- Na terenu težave z vremenskimi in hidrološkimi pogoji
- V laboratoriju težave s simulacijo naravnih pogojev
- Delo z radioaktivnimi izotopi

Hvala za pozornost!

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

1. Biološki učinki onesnažil in biomonitoring

1.4. Arzen in njegove interakcije v lišajskih steljkah

Tanja Mrak

Institutska mentorica: Zvonka Jeran

Fakultetni mentor: Franc Batič, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

V nalogi smo se osredotočili na arzen zaradi a) njegovih toksičnih učinkov, b) podobnosti ene od arzenovih spojin (arzenata) fosfatu, ki je esencialen za vsa živa bitja in c) pomanjkljivega védenja o njegovem obnašanju v lišajih in na splošno v vseh simbiotskih sistemih.

Za proučevanje smo izbrali listaste in grmičaste epifitske in terikolne lišaje, ki naravno uspevajo na območjih, obremenjenih z arzenom. Lišaji so namreč pogosto pionirski organizmi na nestabilnih podlagah z visoko vsebnostjo kovin in polkovin, med drugim tudi arzena. S primerjavo celokupnega arzena in arzenovih spojin v teh lišajih in njihovem okolju poskušamo ugotoviti primernost lišajev za bioindikacijo arzenovih spojin. Hkrati ugotavljamo izvor kontaminacije z arzenom pri lišajih ter morebitne pretvorbe arzena v lišajskih steljkah. Pri tem se soočamo s problemi slabe ekstrakcije arzena in njegovih spojin iz kompleksnega matriksa lišajev in jih rešujemo. Za določanje celokupnega arzena v lišajskih steljkah uporabljamo metodi RNAA in INAA, za določanje arzenovih spojin HPLC-UV-HGAFS, za lokalizacijo arzena pa mikro-PIXE (Mikroanalitski center IJS).

Zaradi zapletenega delovanja okoljskih dejavnikov v naravi, ki onemogoča nekatere zaključke, lišaje izpostavljamo arzenu tudi v kontroliranih pogojih. Sledimo časovni potek privzema nekaterih arzenovih spojin, ugotavljamo celokupni privzem, morebitne pretvorbe arzenovih spojin, ki bi kazale na prisotnost razstrupljevalnih procesov v lišajih, ter mesta kopičenja arzena. Pri tem uporabljamo zgoraj navedene metode. Poleg tega nas zanima tudi biokemijski odziv na izpostavljenost različnim koncentracijam arzena, pri čemer sodelujemo z Oddelkom za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

1st MR O-2, April 19, 2006

1. Biological effects of contaminants and biomonitoring

1.4. Interactions of arsenic in lichen thalli

Tanja Mrak

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Zvonka Jeran

Supervisor at the university: Franc Batič, Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

In our study, arsenic was chosen to be the element of interest because of a) its toxic effects, b) the analogy of one of the important arsenic compounds (arsenate) to phosphate, an essential compound for life and c) deficient/poor knowledge on arsenic behaviour in lichens and in symbiotic systems in general.

In this investigation, foliose and fruticose epiphytic and terricolous lichens, native to an arsenic-burdened areas were chosen. Lichens are often found as pionir organisms on unstable substrates with a high content of metals and metalloids, including arsenic. Comparisons of total arsenic and of arsenic compounds in lichens and their environment were made and the suitability of lichens for bioindication of arsenic compounds discussed. At the same time, some conclusions on the sources of contamination with arsenic in lichens and on the possible transformations of arsenic compounds in lichens were done. During the study, problems of low extraction efficiencies of arsenic and of its compounds from the complex lichen matrix were encountered and attempts to solve them made. For determination of total arsenic in lichen thalli, RNAA and INAA methods were used, while arsenic compounds were analysed by HPLC-UV-HGAFS, whereas arsenic localization was performed by micro-PIXE (Microanalytical Centre at Jožef Stefan Institute).

To eliminate a number of complexly interacting environmental factors that prevent the drawing of conclusions, lichens were also exposed to arsenic compounds in controlled conditions. A time-course study of arsenate uptake was made and the total uptake of arsenic from differently concentrated solutions of arsenate investigated. Analyses of arsenic compounds were performed to get information on the possible presence of arsenic detoxification processes in lichens. Accumulation sites of arsenic inside lichen thalli were localized. Biochemical responses of lichens to differently concentrated solutions of arsenic compounds are also of interest and analyses were performed in cooperation with the Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana.



Arzen in njegove interakcije v lišajskih steljkah

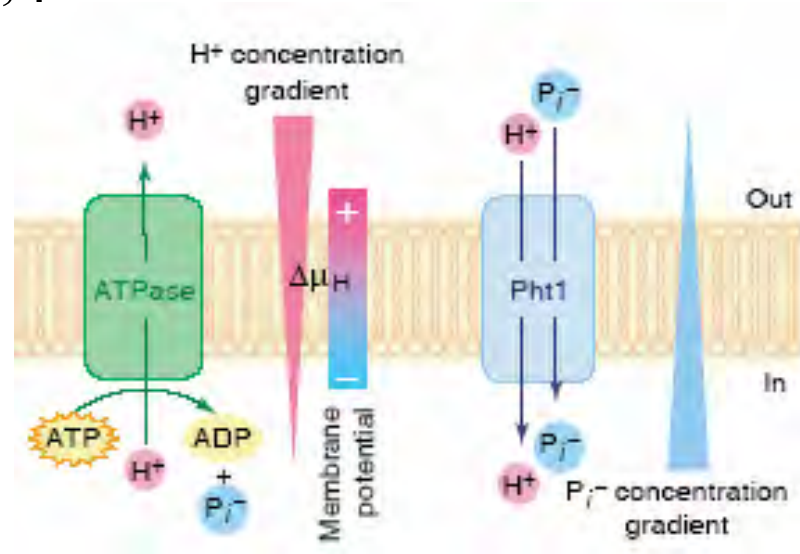
Tanja Mrak

Inštitutska mentorica: doc. dr. Zvonka Jeran, fakultetni
mentor: prof. dr. Franc Batič

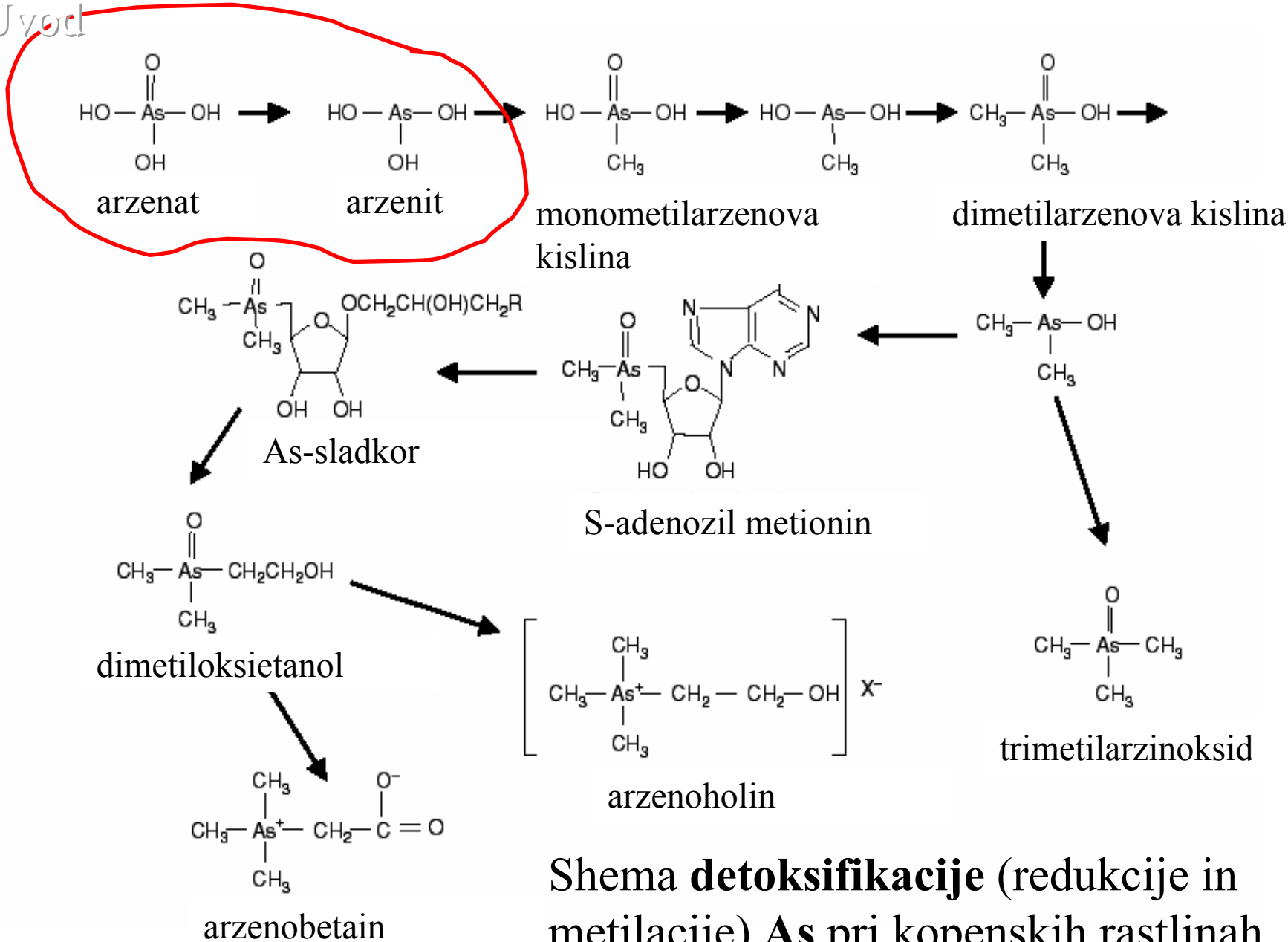


- arzen sposoben tvorbe velikega števila spojin, anorganskih in organskih
- v oksičnem neživem okolju prevladuje anorganska spojina **arzenat As(V)**, v anoksičnem pa **arzenit As(III)**
- As(V) – kemijski analog fosfata, privzem v celico s fosfatnimi prenašalci

Fosfatni prenašalec (Karandashov & Bucher 2005)

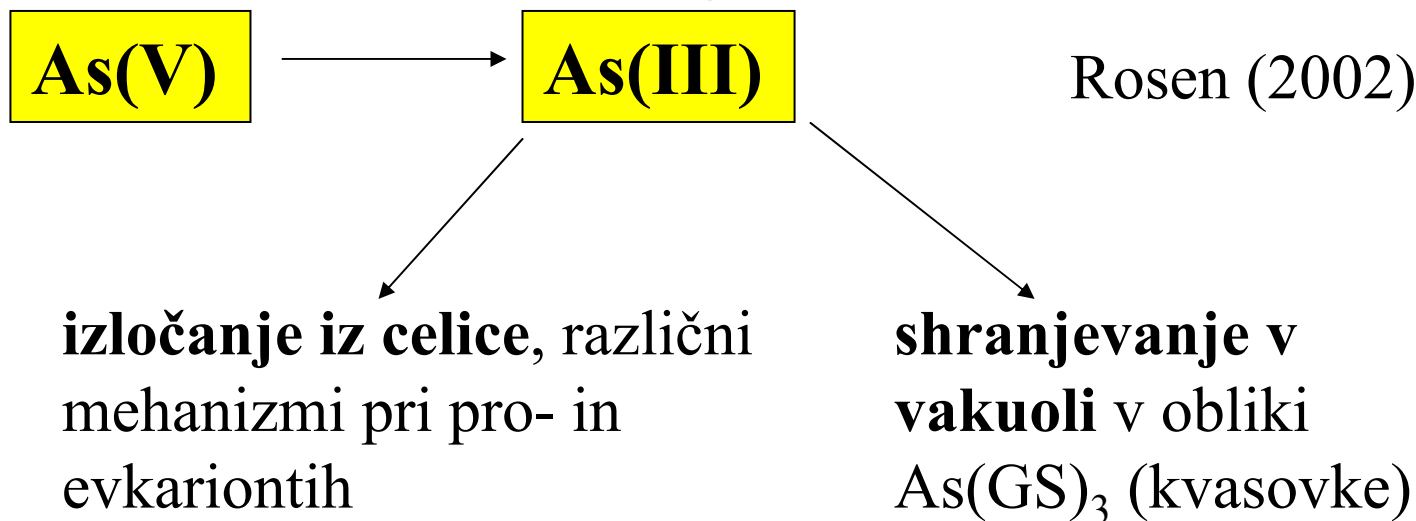


- **toksičnost arzenovih spojin** različna, anorganske > organske, As(III) > As(V)
- živi organizmi sposobni **detoksifikacije** As-spojin



Shema **detoksifikacije** (redukcije in metilacije) **As** pri kopenskih rastlinah (Meharg & Hartley-Whitaker 2002)

arzenat reduktaza+GSH+glutaredoksin

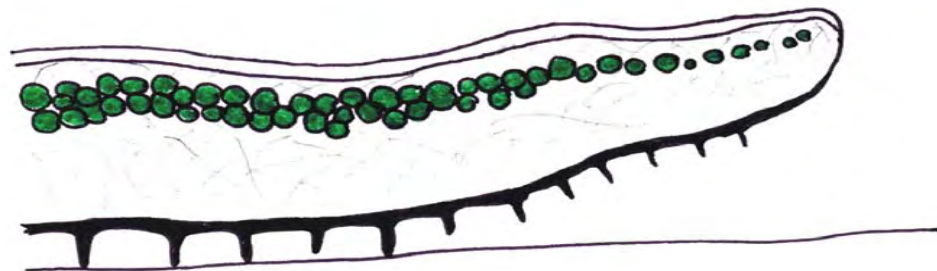


Pri redukciji As(V) v As(III) ter nadaljnji metilaciji nastajajo **ROS** → sinteza neencimatskih (GSH, askorbat) in encimatskih (SOD, katalaza) **antioksidantov** (Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

As(V) in As (III) pri algah in rastlinah sprožita sintezo **fitokelatinov** → As-PC kompleksi, lokalizacija ni znana (Pawlik-Skowronska 2004, Schmöger et al. 2000, Meharg & Hartley-Whitaker 2002).

Lišaj je zveza (simbioza) med **alga** ali cianobakterijo in **glivo**. Telo lišaja imenujemo **steljka**. Steljka je lahko enotna ali pa zgrajena iz več plasti, ki jih gradita gliva in alga (heteromerna). Pri listastih lišajih so te plasti:

- zgornji korteks (skorja),
- plast alg,
- medula (sredica)
- in spodnji korteks s pritrjevalnimi strukturami (gube, rizine).



Lišaji zaradi **odsotnosti zaščitnih tkiv** sprejemajo snovi **preko celotne površine**:

- a) privzem ionov (znotrajcelični in zunajcelični),
- b) zajetje delcev

Namen/cilji

Čim bolje razjasniti metabolizem ter učinke As v lišajih:

1. lišaji, ki naravno uspevajo na območjih, obremenjenih z As

a) celokupni As in As-spojine v različnih lišajskih vrstah in njihovem okolju

b) morebitne pretvorbe As-spojin v lišajih → primernost lišajev kot bioindikatorjev As-spojin?

c) izvor kontaminacije z As pri lišajih

d) mesta kopičenja As v steljki

2. lišaji, izpostavljeni As-spojinam v kontroliranih pogojih

a) morebitne pretvorbe As-spojin v kontroliranih pogojih (detoksifikacija)

b) privzem, variabilnost med steljkami, morebitna vrstna specifičnost

c) mesta kopičenja As-spojin v steljki

d) biokemijski odziv (vsebnost rastlinskih pigmentov, askorbinske kisline, tokoferola, GSH, morebitna indukcija PC oz. MT)

e) kompeticija arzenata s fosfatom

f) razjasniti vlogo obeh simbiontov v metabolizmu As

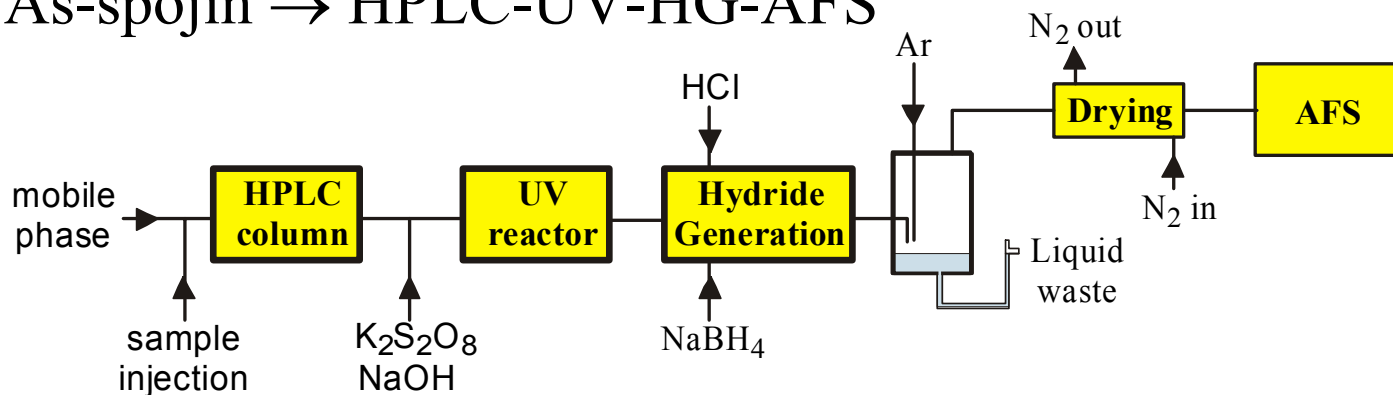
Delovne hipoteze

- privzem As-spojnin v obliki raztopine ter adsorbiranih na delce
- pretvorbe As-spojnin v lišajih – niso pasivni filtri
- gliva ščiti svoj vir hrane (alge) pred toksičnimi učinki As
- odgovor na toksične učinke: povečana sinteza antioksidantov oz. izraba le teh
- izločanje As v obliki arzinov – *Penicillium* in *Aspergillus* tega sposobna!
- mesta kopičenja As(V) se ujemajo z mesti kopičenja fosfata, ostale spojine se lahko kopičijo drugje
- fosfat zavira privzem arzenata

Določanje celokupnega As v suhi snovi: INAA in RNAA

Določanje As-spojnin (sodelovanje z dr. Z. Šlejkovec):

- ekstrakcija As-spojnin → HPLC-UV-HG-AFS



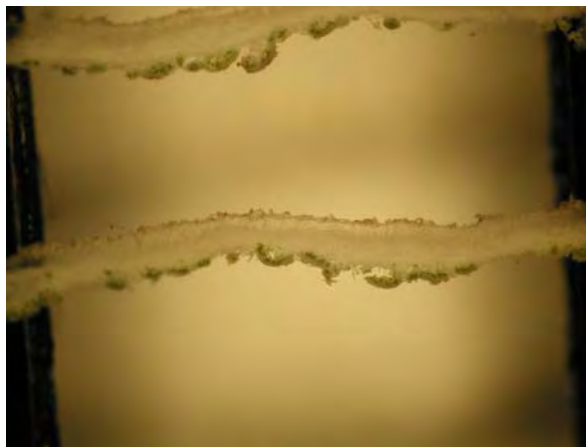
Eksperimentalni pogoji
(Šlejkovec et al. 2001)

Anionske spojine	Anionska izmenjevalna kolona Hamilton PRP X-100, 250x4.1 mm; 15 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 6.1
Kationske spojine	Kationska izmenjevalna kolona Alltech Adsorbosphere SCX 5U, 250x4.6 mm; 2.5 mmol L ⁻¹ piridin, pH 2.65; on-line UV razkroj
Arzenovi sladkorji	Anionska izmenjevalna kolona Hamilton PRP X-100, 250x4.1 mm; 20 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 5.8; on-line UV razkroj
Tio-arzenovi sladkorji (Schmeisser et al. 2004)*	Anionska izmenjevalna kolona Hamilton PRP X-100, 250x4.1 mm; 20 mmol L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , pH 5.8; on-line UV razkroj *oksidacija ekstraktov z H ₂ O ₂ , primerjava kromatogramov pred in po ekstrakciji
UV razkroj	3.1 m dolga, 0.5 mm i.d FEP teflonska cevka, ovita okoli 8 W Camag UV svetilke, 254 nm, s pretokom 2% K ₂ S ₂ O ₈ in 2% NaOH
Tvorba hidridov	4.4 M HCl, 3.0 ml min ⁻¹ in 1.5% NaBH ₄ v 0.1% NaOH, 3 ml min ⁻¹
AFS	Excalibur (PS Analytical, Kent, UK) atomski fluorescenčni spektrometer, As svetilka

Lokalizacija As (in ostalih elementov) **v steljki** (sodelovanje z Mikroanalitskim centrom IJS, ITN - Lizbona in BF):

- analiza preparatov z **mikro-PIXE** (protonsko vzbujanje rentgenskih žarkov na ionskem mikrožarku) v kombinaciji s **STIM** (vrstična transmisijska ionska mikroskopija)

Kombinacija mikro-PIXE in STIM omogoča mapiranje elementov ter izračun njihovih koncentracij. Prednosti metode: možnost lokalizacije elementa na tkivnem nivoju, hkratna analiza velikega števila elementov, razmeroma nizka meja detekcije v primerjavi z ostalimi metodami, ki omogočajo lokalizacijo.



Preparat lišaja *C. pyxidata*,
pripravljen za
analizo z
mikrožarkom

Biokemijski odziv: sodelovanje s Katedro za aplikativno botaniko Oddelka za agronomijo BF

Rastlinski pigmenti in tokoferol (po Tauzs et al. 2003)
ekstrakcija v acetonu, analiza: HPLC sistem z različnimi detektorji

Rastlinski pigmenti	
Kolona	Spherisorb ODS2 5U (5 μ m, 250 x 4.6 mm), T kolone 5°C
Mobilna faza	A: acetonitril/voda/metanol 100/10/5 (V/V/V), B: aceton/etilacetat 2/1 (V/V); pretok 1 ml min ⁻¹
Detektor	UV/VIS, 440 nm

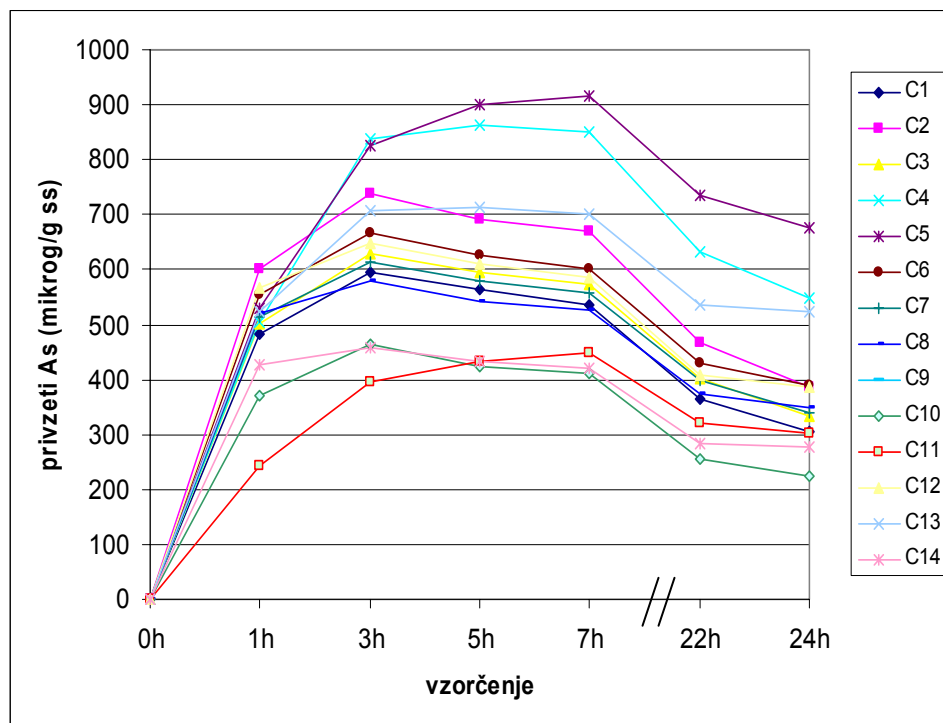
Tokoferol	
Kolona	Spherisorb ODS2 5U (5 μ m, 250 x 4.6 mm)
Mobilna faza	metanol, pretok 1 ml min ⁻¹
Detektor	fluorescenčni, ekscitacija pri 295 nm, emisija pri 325 nm

Vzorci iz okolja, obremenjenega z As

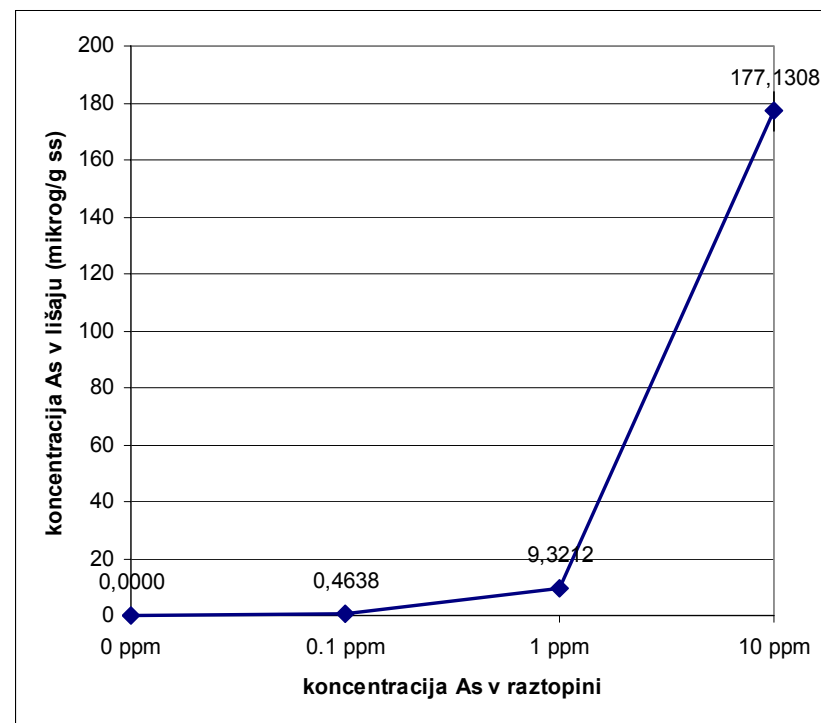
- del teh rezultatov že objavljen (Talanta 69(2006) 251-258):
 - ekstrakcija As spojin (iz 2 vrst lišajev)
 - nizki izkoristki ekstrakcije (okoli 20 %) z ekstraktanti, ki se običajno uporabljajo za ekstrakcijo As-spojin (voda pri različnih T, MeOH/voda v različnih razmerjih)
 - precejšnje izboljšanje ekstrakcije s shemo po Wenzlu et al. (2001), ki se sicer uporablja za vzorce zemlje:
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \rightarrow (\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4 \rightarrow \text{NH}_4\text{-oksalatni pufer} \rightarrow \text{NH}_4\text{-oksalat} + \text{askorbinska kislina} \rightarrow \text{KOH}$: 45 in 83%
 - ugotovili, da je velik del As v lišajih vezan na ujete delce in da so lišaji sposobni določene pretvorbe teh delcev, tako da se v njih poveča delež biodostopnega As
 - primerjava s spojinami v okolju (vzorcih tal): lišaji najverjetneje sposobni pretvorb As-spojin in kot taki ne kažejo stanja v svojem okolju (niso dobri bioindikatorji As-spojin) \rightarrow potrebna potrditev v drugem delu naloge

Izpostavitve lišajev raztopini As(V) v kontroliranih pogojih

- časovni potek privzema As(V) iz raztopine pri *H. physodes* in variabilnost v privzemu med posameznimi steljkami iste vrste
- celokupna količina privzetega As iz raztopin z različnimi koncentracijami As v obliki As(V) pri *H. physodes*



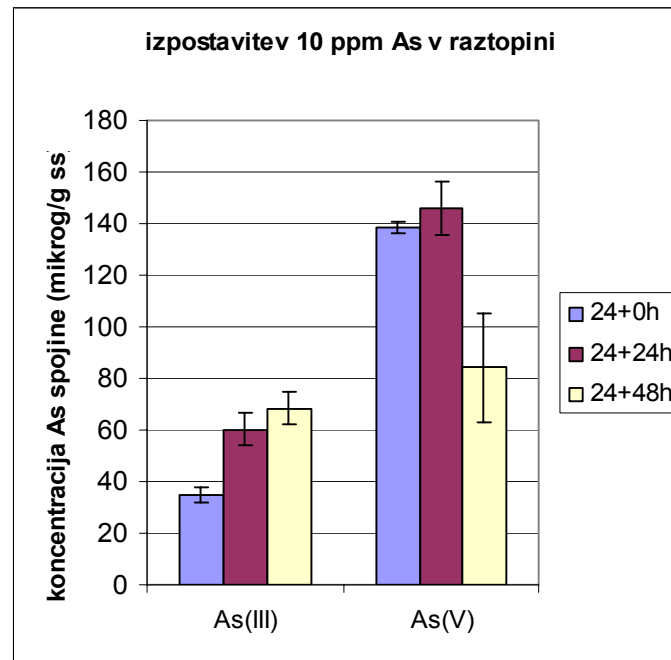
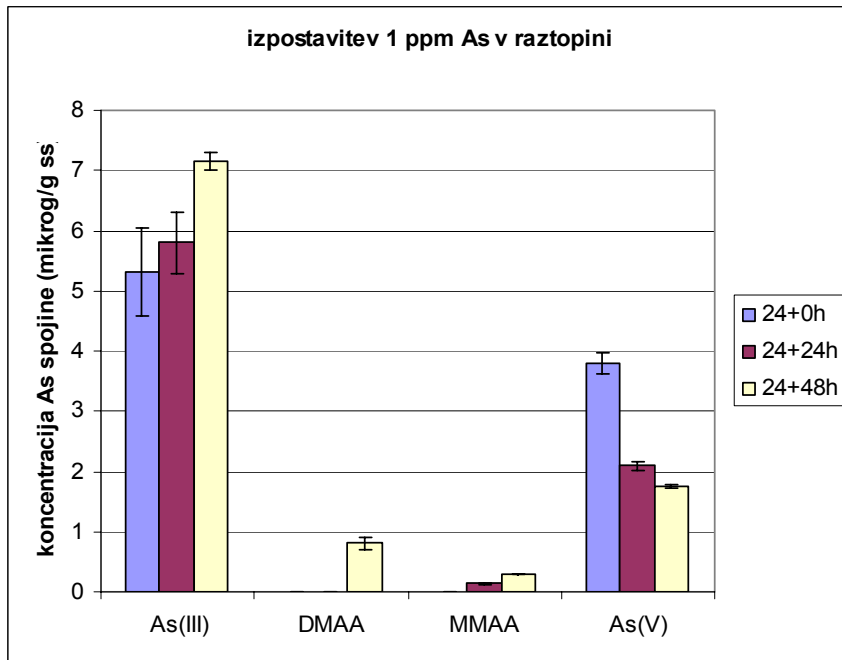
Privzeti As (mikrog/g ss) pri lišajih izpostavljenih 4 ppm As v obliki As(V)



Privzeti As (mikrog/g ss) pri lišajih izpostavljenih 0, 0.1, 1 in 10 ppm As v obliki As(V)

Dosedanji rezultati

- v ekstraktih lišajev vrste *H. physodes*, izpostavljenih 1 in 10 ppm As (del vzorca po izpostavitvi inkubiran 24 oz. 48h) v obliki As(V) smo ugotavljali prisotne As-spojine:



	Konzentracija As pri izpostavitvi	As(III)/As(V)±stdev	As(III)/As(V) ±stdev
		1 ppm	10 ppm
Čas izpostavitve +inkubacije	24+0h	1,40±0,13	0,25±0,02
	24+24h	2,78±0,16	0,44±0,01
	24+48h	4,08±0,03	0,64±0,12



- lokalizacija As z metodo mikro-PIXE pri in-situ vzorcih lišajev ni bila uspešna zaradi sočasne vsebnosti Pb v lišajih – pride do prekrivanja vrhov v spektru

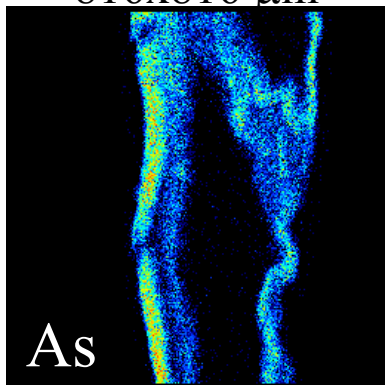
As 10,543 keV ($K\alpha_1$) 10,507 keV ($K\alpha_2$)

Pb 10,551 keV ($L\alpha_1$) 10,449 keV ($L\alpha_1$)

- lokalizacija As pri lišajih, izpostavljenih raztopini As v obliki As(V) (50 ppm) v kontroliranih pogojih mogoča, a je potrebna še kvantifikacija meritev

Dosedanji rezultati

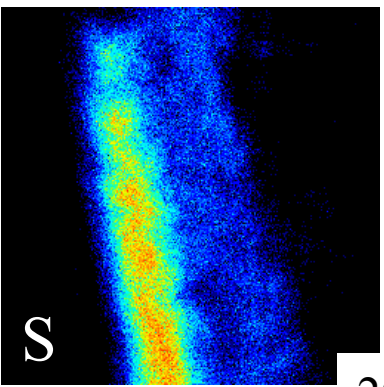
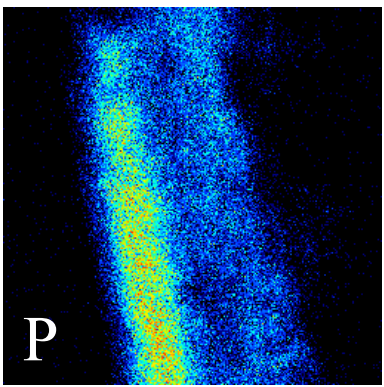
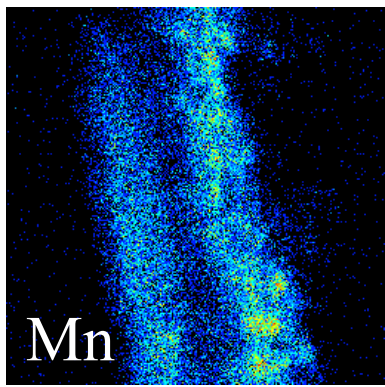
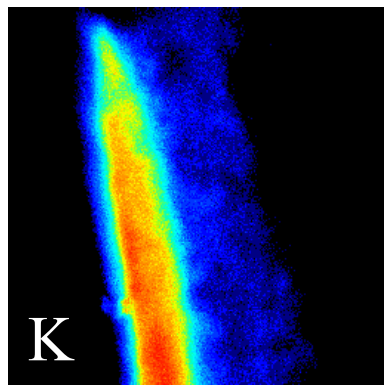
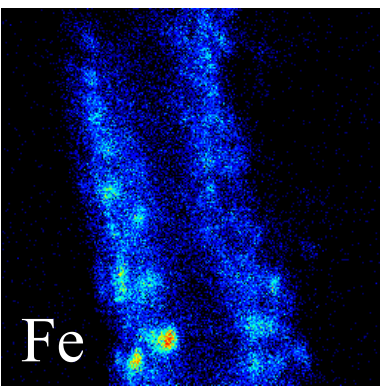
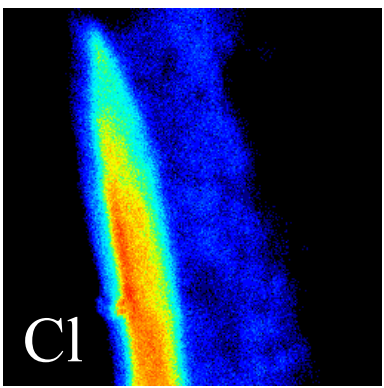
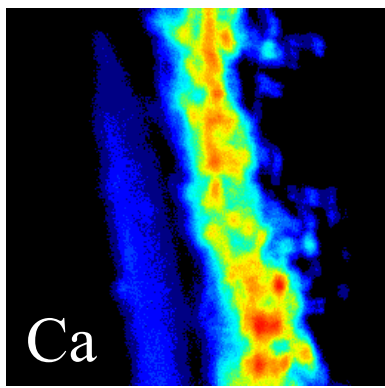
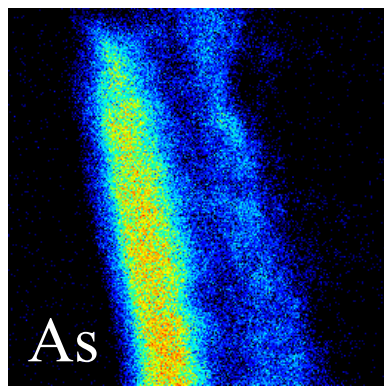
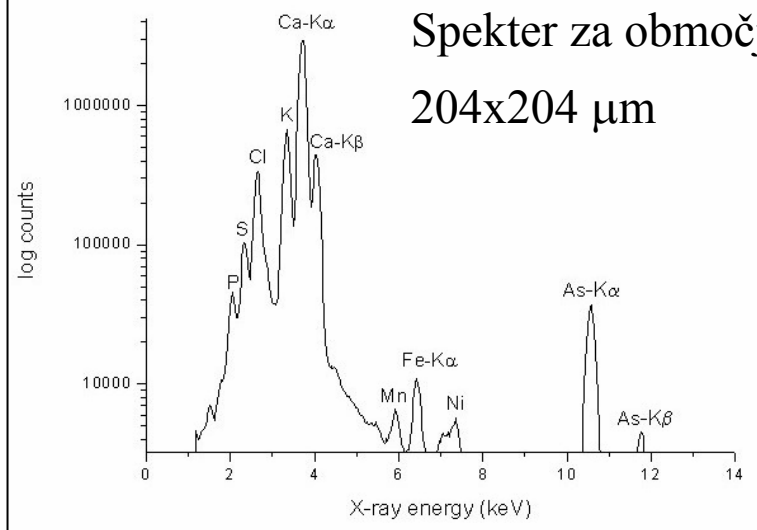
816x816 μm



H. physodes

Spekter za območje

204x204 μm



204x204 μm



1. Dan MR O-2, 19. april 2006

2. Analizne metode

2.1. Razvoj postopkov za določanje sledov nekaterih elementov z nevtronsko aktivacijsko analizo na osnovi induciranih kratkoživih nuklidov

Urška Repinc

Institutska mentorica: Ljudmila Benedik

Fakultetni mentor: Boris Pihlar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Nevtronska aktivacijska analiza (NAA) je izotopsko specifična tehnika, ki temelji na inducirani jedrski reakciji nevtrona določevanega elementa z nevtroni in merjenju aktivnosti inducirane nuklida. Ker sta občutljivost in natančnost NAA odvisni od zmožnosti ločitve aktivnosti določevanega elementa od ostalih aktivnih sestavin vzorca, je določanje sledov elementov z meritvijo induciranih kratkoživih nuklidov pogosto mogoče le z radiokemijsko nevtronsko aktivacijsko analizo (RNAA), pri kateri določevani element po obsevanju in pred meritvijo selektivno ločimo.

Namen mojega doktorskega dela je bil razvoj radiokemijskih postopkov za (zaporedno) določanje elementov v sledovih v vzorcih biološkega izvora in vzorcih vod, preko induciranih kratkoživih nuklidov. Osredotočila sem se na elemente V, U, I, Mn, Co ter jih določala preko kratkoživih induciranih nuklidov ^{52}V ($t_{1/2} = 3,76$ min), ^{239}U ($t_{1/2} = 23,5$ min), ^{128}I ($t_{1/2} = 25$ min), ^{56}Mn ($t_{1/2} = 2,58$ h) in $^{60\text{m}}\text{Co}$ ($t_{1/2} = 10,48$ min). Uporabila sem različne tehnike priprave vzorca (mokri razkroj ali razkroj v talini) in različne separacijske tehnike (ekstrakcijo, obarjanje in ionsko izmenjavo). Uporabljala sem sledilske tehnike za določanja izkoristka separacije. V ta namen sem pripravila izotopska sledilca ^{54}Mn in ^{58}Co z obsevanjem Fe in Ni s hitrimi nevtroni. Za določanje izkoristka separacije V sem uporabila spektrofotometrijo. Razvila sem postopke za zaporedno določanje V in U; zaporedno določanje V, U in Mn; zaporedno določanje Co in Mn ter I in Mn. Preverila sem občutljivost določanja F in Se z INAA s sistemom hitre pnevmatske pošte preko kratkoživih induciranih nuklidov ^{20}F ($t_{1/2} = 11,0$ s) in $^{77\text{m}}\text{Se}$ ($t_{1/2} = 17,5$ s).

1st MR O-2, April 19, 2006

2. Analytical methods

2.1. Development of procedures for determination of some trace elements via induced short-lived nuclides using neutron activation analysis

Urška Repinc

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Ljudmila Benedik

Supervisor at the university: Boris Pihlar, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Neutron activation analysis (NAA) is based on the production of radioactive nuclides and their subsequent detection. Whereas entirely nondestructive, instrumental NAA (INAA) for the determination of trace elements in biological materials is frequently impossible, the desired information can be easily obtained using destructive, radiochemical NAA (RNAA). Since the short-lived induced radionuclides are the most sensitive radioactive indicators for a number of trace elements, the subject of this research was the development of new radiochemical procedures for (simultaneous) determination of V, U, I, Mn and Co using short-lived induced radionuclides.

The aim of the study was to improve and develop RNAA procedures for (simultaneous) determination of V, U, I, Mn and Co via the short-lived isotopes ^{52}V ($t_{1/2} = 3.76$ min), ^{239}U ($t_{1/2} = 23.5$ min), ^{128}I ($t_{1/2} = 25$ min), ^{56}Mn ($t_{1/2} = 2.58$ h) and $^{60\text{m}}\text{Co}$ ($t_{1/2} = 10.48$ min). Different dissolution procedures (wet-ashing and alkaline oxidative fusion) and separation procedures (ion exchange, solvent extraction and precipitation) were used. For the determination of the chemical yield the isotopic tracers ^{58}Co and ^{54}Mn were prepared using reactions of Ni and Fe with fast neutrons. The chemical yield for V was determined spectrophotometrically. The following procedures were developed: a procedure for the simultaneous determination of V and U, simultaneous determination of V, U and Mn; and for Co and Mn, I and Mn. The sensitivity of INAA using a fast pneumatic transfer system (FPTS) for instrumental determination (INAA) of V, Mn, F via ^{20}F ($t_{1/2} = 11.0$ s) and of Se via $^{77\text{m}}\text{Se}$ ($t_{1/2} = 17.5$ s) was evaluated.



Razvoj postopkov za določanje sledov nekaterih elementov z nevtronsko aktivacijsko analizo na osnovi induciranih kratkoživih nuklidov

Urška Repinc

Mentorica: dr.Ljudmila Benedik

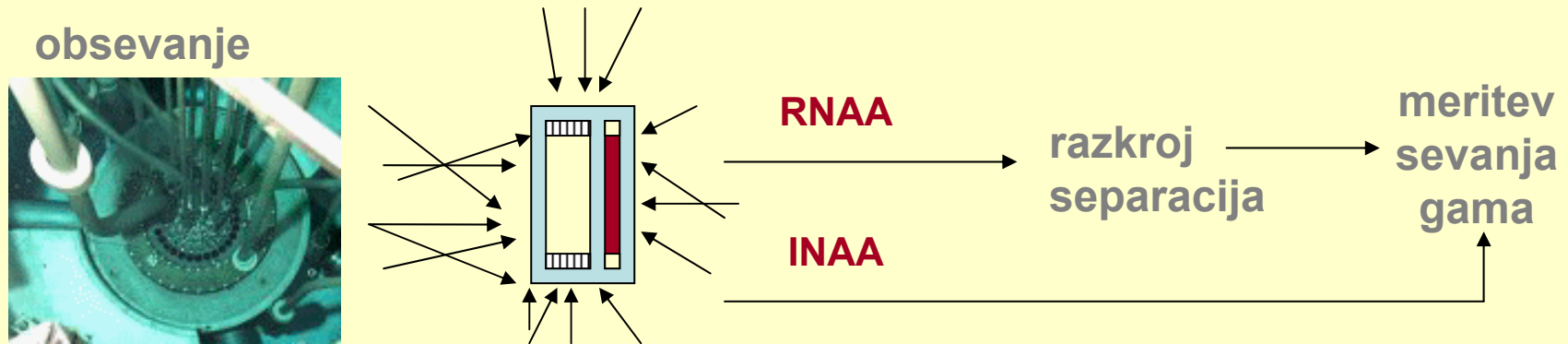
Fakultetni somentor: prof.dr.Boris Pihlar

Cilj mojega raziskovalnega dela

- uporaba induciranih kratkoživih nuklidov v NAA,
- razvoj postopkov za zaporedno določanje elementov v sledovih (V, U, Mn in Co, I),
- poudarek na analizi vzorcev biološkega porekla in vzorcev vod,
- preverjanje občutljivosti INAA za določanje elementov Se in F s sistemom hitre pnevmatske pošte (FPTS)
- vpeljava novosti na področju RNAA v sodelovanju z drugimi raziskovalnimi skupinami.



Nevtronska aktivacijska analiza (NAA)



Biološki vzorci in vodne raztopine so idealne matrice za NAA, ker:

- so efekti nevtronskega lastnega ščitenja vzorca/standarda in atenuacija gama žarkov zanemarljivo majhni,
- ker matrico vzorca sestavljajo elementi kot so H, C, N in O, ki se zanemarljivo aktivirajo.

Težave povzročajo:

- znatna vsebnost Na, P, Cl in Br → večja radioaktivnost vzorca in večja izpostavljenost operaterja,
- spektralne interference zaradi ^{24}Na (15 h), ^{38}Cl (37,3 min), ^{80}Br (17,6 min), itd.

RNAA – kratkoživi inducirani radionuklidi ($t_{1/2} \sim$ nekaj min)

$^{51}\text{V}(n,\gamma)^{52}\text{V}(t_{1/2} = 3,76 \text{ min})$

$\sigma = 4,88 \pm 0,04 \text{ b}$, $\Theta = 99,8 \%$,

$E_\gamma = 1434,2 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 100 \%$)

$^{238}\text{U}(n,\gamma)^{239}\text{U}(t_{1/2} = 23,5 \text{ min}) \rightarrow ^{239}\text{Np}$ ($t_{1/2} = 2,35 \text{ d}$)

$\sigma = 2,70 \pm 0,02 \text{ b}$, $\Theta = 99,3 \%$,

$E_\gamma = 74,7 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 59,3 \%$)

$^{55}\text{Mn}(n,\gamma)^{56}\text{Mn}(t_{1/2} = 2,58 \text{ h})$

$\sigma = 13,3 \pm 0,2 \text{ b}$, $\Theta = 100 \%$,

$E_\gamma = 846,6 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 99 \%$)

$^{59}\text{Co}(n,\gamma)^{60\text{m}}\text{Co}(t_{1/2} = 10,5 \text{ min}) \rightarrow ^{60}\text{Co}$ ($t_{1/2} = 5,272 \text{ y}$)

$\sigma = 20 \pm 2 \text{ b}$, $\Theta = 100 \%$,

$E_\gamma = 58,6 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 2,1 \%$)

$^{127}\text{I}(n,\gamma)^{128}\text{I}(t_{1/2} = 24,99 \text{ min})$

$\sigma = 7 \pm 0,6 \text{ b}$, $\Theta = 100 \%$,

$E_\gamma = 442,9 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 16,9 \%$)



Obsevanje v PT s hitrostjo fluence termičnih nevtronov $\sim 3,5 \cdot 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Vpliv interferenčnih reakcij

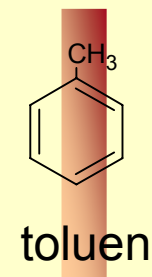
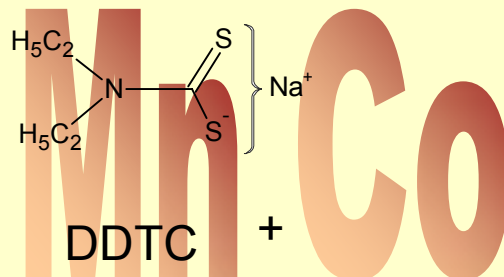
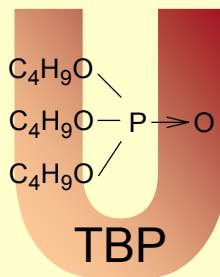
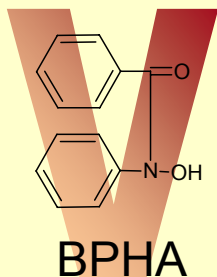
Tabela 1: Vpliv interferenčnih reakcij

Tarča / izotopski delež (%)	Reakcija	σ , mb	Interferenca
$^{52}\text{Cr}/83,79$	$^{52}\text{Cr}(n,p)^{52}\text{V}$	$1,09 \pm 0,08$	$77 \mu\text{g g}^{-1}$
$^{55}\text{Mn}/100$	$^{55}\text{Mn}(n,\alpha)^{52}\text{V}$	$0,11 \pm 0,030$	$7,3 \mu\text{g g}^{-1}$
$^{56}\text{Fe}/91,7$	$^{56}\text{Fe}(n,p)^{56}\text{Mn}$	$1,07 \pm 0,08$	$22,5 \mu\text{g g}^{-1}$
$^{58}\text{Co}/100$	$^{59}\text{Co}(n,\alpha)^{56}\text{Mn}$	$0,156 \pm 0,009$	$34,5 \mu\text{g g}^{-1}$
$^{60}\text{Ni}/26,23$	$^{60}\text{Ni}(n,p)^{60\text{m}}\text{Co}$	$1,98 \pm 0,2$	$15,3 \mu\text{g g}^{-1}$
$^{63}\text{Cu}/69,1$	$^{63}\text{Cu}(n,\alpha)^{60\text{m}}\text{Co}$	$0,5 \pm 0,060$	$2,7 \mu\text{g g}^{-1}$

→ Obsevamo v PT s hitrostjo fluence termičnih nevtronov $\sim 3,5 \cdot 10^{12}$ n $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ in gledamo prispevek hitrih nevtronov.

Separacijske metode v RNAA

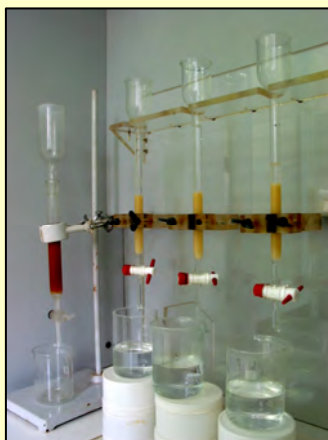
1.) Ekstrakcija



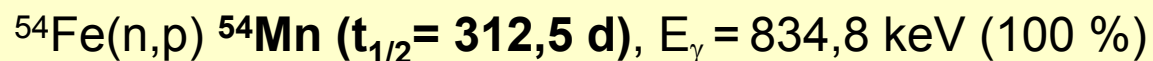
2.) Obarjanje

- t.i. soobarjanje inducirane nuklida z nosilcem

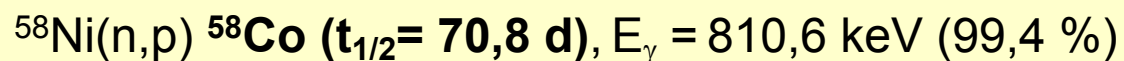
3.) Ionska izmenjava



Za pripravo sledilcev ^{54}Mn iz reakcije s hitrimi nevtroni:



- in sledilca ^{58}Co :



Razkroj vzorca v RNAA



1.) Mokri razkroj v kislinah

- H_2SO_4 , HNO_3 , HClO_4 ali H_2O_2 ,
- v bučkah iz kremenovega stekla (Kjelhdal bučke),
- s segrevanjem nad plamenom (Bunsenov gorilnik).

2.) Hitri razkroj v talini

- NaOH in Na_2O_2 ,
- v lončkih iz steklastega ogljika,
- s segrevanjem v peči na 900°C
(Classic Model No.0412G).



Meritev in ovrednotenje spektrov



HPGe detektorja z utorom



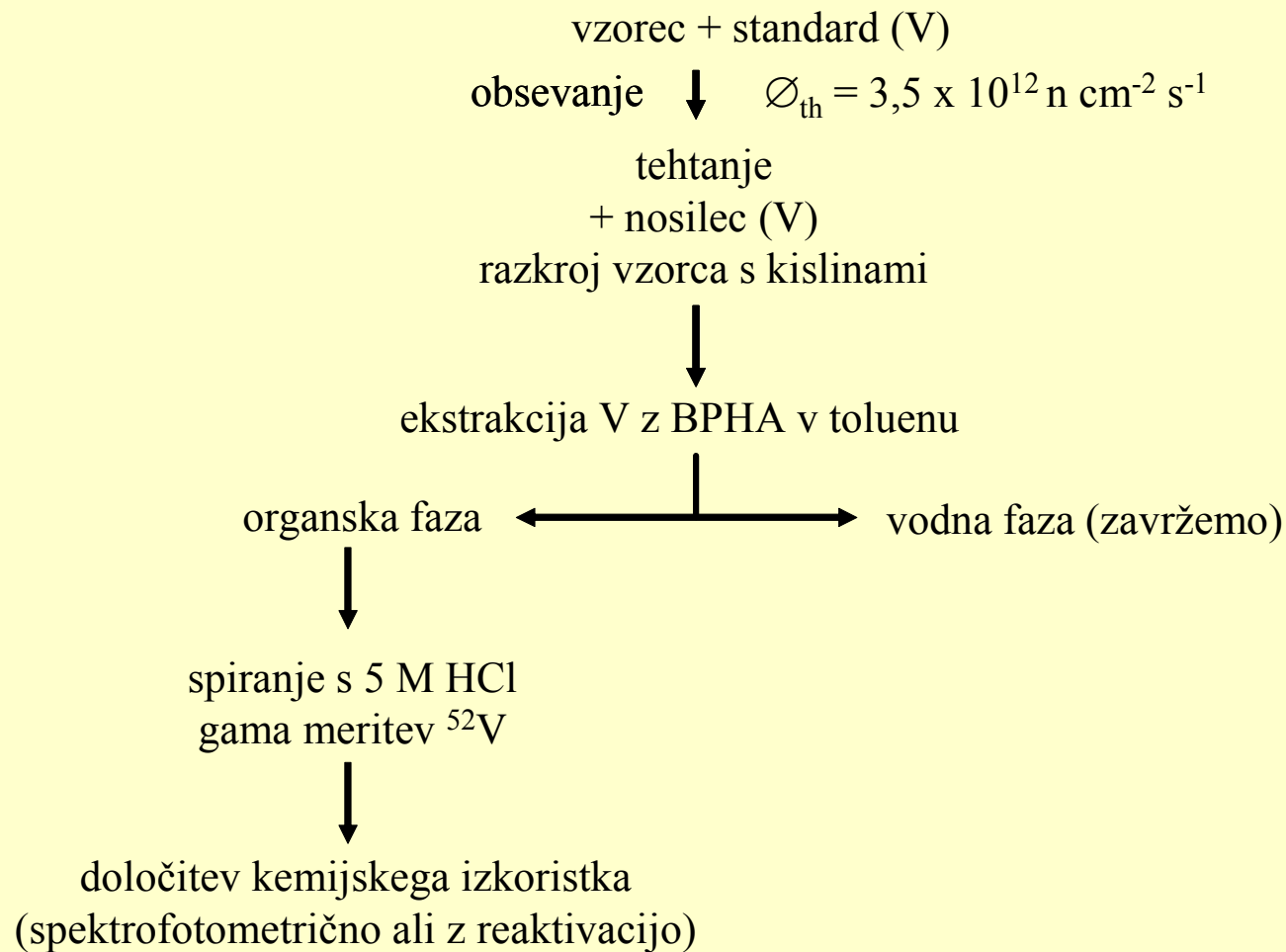
HPGe koaksialni detektorji

Ovrednotenje spektrov gama :

- **Hypermet-PC**, Version 5.0, Institute of Isotopes, Budimpešta, Madžarska, HyperLab 2002 Gamma Spectroscopy System, Version 2002.3.2.18,
- **HyperLabs Software**, Budimpešta, Madžarska.

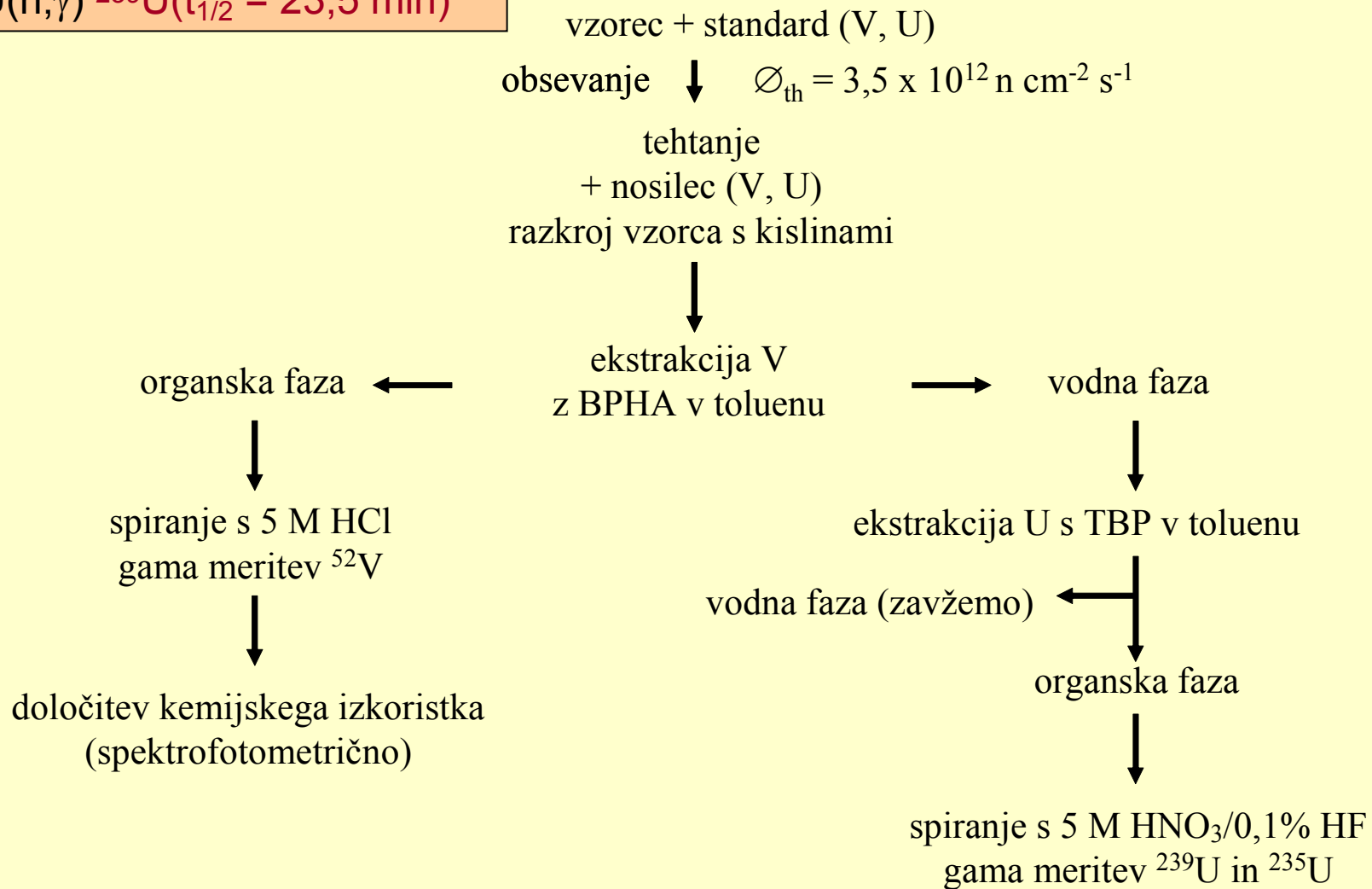
Razvoj postopkov za zaporedno določanje elementov

$^{51}\text{V}(n,\gamma)^{52}\text{V}(t_{1/2} = 3,76 \text{ min})$



Razvoj postopkov za zaporedno določanje V in U

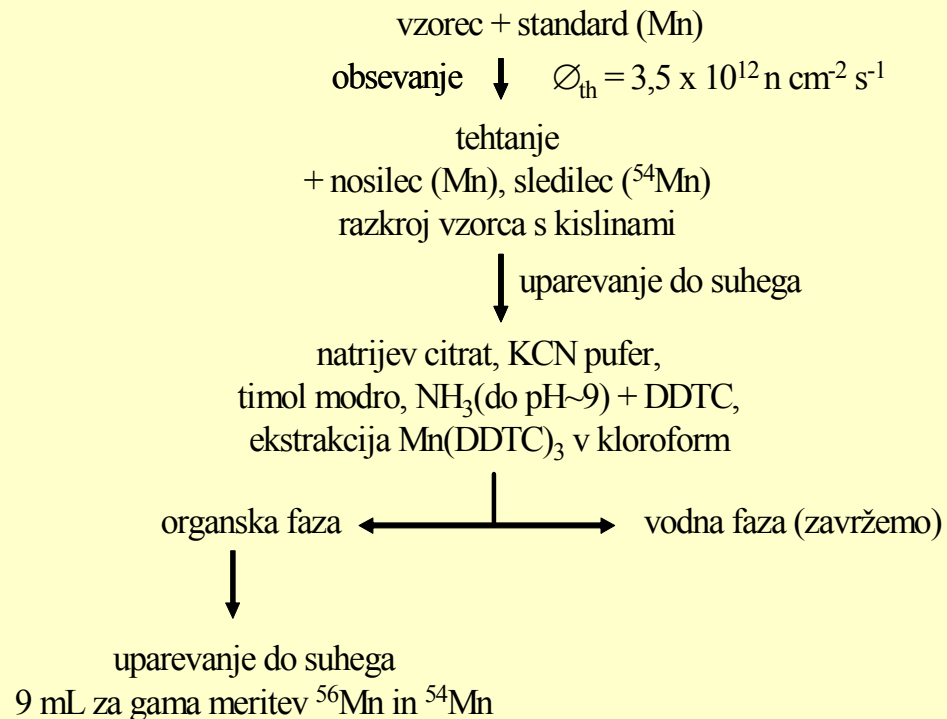
$^{51}\text{V}(\text{n},\gamma)$ $^{52}\text{V}(t_{1/2} = 3,76 \text{ min})$
 $^{238}\text{U}(\text{n},\gamma)$ $^{239}\text{U}(t_{1/2} = 23,5 \text{ min})$



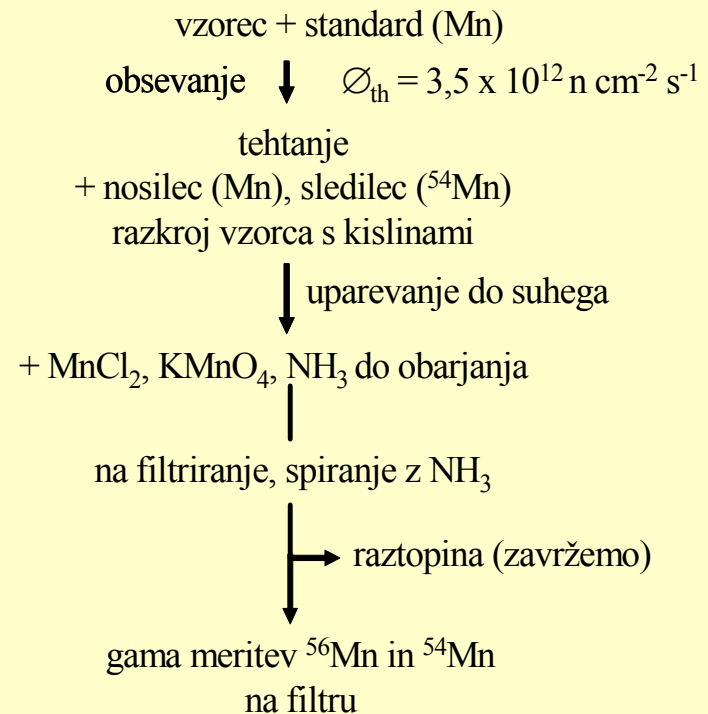
Razvoj postopka za določanje Mn

$^{55}\text{Mn}(n,\gamma)$ $^{56}\text{Mn}(t_{1/2} = 2,58 \text{ h})$

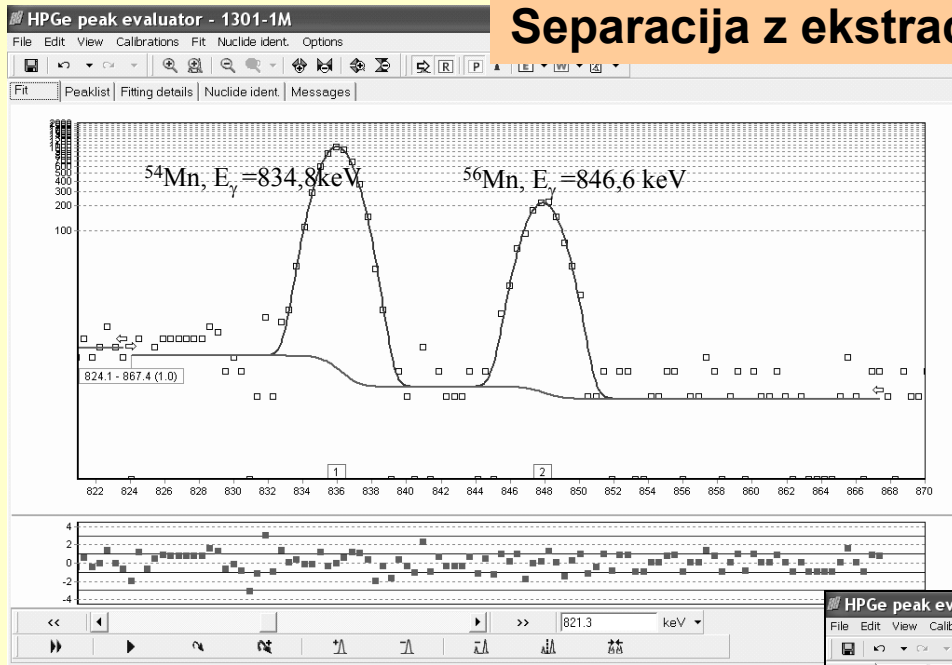
1.) Separacija z ekstrakcijo



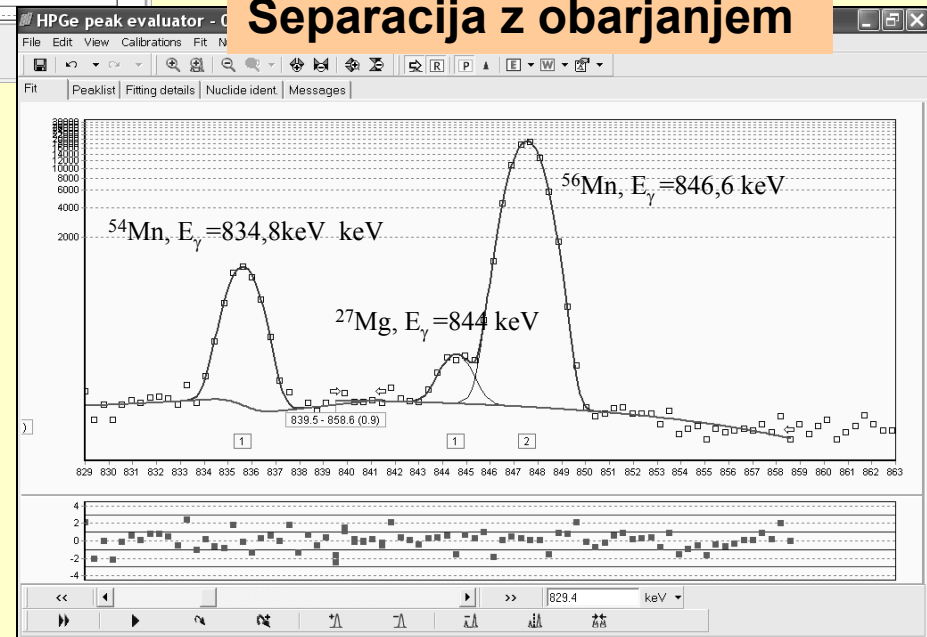
2.) Separacija z obarjanjem



Separacija z ekstrakcijo

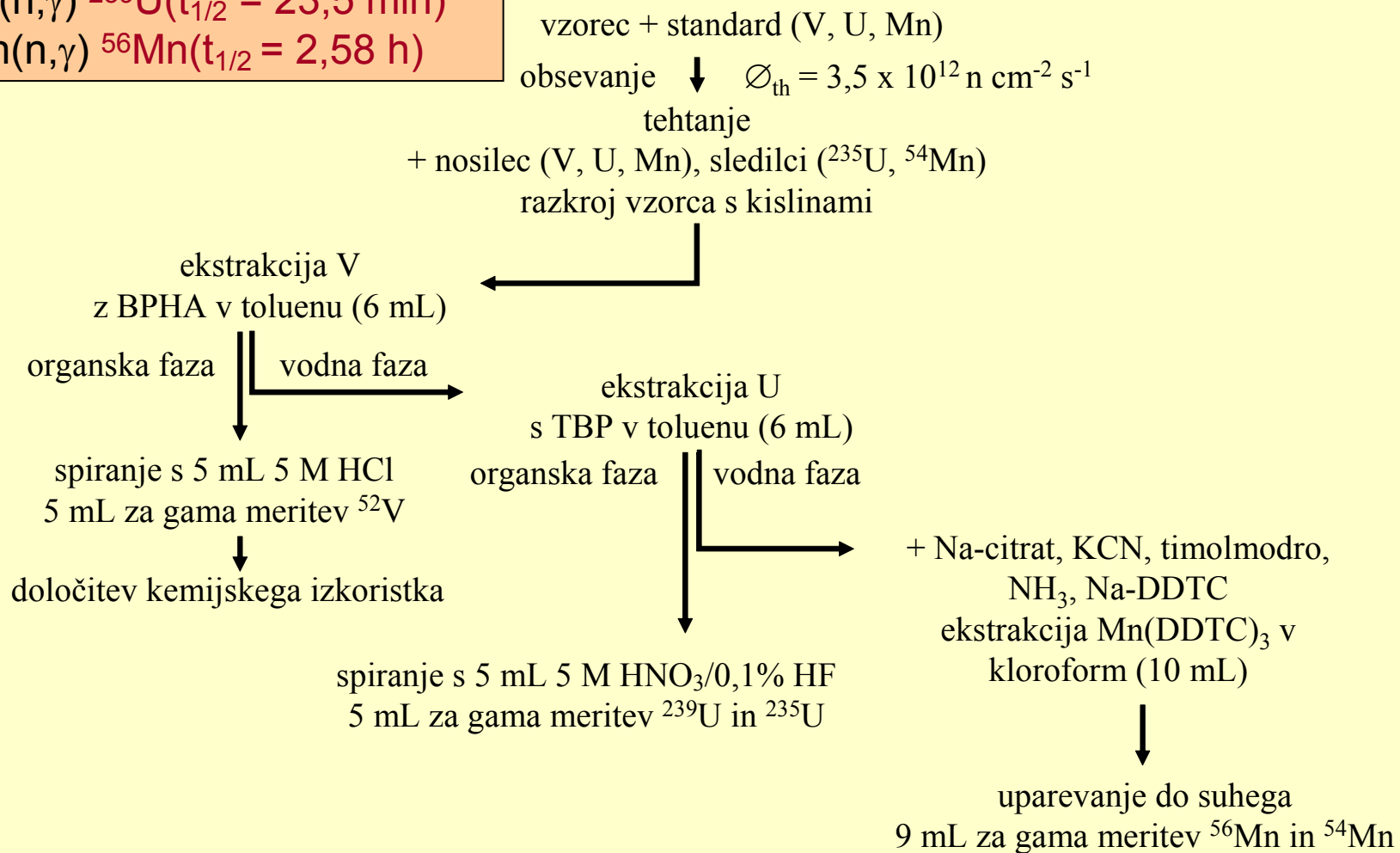


Separacija z obarjanjem



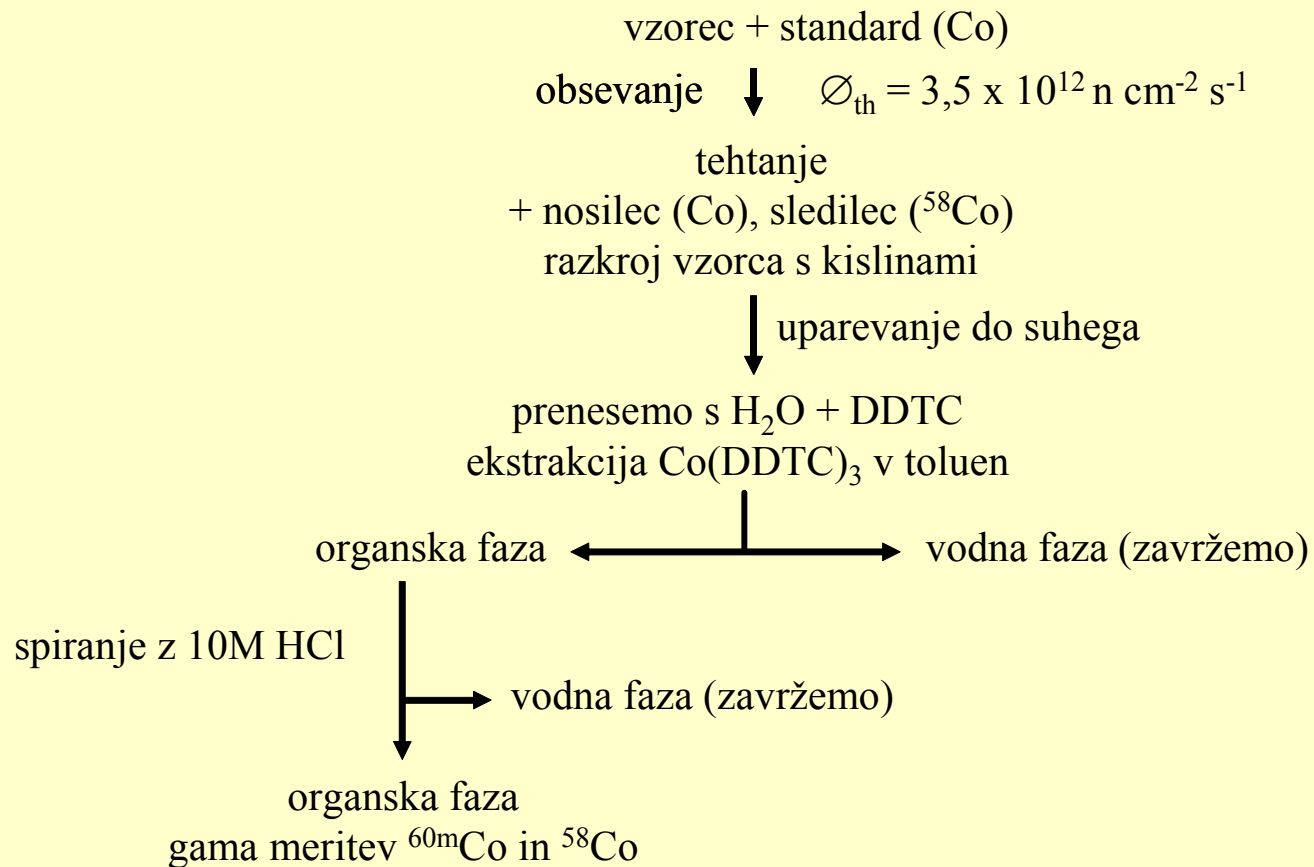
Razvoj postopka za zaporedno določanje V, U in Mn

$^{51}\text{V}(\text{n},\gamma)$ $^{52}\text{V}(t_{1/2} = 3,76 \text{ min})$
 $^{238}\text{U}(\text{n},\gamma)$ $^{239}\text{U}(t_{1/2} = 23,5 \text{ min})$
 $^{55}\text{Mn}(\text{n},\gamma)$ $^{56}\text{Mn}(t_{1/2} = 2,58 \text{ h})$

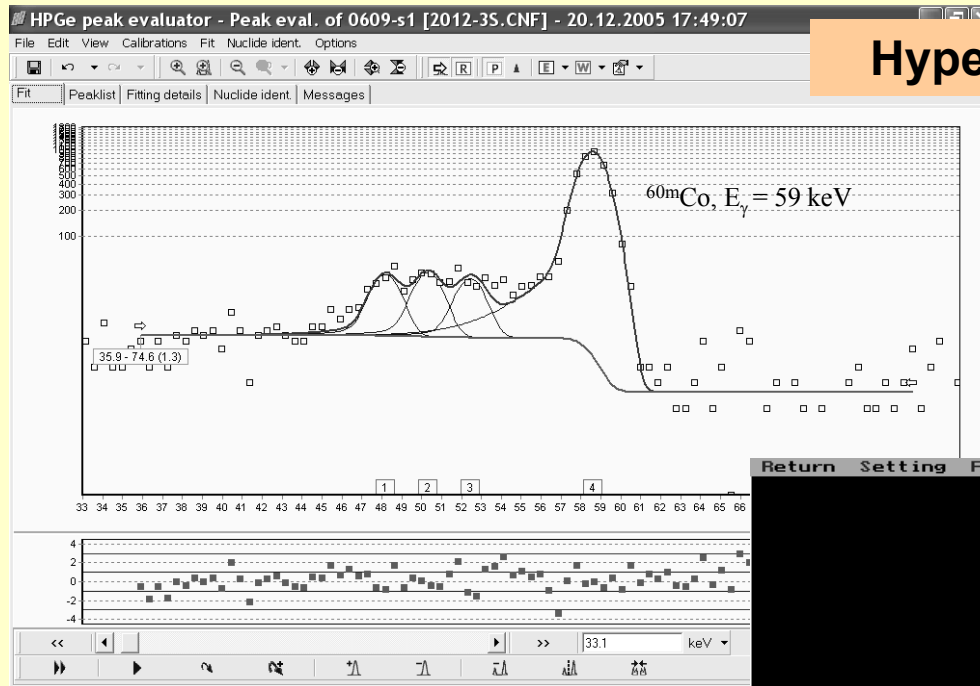


Razvoj postopka za določanje Co

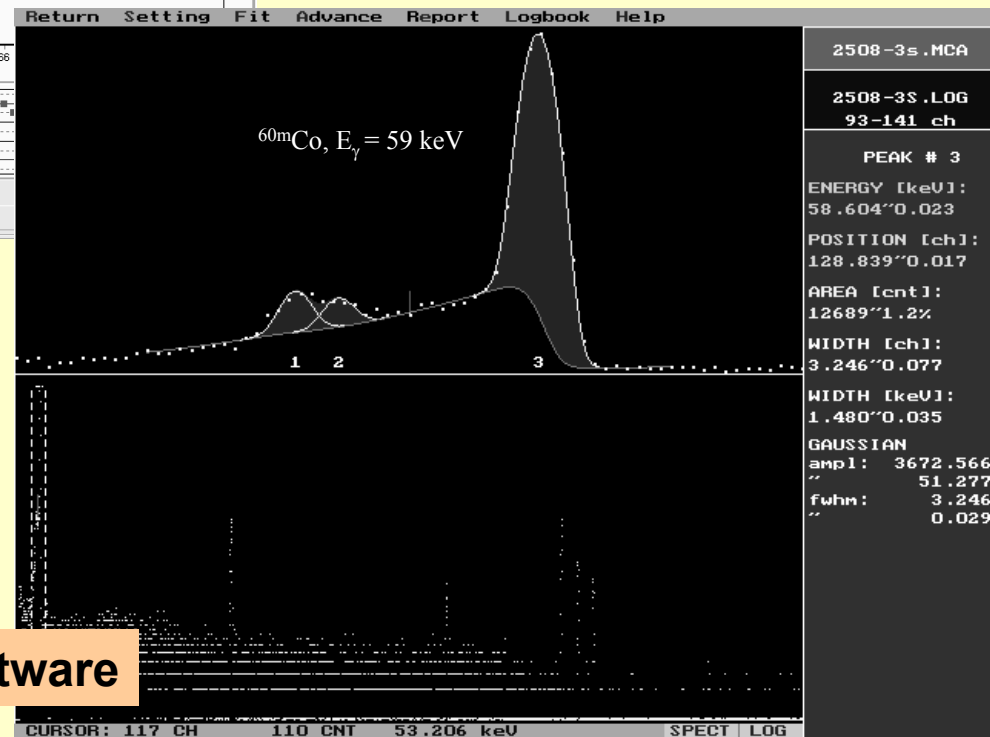
$^{59}\text{Co}(n,\gamma)^{60\text{m}}\text{Co}(t_{1/2} = 10,5 \text{ min})$



Težave pri ovrednotenju spektrov gama



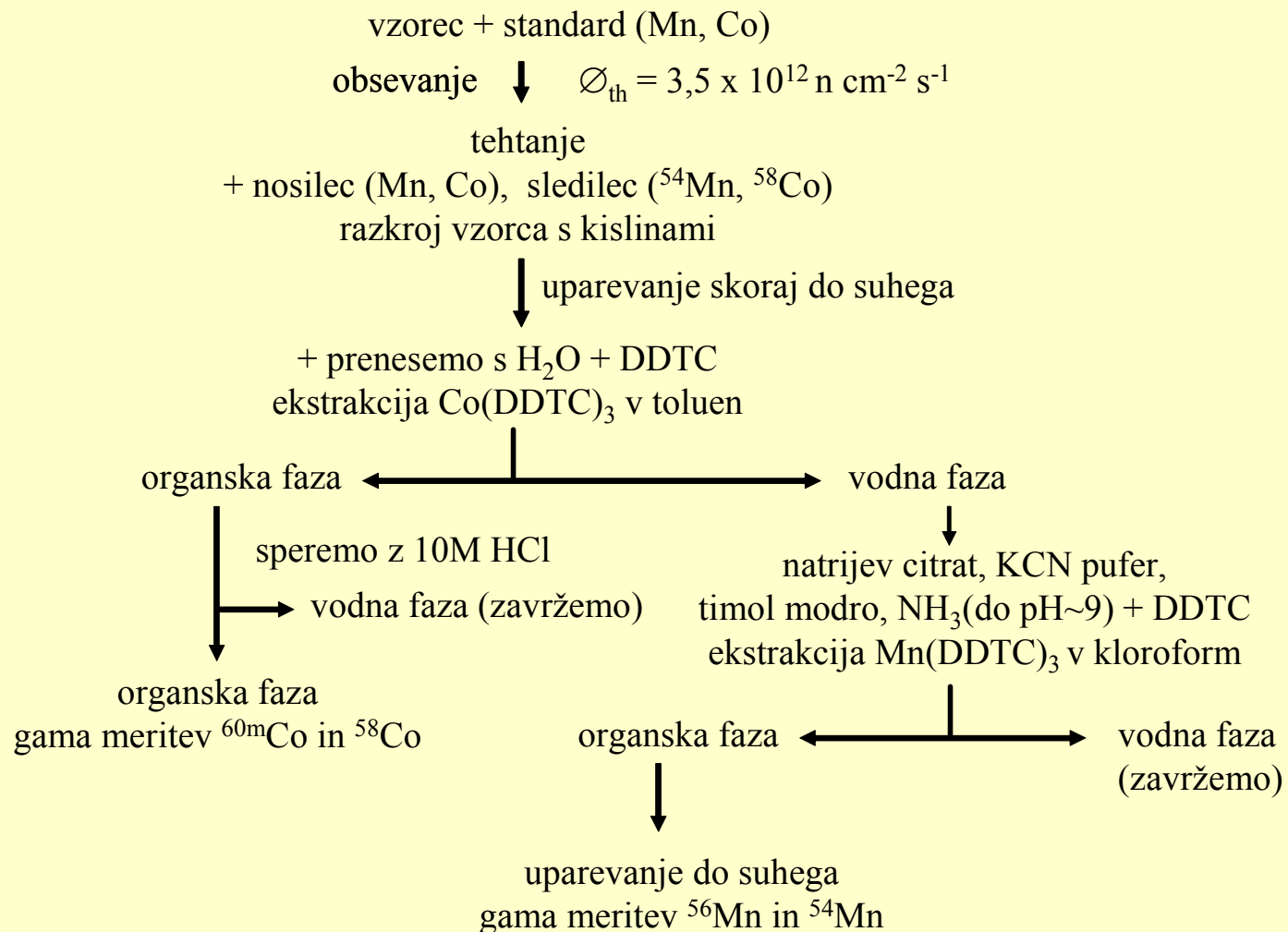
Hypermet-PC



HyperLabs Software

Razvoj postopka za zaporedno določanje Co in Mn

$^{59}\text{Co}(n,\gamma)$ $^{60\text{m}}\text{Co}(t_{1/2} = 10,5 \text{ min})$
 $^{55}\text{Mn}(n,\gamma)$ $^{56}\text{Mn}(t_{1/2} = 2,58 \text{ h})$



Validacija postopkov

- selektivnost/specifičnost, LOD in LOQ, točnost in natančnost

Tabela 2: Ocena točnosti in z-vrednosti za določitev vsebnosti Mn v izbranih referenčnih materialih

Vzorec	$R \pm u_R$			z - vrednost		
	RNAA, ekstrakcija	RNAA, obarjanje	INAA	RNAA, ekstrakcija	RNAA, obarjanje	INAA
NIST-SRM 1549 Non-fat Milk Powder	0,95 ± 0,24	0,96 ± 0,24	1,03 ± 0,42	-0,22	-0,16	0,07
IAEA H-4 Animal Muscle	0,98 ± 0,11	1,03 ± 0,25	1,03 ± 0,40	-0,20	0,12	0,08
NIST-RM 8433 Corn Bran	0,98 ± 0,19	0,98 ± 0,14	1,01 ± 0,14	-0,12	-0,12	0,05
NIST-SRM 1567a Wheat Flour	1,00 ± 0,12		1,00 ± 0,15	0,03		0,03
NIST-SRM 1568a Rice Flour	0,92 ± 0,09	1,04 ± 0,11	0,91 ± 0,09	-0,88	0,36	-1,04
NIST-RM 8435 Whole Milk Powder	1,00 ± 0,32	1,12 ± 0,31	1,13 ± 0,74	0,00	0,38	0,16
NIST-RM 8415, Whole Egg Powder	0,94 ± 0,21		1,04 ± 0,28	-0,28		0,15
NIST-SRM 1548a Typical Diet	1,04 ± 0,10		1,01 ± 0,25	0,43		0,02

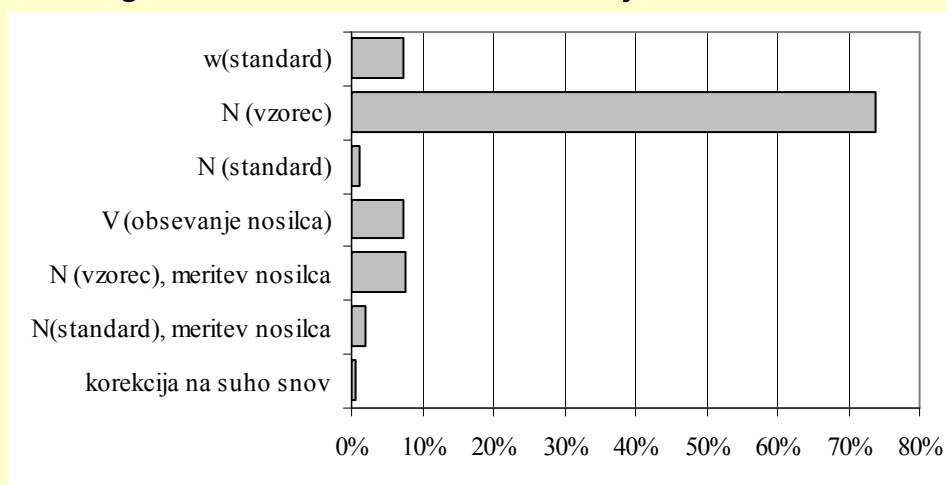
kjer je $R = \left(\frac{w}{w_{\text{ref}}} \right)$ in $z = \frac{(w - w_{\text{ref}})}{\sqrt{(u_c)^2 + (u_{\text{ref}})^2}}$

Ocena merilne negotovosti

Tabela 3: Ocena negotovosti za določanje Mn z RNAA

Parameter	Enota	Vrednost (x)	u(x)	u(x)/x	(u/x) ²	Prispevek
N(vzorec)		18020	144	1%	4,978E-02	5%
N(standard)		15037	135	1%	6,189E-02	6%
w(standard)	mg kg ⁻¹	10,86	0,22	2%	3,111E-01	31%
N(⁵⁴ Mn), vzorec		2395	57	2%	4,273E-01	43%
N(⁵⁴ Mn), standard sledilca		6104	78	1%	1,274E-01	13%
korekcija na suho snov		97%	1%	1%	2,03E-02	2%
Vsebnost, w(Mn)	mg kg⁻¹	0,198	0,007	4%	(k=1)	100%

Pripevki k negotovosti določitve koncentracije V z RNAA, z reaktivacijo nosilca



INAA -Izredno kratkoživi inducirani nuklidi ($t_{1/2} \sim$ nekaj sekund)

$^{76}\text{Se}(n,\gamma) ^{77\text{m}}\text{Se}(t_{1/2} = 17.5 \text{ s})$

$\sigma = 21 \pm 1 \text{ b}$, $\Theta = 9\%$,

$E_\gamma = 161.9 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 59.5\%$)

$^{19}\text{F}(n,\gamma) ^{20}\text{F}(t_{1/2} = 11 \text{ s})$

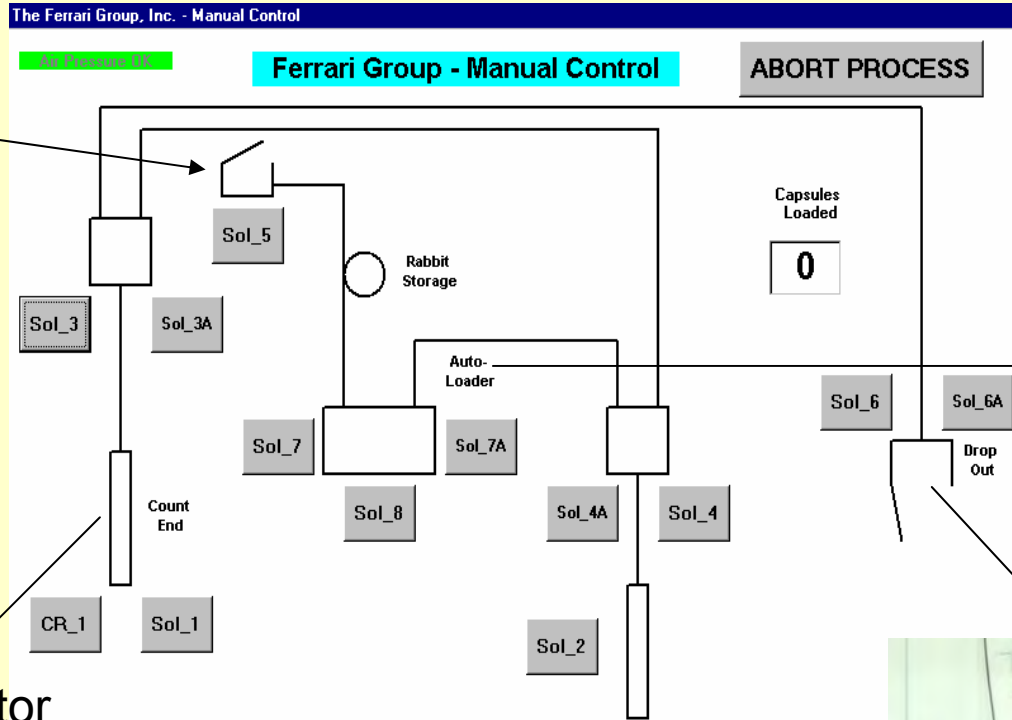
$\sigma = 0.0095 \pm 0.0007 \text{ b}$, $\Theta = 100\%$,

$E_\gamma = 1633.1 \text{ keV}$ ($I_\gamma = 100\%$)

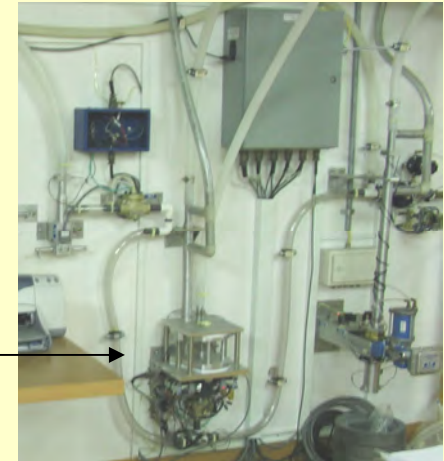


INAA s sistemom FPTS (Fast Pneumatic Transfer System)

vnos vzorca



prenos vzorca v
cev za obsevanje



shranjevanje
obsevanih vzorcev

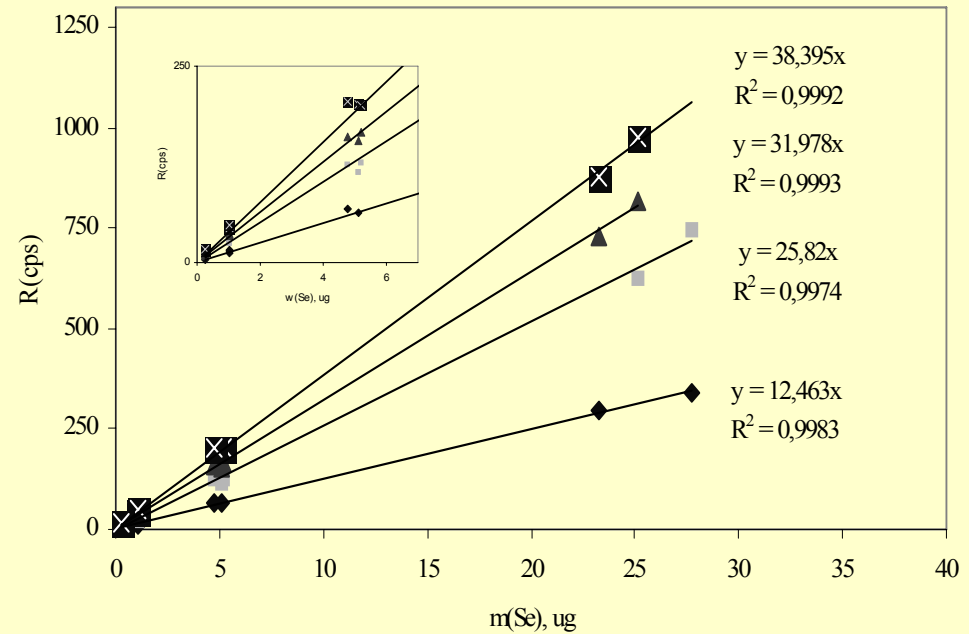
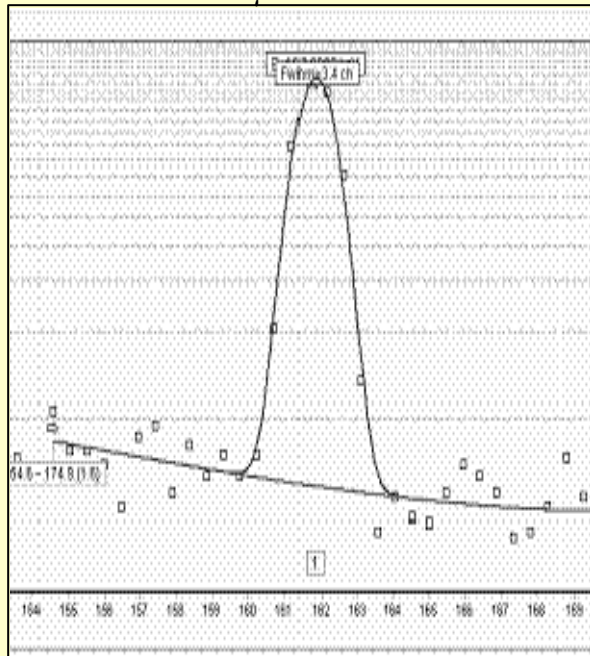


gamma detektor



Občutljivost FPTS za določanje Se

^{77m}Se , $E_\gamma = 161,9 \text{ keV}$



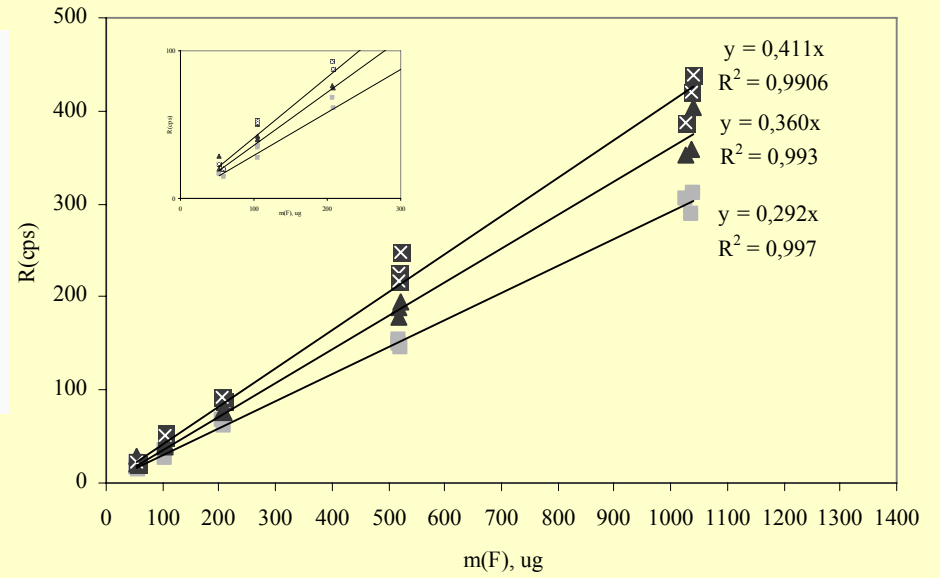
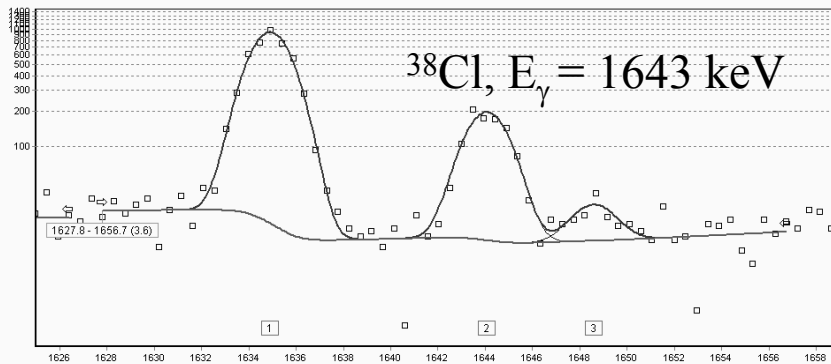
Teoretična LOD in LOQ (0,25 g zatehta vzorca):

◆ $t_{\text{obs}} = 5 \text{ s}$ ■ $t_{\text{obs}} = 10 \text{ s}$ ▲ $t_{\text{obs}} = 15 \text{ s}$ ☒ $t_{\text{obs}} = 20 \text{ s}$

$t_{\text{obs}} \text{ (s)}$	$s_{y-x} \text{ (cps)}$	LOD (μg)	LOQ (μg)
5	5,3	1,3	4,2
10	5,5	0,6	2,2
15	8,6	0,8	2,7
20	9,5	0,7	2,5

Občutljivost FPTS za določanje F

^{20}F , $E_\gamma = 1633,1 \text{ keV}$



Teoretična LOD in LOQ (1 g zatehta vzorca):

t_{obs} (s)	s_{y-x} (cps)	LOD (μg)	LOQ (μg)
10	6,1	62,4	208,0
15	11,5	95,9	319,8
20	14,5	105,5	351,7

■ $t_{\text{obs}}=10 \text{ s}$ ▲ $t_{\text{obs}}=15 \text{ s}$ ☒ $t_{\text{obs}}=20 \text{ s}$

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

2. Analizne metode

2.2. Razvoj metode za določanje ^{129}I v vzorcih iz okolja

Andrej Osterc

Institutska mentorica: Vekoslava Stibilj

Fakultetna mentorica: Vekoslava Stibilj, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Komentor: Peter Raspor, Oddelek za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Delež ^{129}I ($t_{1/2} = 1,57 \times 10^7$ let, $E_{\beta \text{ max}} = 0,194$ MeV, $E_{\gamma \text{ max}} = 39,58$ keV) v okolju se v zadnjih desetletjih zaradi človeške dejavnosti konstantno povečuje, saj se je razmerje $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ v biosferi v zadnjih desetletjih povečalo z $10^{-15} - 10^{-14}$ na $10^{-10} - 10^{-9}$. Manjši delež so prispevale jedrske eksplozije in nesreče. Glavnina ^{129}I pa se v okolje sprošča predvsem iz tovarn, obratov za predelavo izrabljenega reaktorskega goriva. V Evropi sta taka obrata locirana v Veliki Britaniji (Sellafield) in Franciji (La Hague); v njuni bližini dosega delež $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ vrednost do 10^{-4} .

Današnje znanje o ^{129}I temelji na analitskih sposobnostih radiokemijske nevtronske aktivacijske analize (RNAA), saj se ta metoda uporablja za določanje ^{129}I v okoljskih vzorcih od leta 1962 in je dolgo veljala kot edina aplikativna metoda v okoljski analizi omenjenega izotopa. Meja detekcije dosegljiva z RNAA izražena kot razmerje $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ je 10^{-10} do 10^{-12} , kar je dovolj za določanje ^{129}I v današnjih okoljskih vzorcih. Za določanje ^{129}I v vzorcih iz obdobja, ko še ni bilo prispevka človeka k deležu ^{129}I v okolju pa je potrebna pospeševalna masna spektrometrija (AMS), saj je meja detekcije le-te $10^{-13} - 10^{-15}$. Zaradi izjemno dolge razpolovne dobe, razširjenosti in kratkega časa zadrževanja v atmosferi (2–3 tedne) je ^{129}I idealen okoljski sledilec pri študiju kroženja joda v okolju. Na njegovo kroženje v okolju vplivajo fizikalni, kemijski in biološki procesi.

Razvili smo RNAA metodo za določanje ^{129}I . Koncentracije ^{129}I v okoljskih vzorcih so zelo nizke, zato je potrebno ^{129}I separirati iz večjih količin vzorca (do 100 g zemlje oz. sedimenta). Optimizirali smo razgradnjo vzorca v alkalni talini, pri čemer je bilo ključno določiti razmerje vzorec : KOH ter pogoje segrevanja. Nevtralizaciji vzorca je sledila ekstrakcija in redukcija joda v vodno fazo. Jod smo oksidirali, izpihali v toku dušika ter absorbirali na oglju. Ugotoviti je bilo potrebno primerni pretok dušika, trajanje izpihovanja in optimalno količino oglja, da bo vezava joda zadovoljiva ter da bo hkrati aktivnosti oglja po obsevanju čim nižja (ALARA princip). Odločilno je bilo izbrati oglje, ki bo s svojo sestavo čim manj prispevalo k aktivnosti po obsevanju, da bo možno čim prej opraviti analizo inducirane radionuklida ^{130}I , ki nastane po jedrski reakciji $^{129}\text{I}(n,\gamma)^{130}\text{I}$ ($t_{1/2} = 12,36$ h, $E_{\gamma} = 536$ keV). Zaradi prisotnosti ^{235}U , katerega so vsebovala vsa analizirana oglja različnih proizvajalcev, smo preverili morebitne interferenčne jedrske reakcije, ter določili slepo vrednost za izbrano oglje. Celotni postopek separacije smo spremljali s ^{131}I , katerega smo želeli uporabiti tudi za določitev kemijskega izkoristka metode, saj ga navajajo nekateri avtorji. Ugotovili smo, da je zaradi interferenčne jedrske reakcije $^{131}\text{I}(n,2n)^{130}\text{I}$ neprimeren, zato smo kemijski izkoristek določili spektrofotometrično, z reaktivacijo ter preko aktivnosti ^{126}I .

Metodo smo ovrednotili z obstoječim standardom za ^{129}I (IAEA-375 Soil) in dobili dobro ujemanje s certificirano vrednostjo. Uporabili smo jo pri določanju ^{129}I v vzorcih

morskih sedimentov in alg, kjer smo za morske sedimente ugotovili vsebnost ^{129}I reda velikosti od 5×10^{-8} do $1 \times 10^{-7} \mu\text{g g}^{-1}$ ter za alge $4 \times 10^{-7} \mu\text{g g}^{-1}$.

1st MR O-2, April 19, 2006

2. Analytical methods

2.2. Development of a method for ^{129}I determination and its application to environmental samples

Andrej Osterc

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Vekoslava Stibilj

Supervisor at the university: Vekoslava Stibilj, Department of Agronomy, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Co-Supervisor at the university: Peter Raspor, Department of Food Science, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana

Concentrations of ^{129}I ($t_{1/2} = 1.57 \times 10^7$ years, $E_{\beta, \max} = 0.194$ MeV, $E_{\gamma} = 39.58$ keV) in the environment increased during recent decades due to anthropogenic nuclear activities (nuclear weapons tests, nuclear accidents) - the ratio of $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ in the biosphere has increased from $(1-10) \times 10^{-15}$ to $(1-10) \times 10^{-10}$, mainly due to emissions from nuclear fuel reprocessing plants. In Europe they are located at La Hague (France) and Sellafield (England), where the ratio of $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ is up to 10^{-4} .

Present knowledge about ^{129}I is based on the analytical capabilities of RNAA, because since 1962, when RNAA was used the first time for ^{129}I analysis in biological materials, this method remained the only method applicable to environmental ^{129}I investigation. The detection limit of RNAA expressed as the ratio of $^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ is $10^{-10} - 10^{-12}$, which is sensitive enough to determine ^{129}I in present day environmental samples.

In this work we have developed an RNAA method for ^{129}I determination. The main issue is the pre-concentration of ^{129}I from large amounts of sample (up to 100 g of soil, sediment or plant material). We optimised disintegration of the samples by alkaline fusion, where the ratio of sample: KOH and heating conditions were crucial. The sample was then neutralised, followed by extraction and then reduction and stripping of iodine into the aqueous phase. Iodine was oxidised, purged from the system with nitrogen and adsorbed onto activated charcoal. We optimised the flow rate of nitrogen, the duration of the process, the amount of charcoal needed to trap iodine and improved the purity of the charcoal. Selection of appropriate charcoal is important, because its chemical composition influences the activity levels (dose rate) of the irradiated charcoal and prolongs the cooling time required before the radioisotope ^{130}I , induced by the nuclear reaction $^{129}\text{I}(n, \gamma)^{130}\text{I}$ ($t_{1/2} = 12.36$ h, $E_{\gamma} = 536$ keV), can be determined. Because traces of ^{235}U were present in all analysed charcoals from different producers, possible interfering nuclear reactions were examined and a blank value of the charcoal was determined. The optimal conditions for the pre-concentration of iodine from the sample were determined using ^{131}I tracer, making use of the fact that the chemical properties of different isotopes of an element are the same. We wanted to use this tracer for the chemical yield determination, which can be found in the literature, but an interfering nuclear reaction $^{131}\text{I}(n, 2n)^{130}\text{I}$ was observed and this was not possible. The chemical yield was determined spectrophotometrically, via nuclear reaction $^{127}\text{I}(n, 2n)^{126}\text{I}$ and by reactivation $^{127}\text{I}(n, \gamma)^{128}\text{I}$.

The method was developed, optimised and validated using the reference material Radionuclides and trace elements in soil (IAEA-375) and a good agreement between the obtained and reference value was found. The method developed was used to investigate the content of ^{129}I in marine sediments and marine algae (*Fucus virsoides*) collected from the Adriatic Sea. The results found for the sediments investigated were in the range from 5×10^{-8} to 1×10^{-7} $\mu\text{g g}^{-1}$ and for algae in the order of 4×10^{-7} $\mu\text{g g}^{-1}$.

Razvoj metode za določanje ^{129}I v vzorcih iz okolja

Andrej Osterc

Fakultetna in inštitutska mentorica: Doc.dr. Vekoslava Stibilj

Komentor: Prof.dr. Peter Raspor

Dan MR 19. april 2006

Uvod

- Jod je element VII skupine periodnega sistema (halogeni elementi); $Z = 53$, $M_r = 126.9045$ g/mol.
- V naravi se pojavlja v **organski obliki** kot alkil jodid - CH_3I , CH_2I_2 , CH_2BrI , CH_2ClI , v **anorganski obliki** - jodid (I^-) in jodat (IO_3^-) in v **elementarni obliki** - I_2 . Prisoten je v valenčnih stanjih od -1 do +7.
- Jod je esencialen element za ljudi in živali – potreben pri sintezi ščitničnih hormonov.
- Edini stabilni naravni izotop joda je ^{127}I .
- Več kot dvajset izotopov joda je umetnega izvora in vsi so radioaktivni.

- ^{129}I je dolgo-živeči ($t_{1/2} = 1.57 \cdot 10^7$ let) radioizotop, ki je predvsem umetnega izvora, nastaja pa tudi v naravi pri interakciji kozmičnih žarkov s ksenonom in pri spontani fiziji urana.
- Delež ^{129}I v okolju se v zadnjih desetletjih zaradi človeške dejavnosti konstantno povečuje (jedrske eksplozije in nesreče, predelava izrabljenega reaktorskega goriva).
- Ocenili so, da naravni rezervoar Zemlje vsebuje približno 50.000 kg ^{129}I . Večina tega je vezanega v litosferi in samo 263 kg ^{129}I je razpoložljivega v atmosferi.
- Zaradi razširjenosti v naravi, dolgega razpolovnega časa in kratkega zadrževanja v atmosferi (2-3 tedne) je ^{129}I dober okoljski sledilec.
- Na kroženje joda v okolju vplivajo **fizikalni** (preperevanje kamenin), **kemijski** (fotokemične reakcije) in **biološki** (alge, fitoplankton, mikroorganizmi, rastline – hlapne organske jodove spojine) **procesi**.

Delovne hipoteze in cilji

- I. Razvili in optimizirali bomo metodo za določitev ^{129}I v okoljskih vzorcih ter jo ovrednotili z obstoječim standardnim referenčnim materialom IAEA-375 Soil.
- II. Ugotavljali bomo porazdelitev ^{129}I v okolju.
- III. Ugotavljali bomo udeležbo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* pri kroženju joda v okolju:
 - Predvidevamo, da so kvasovke predvsem akumulatorji joda in vplivajo na fiksacijo-akumulacijo joda v zemlji.
 - Menimo, da ne obstajajo razlike v kinetiki akumulacije ^{129}I in ^{127}I .
 - Skušali bomo dokazati, da nizke koncentracije ^{127}I v gojišču pozitivno vplivajo na rast kvasovke *S. cerevisiae* in da visoke delujejo citostatično in/ali citotoksično.
 - Proučevali bomo radiotoksičen vpliv ^{131}I in ^{129}I na kvasovko *S. cerevisiae* in skušali bomo ugotoviti, če se vpliv izraža citostatično in/ali citotoksično.

Eksperimentalni del

- I. Iskanje optimalnih pogojev za razkroj v alkalni talini, adsorpcijo joda na aktivno oglje, sežig po Schöniger-ju, obsevanje, radiokemijsko separacijo in merjenje γ -aktivnosti inducirane radionuklida.
- II. Določitev ^{129}I v vzorcih zemlje, rastlin, morskih sedimentov in alg.
- III. Privzem ^{129}I pri kvasovki *S. cerevisiae*.

Rezultati in diskusija

I. Pri razvoju in optimizaciji RNAA metode za določanje ^{129}I smo bili osredotočeni na naslednje stopnje:

1. Separacija oz. izolacija joda:

- sežig po Schönigerju
- razkroj v alkalni talini

2. Iskanje ustreznega aktivnega oglja

3. Obsevanje vzorca in standarda:

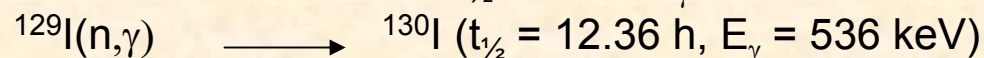
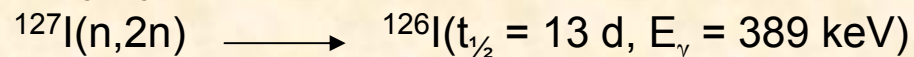
- priprava standarda ^{129}I / ^{127}I standarda (LEA Cerca)
- izbira ustreznih pogojev obsevanja (trajanje in fluenca nevtronov)

4. Radiokemijska separacija joda:

- odstranitev izotopov (^{82}Br), ki motijo merjenje induciranih radionuklidov
- priprava vzorca in standarda za merjenje na HP-Ge detektorju

5. Meritev aktivnosti induciranih radionuklidov:

- merjenje intenzivnosti γ -žarkov na HP-Ge detektorju



6. Določitev kemijskega izkoristka

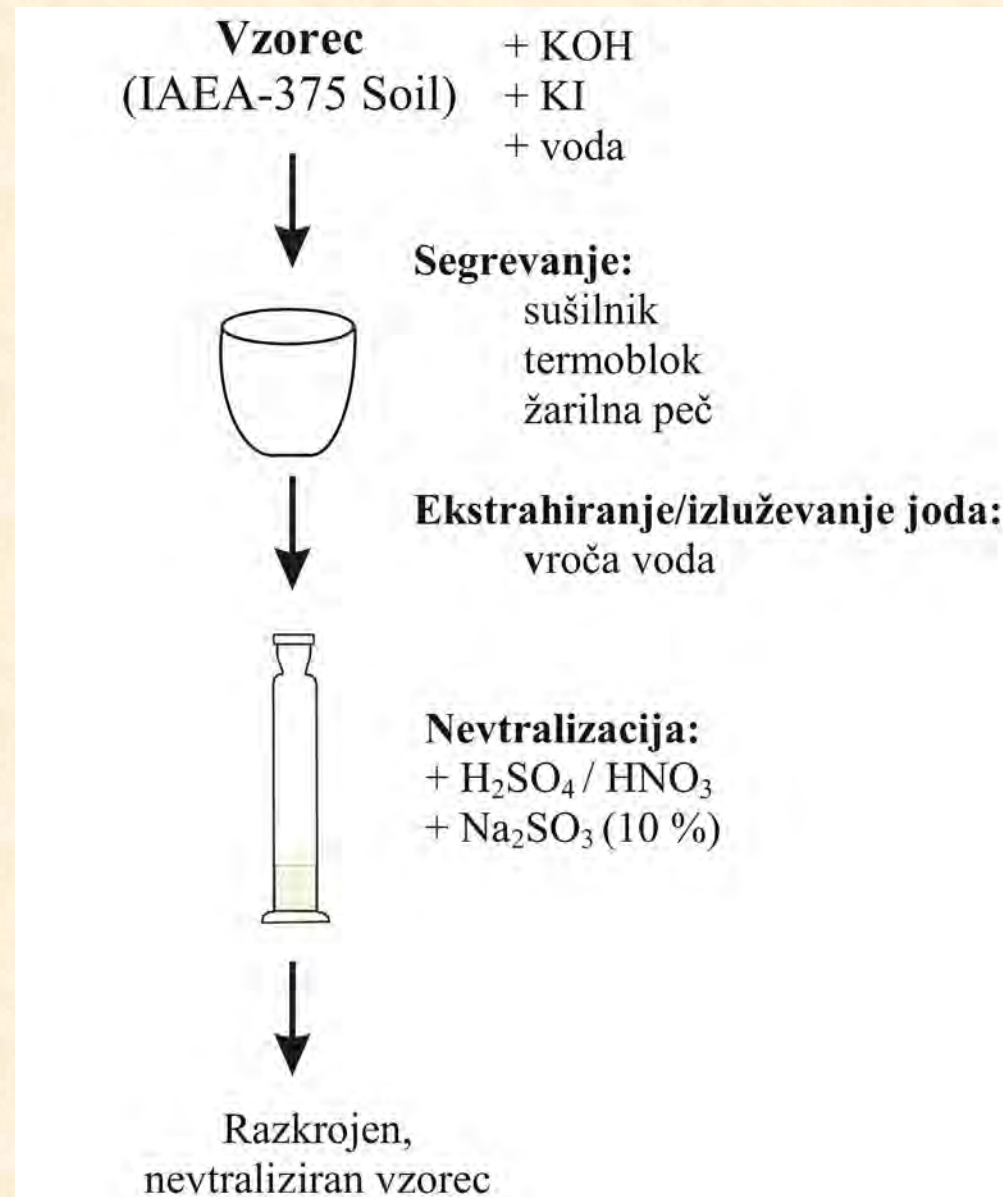
7. Ovrednotenje metode

Ad 1. Separacija oz. izolacija joda

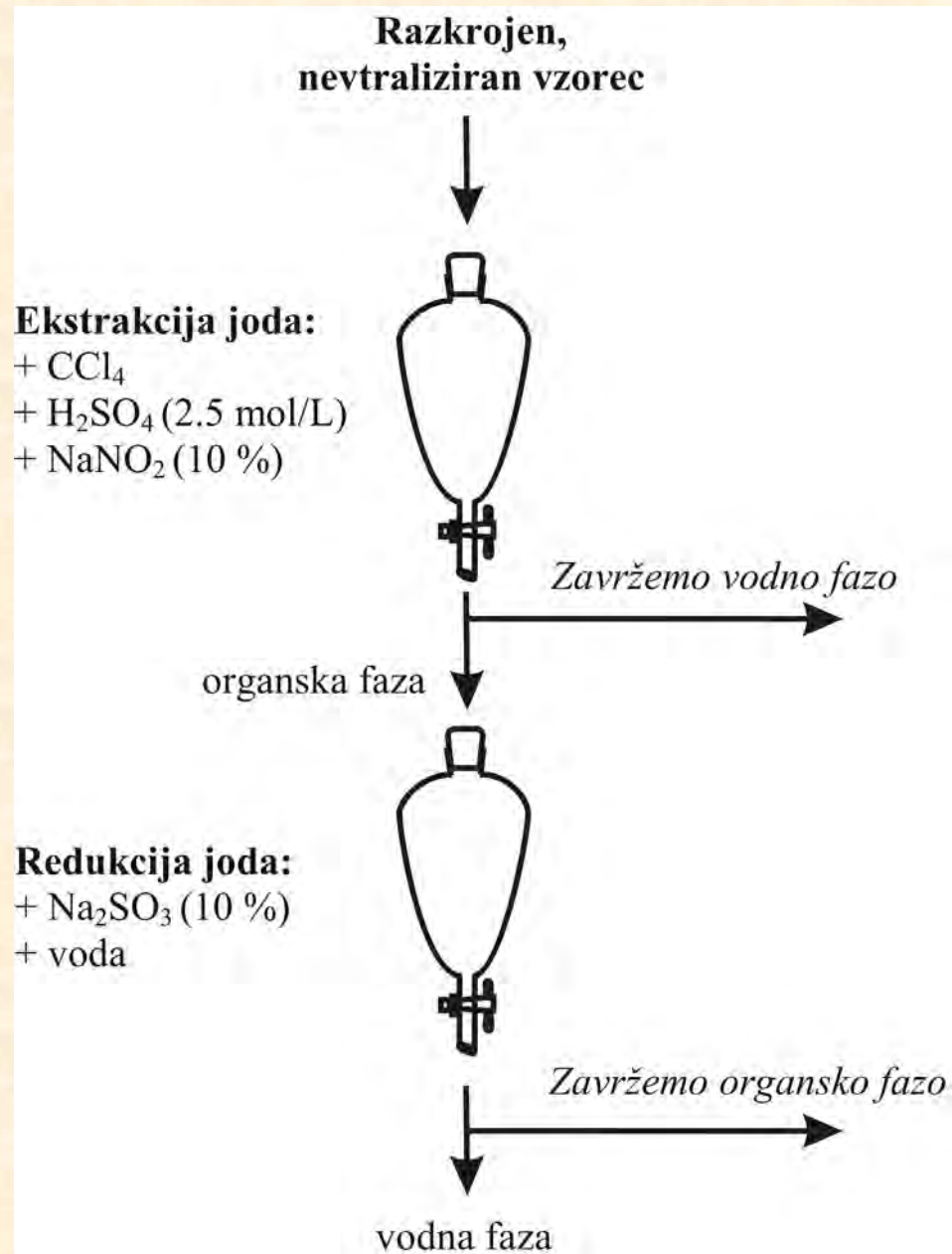
Poskusi s sledilcem

- Optimalne pogoje za separacijo joda smo raziskovali z uporabo sledilca ^{131}I , saj so kemijske lastnosti različnih izotopov istega elementa enake.
 - Pri sežigu po Schönigerju, kateremu je sledilo izpihovanje joda v toku dušika ter adsorpcija na aktivno oglje, kemijski izkoristki nikoli niso presegli 40 %.
 - Zaradi tega smo optimizirali razkroj v alkalni talini.

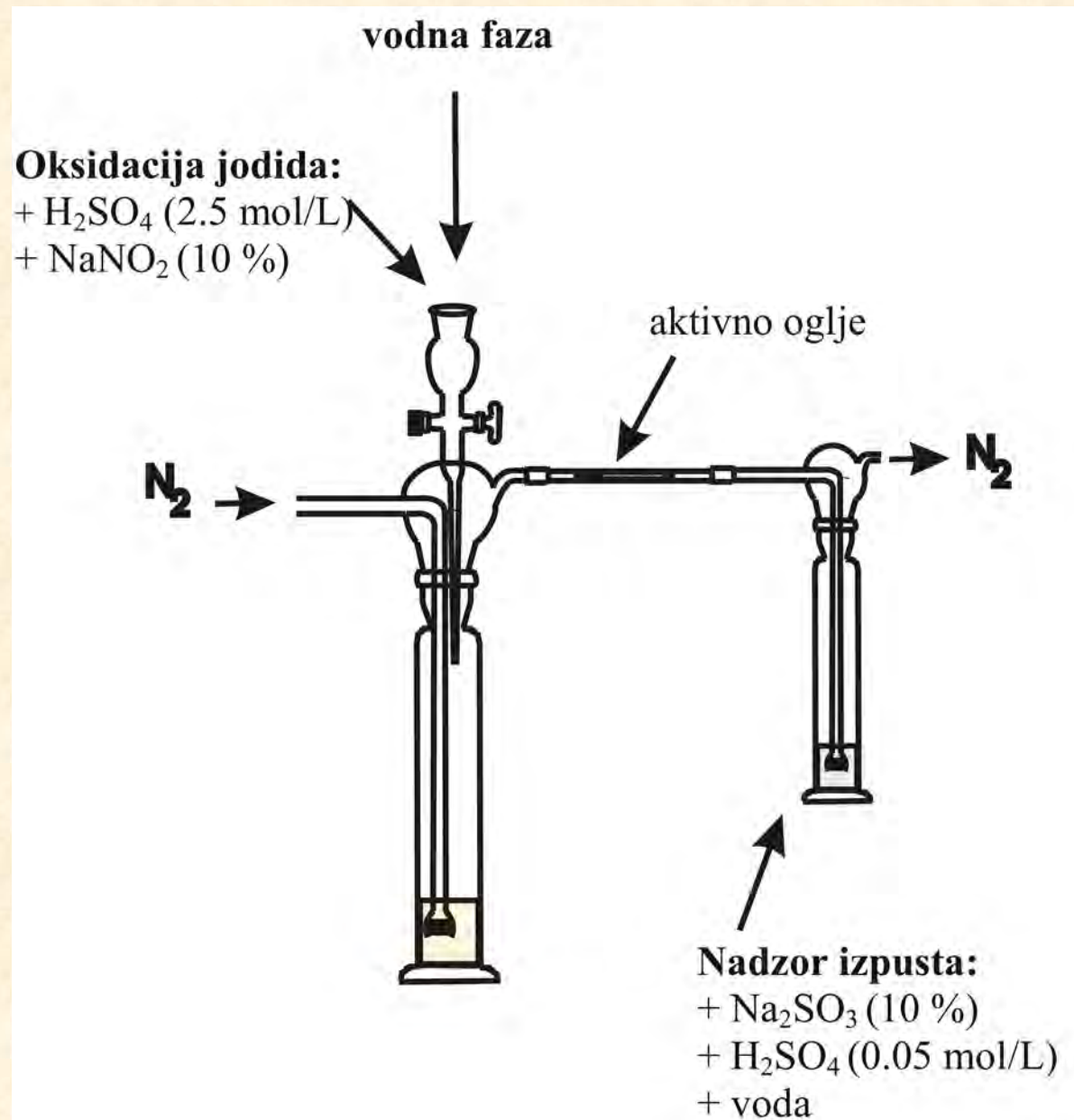
1.1 Razkroj v alkalni talini



1.2 Ekstrakcija joda



1.3 Adsorpcija joda



Optimalni pogoji separacije joda

Parametri	Območje	η_1 (%)	Optimalni pogoji	η_2 (%)
razmerje vzorec:KOH	1:2	40 ± 7	1:3	87 ± 5
	1:3	87 ± 5		
	1:4	88 ± 5		
pogoji razkroja	sušilnik:		sušilnik:	
	25°C, 24h		70-80 °C, 24 h	
	70-80 °C, 24 h			
	70-80 °C, 48h			
	termoblok:		termoblok:	
	350 °C, 24-60 h		350 °C, 48 h	
žarilna peč:			žarilna peč:	
	560°C, 4 h	72 ± 4	600 °C, 4 h	87 ± 5
	600 °C, 4 h	87 ± 5		
pretok dušika (mL/min)	8	70 ± 5	12	97 ± 2
	10	85 ± 4		
	12	97 ± 2		
	15	89 ± 6		
vpliv količine aktivnega oglja na kemijski izkoristek	količina (mg):		količina (mg):	
	100	70 ± 5	250	97 ± 2
	150	81 ± 4		
	200	89 ± 2		
	250	97 ± 2		
	300	97 ± 2		
trajanje izpihovanja (min)	45	80 ± 5	60	97 ± 2
	60	97 ± 2		
	75	93 ± 5		

**Razkroj v
alkalni talini**

Adsorpcija joda

Ad 2. Iskanje ustreznega aktivnega oglja

- Ker smo aktivno oglje uporabljali za adsorpcijo joda le-to s svojo sestavo vpliva na **akumulirano dozo po obsevanju** zaradi tvorbe ^{24}Na ($t_{1/2} = 15,03\text{h}$), ^{42}K ($t_{1/2} = 12,36\text{h}$) in ^{82}Br ($t_{1/2} = 1,47\text{d}$) iz sledov natrija, kalija in broma, ki so prisotnih v aktivnem oglju;
- Možne pa so tudi **interferenčne jedrske reakcije**, če bi bili v aktivnem oglju prisotni U, Cs ali Te.
- Potrebno poiskati aktivno oglje, ki vsebuje elemente v sledovih, predvsem Br, Na, K, Cs, Te in U.

2.1 S pomočjo k_0 -INAA smo določili kemijsko sestavo naslednjih ogelj:

- MERCK 2514, oglje namenjeno za živilsko industrijo
- MERCK 9624, oglje namenjeno za plinsko kromatografijo
- SIGMA Darco, oglje čiščeno s kislinami in namenjeno splošni uporabi
- BDH, oglje namenjeno za plinsko absorpcijo

Vsa analizirana aktivna oglja so med drugimi elementi vsebovala Na, K, Br, Cs, Te in U v primerljivih koncentracijah. Zaradi ugodne granulacije smo se odločili za oglje **MERCK 9624**.

2.2 Čiščenje oglja MERCK 9624

Postopek	Koncentracija elementa ($\mu\text{g/g}$)					
	Br	K	Na	Te	U	
Brez čiščenja	< 0.10	1110 \pm 47	486 \pm 17	< 0.10	1.50 \pm 0.05	
HCl	1 M	1.68 \pm 0.06	1302 \pm 94	428 \pm 15	0.21 \pm 0.05	0.69 \pm 0.02
	2 M	2.13 \pm 0.08	1273 \pm 162	433 \pm 16	0.18 \pm 0.04	0.66 \pm 0.03
	3 M	2.43 \pm 0.09	1250 \pm 166	413 \pm 15	< 0.10	0.72 \pm 0.03
	4 M	2.89 \pm 0.10	1240 \pm 233	422 \pm 15	0.17 \pm 0.05	0.83 \pm 0.03
	5 M	3.05 \pm 0.11	1326 \pm 248	425 \pm 16	< 0.10	0.97 \pm 0.04
	6 M	3.74 \pm 0.14	1513 \pm 269	423 \pm 16	< 0.10	1.10 \pm 0.05
	9 M	16.2 \pm 0.6	1126 \pm 78	412 \pm 15	< 0.10	0.69 \pm 0.03
HNO ₃	1 M	< 0.10	*	383 \pm 14	< 0.10	0.90 \pm 0.03
	3 M	< 0.10	*	374 \pm 13	< 0.10	0.86 \pm 0.03
	6 M	0.34 \pm 0.05	*	404 \pm 16	< 0.10	0.67 \pm 0.03
	8 M	0.30 \pm 0.05	*	423 \pm 21	< 0.10	0.69 \pm 0.02
	10 M	0.53 \pm 0.02	1117 \pm 79	392 \pm 14	< 0.10	0.60 \pm 0.02
	12 M	0.27 \pm 0.02	1105 \pm 84	390 \pm 14	< 0.10	0.61 \pm 0.02
	14 M	0.84 \pm 0.04	1075 \pm 88	391 \pm 14	< 0.10	0.63 \pm 0.02
CH ₃ COOH	1 M	0.60 \pm 0.03	1185 \pm 58	418 \pm 15	< 0.10	1.57 \pm 0.06
	2 M	1.35 \pm 0.05	1255 \pm 62	434 \pm 15	< 0.10	1.54 \pm 0.06
	4 M	0.72 \pm 0.03	1217 \pm 65	419 \pm 16	< 0.10	1.48 \pm 0.05
	6 M	0.60 \pm 0.03	1182 \pm 65	425 \pm 16	< 0.10	1.39 \pm 0.05
	8 M	0.25 \pm 0.03	1208 \pm 81	440 \pm 16	< 0.10	1.33 \pm 0.05
	10 M	0.35 \pm 0.03	1279 \pm 84	422 \pm 15	< 0.10	1.30 \pm 0.05
	12 M	0.31 \pm 0.03	1095 \pm 84	406 \pm 14	< 0.10	1.26 \pm 0.05
	14 M	0.55 \pm 0.03	1140 \pm 91	411 \pm 15	< 0.10	1.32 \pm 0.06
16 M	0.65 \pm 0.03	1235 \pm 64	435 \pm 16	< 0.10	1.37 \pm 0.05	
Aqua regia	3.74 \pm 0.13	1165 \pm 61	351 \pm 13	0.10 \pm 0.02	0.54 \pm 0.02	
Segrevanjev atm. N ₂ pri 900 °C	< 0.10	*	463 \pm 24	< 0.10	1.45 \pm 0.06	

* potrebno še narediti analize

2.3 Interferenčne in nezaželene jedrske reakcije zaradi elementov prisotnih v aktivnem oglju

1. $^{235}\text{U}(n, f)^{131}\text{I}$, 365 keV
2. $^{235}\text{U}(n, f)^{133}\text{I}$, 530 keV

Oglje	Količina (g)	Čas merjenja (s)	Površina (števki)		Specifična aktivnost		Razmerje
			^{131}I	^{133}I	^{131}I	^{133}I	$^{133}\text{I} / ^{131}\text{I}$
1	0.1692	2000	2289	29997	6.76	88.64	13.11
2	0.1754	2000	2366	32057	6.75	91.38	13.54
3	0.1867	2000	2492	33321	6.67	89.24	13.38

3. $^{235}\text{U}(n, f)^{129}\text{I}(n, \gamma)^{130}\text{I}$, 536 keV
4. $^{235}\text{U}(n, f)^{130}\text{I}$, 536 keV
5. $^{133}\text{Cs}(n, \alpha)^{130}\text{I}$
6. $^{128}\text{Te}(n, \gamma, \beta^-)^{129}\text{I}(n, \gamma)^{130}\text{I}$



Pod mejo detekcije

Ad 3. Obsevanje vzorca in standarda

3.1 Priprava standarda za obsevanje

- **Delovno standardno raztopino ^{129}I** ($A = 4,2 \text{ Bq}\cdot\text{g}^{-1}$) smo pripravili z razredčenjem originalne standardne raztopine ^{129}I (LEA Cerca, $A = 420 \text{ Bq}\cdot\text{g}^{-1}$) z 0,3 % LiOH ter dodali stabilni jod ^{127}I ($\sim 50 \text{ mg I}^{-}\cdot\text{g}^{-1}$) kot kalijev jodid .
- Približno 100-150 mg delovne standardne raztopine smo odtehtali v kvarčno ampulo ter raztopino izhlapeli pri $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (zaradi sušenja ni prišlo do izgub joda).

3.2 Priprava vzorca za obsevanje

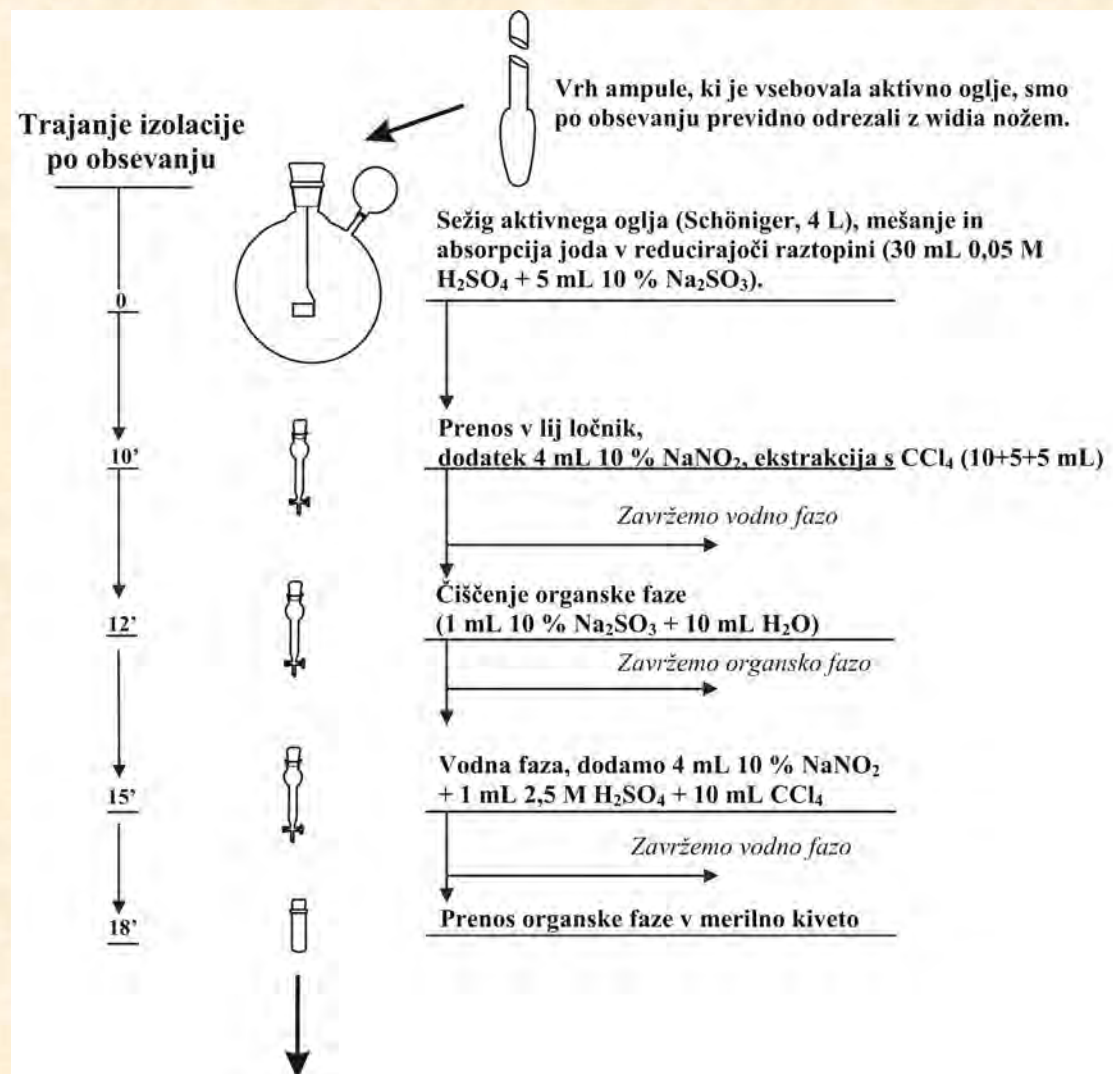
- Po adsorpciji joda smo aktivno oglje prenesli v kvarčno ampulo, jo zatalili ter obsevali istočasno s standardom v TRIGA Mark II reaktorju.

Primerni pogoji obsevanja

- Pri iskanju primernih pogojev obsevanja smo sledili ALARA principu.
- Za obsevanje sta bili primerni dve poziciji:
 - F ring
 - fluenca termičnih nevtronov: $1,0 \cdot 10^{13} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
 - fluenca hitrih nevtronov: $1,0 \cdot 10^{13} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
 - Centralni kanal (CC)
 - fluenca termičnih nevtronov: $3,5 \cdot 10^{12} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
 - fluenca hitrih nevtronov: $1,2 \cdot 10^{12} \text{ n}\cdot\text{cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$
- Fluena termičnih in hitrih nevtronov v F ringu je bila dovolj velika za uspešno indukcijo želenega radioizotopa. Prednost v primerjavi s centralnim kanalom je bila sledeča:
 - reakcija $^{127}\text{I}(n,2n)^{126}\text{I}$ je potekla v manjši meri
 - aktivnost vzorca (hitrost doze) po obsevanju je bila bistveno zmanjšana in hlajenje vzorca skrajšano s 20-24 h (CC) na 10-12h

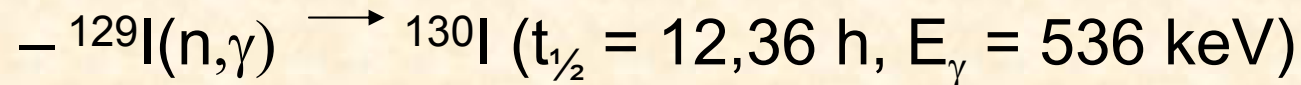
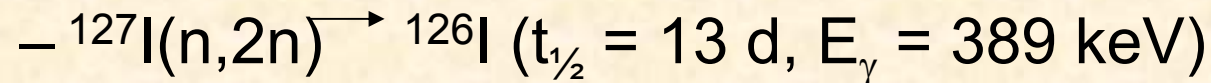
Ad 4. Radiokemijska separacija

- Vrha ampule s standardom smo po obsevanju previdno odrezali z widia nožem ter jod izlužili z raztopinama NaOH ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in Na_2SO_3 (10 %).
- Sledila je ekstrakcija joda v liju ločniku s kloroformom.
- Kemijski izkoristek ekstrakcije joda je bil med 85 in 90 %, določili smo ga spektrofotometrični za vsak standard posebej.



Ad 5. γ -Spektrometrija

- Merjenje intenzivnosti γ -žarkov induciranih radionuklidov:

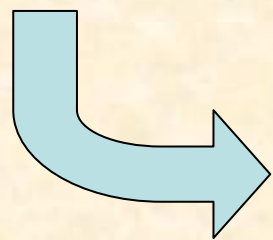


lahko opravimo na germanijevem detektorju (HP-Ge).

- Ugotovili smo, da je za merjenje intenzivnosti γ -žarkov primeren koaksialen detektor; detektor z utorom (Well) ni bil primeren za našo metodo zaradi Comptonskega efekta.

Ad 6. Določitev kemijskega izkoristka

- Kemijski izkoristek metode smo želeli določiti s sledilcem ^{131}I , saj ga navajajo nekateri avtorji.
- Ugotovili smo, da je zaradi interferenčne jedrske reakcije $^{131}\text{I}(n,2n)^{130}\text{I}$ neprimeren za našo metodo.



100 mg ^{131}I sledilca smo nakapali na 250 mg oglja in pri obsevanju centralnem kanalu (12 h) nastane ^{130}I , katerega površina bi ustrezala $3 \cdot 10^{-4} \mu\text{g } ^{129}\text{I g}^{-1}$

- Določevanje kemijskega izkoristka spektrofotometrično, preko jedrske reakcije $^{127}\text{I}(n, 2n)^{126}\text{I}$ ter z reaktivacijo $^{127}\text{I}(n,\gamma)^{128}\text{I}$.

Ad 7. Ovrednotenje metode z referenčnim materialom IAEA-375 Soil

7.1 Naše določitve

Datum določitve	^{129}I (10^{-7} $\mu\text{g/g}$)	^{129}I (10^{-3} Bq/kg)	^{127}I (n = 4) ($\mu\text{g/g}$)	$^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ (10^{-10})
06.12.2005	$2,98 \pm 0,83$	$1,98 \pm 0,59$	$1,73 \pm 0,07$	~1720
16.01.2006	$3,83 \pm ,95$	$2,55 \pm 0,80$		~2215
31.01.2006	$2,89 \pm 0,81$	$1,92 \pm 0,78$		~1670
04.04.2006	$2,76 \pm 0,80$	$1,84 \pm 0,54$		~1595
Povprečje	$3,12 \pm 0,95$	$2,07 \pm 0,80$		~1800
Certificirana vrednost	-	1,7 (1.3 – 2.1)*	-	-

*interval zaupanja (95 %)

7.2 Primerjava z literaturnimi podatki

Vir	^{129}I (10^{-7} $\mu\text{g/g}$)	^{129}I (10^{-3} Bq/kg)	^{127}I ($\mu\text{g/g}$)	$^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ (10^{-10})
Strachnov et al., 1996	$2,62 \pm 0,81$	$1,71 \pm 0,53$	$1,91 \pm 0,49$	~1310
IAEA-0375 Report	(1,3 – 4,1)*	(0,8 – 2,6)*	(1,36 – 2,31)*	
Schmidt et al., 1998	$2,50 \pm 0,70$	$1,6 \pm 0,5$	$1,68 \pm 0,09$	~1465

* območje sprejetih vrednosti

II. Ugotavljanje ^{129}I v okolju

- Določevanje ^{129}I v vzorcih sedimentov in alg iz Jadranskega morja (Vzorčenje sedimentov in alg na Slovenski obali že opravljeno – v maju vzorčenje alg na Italijanski obali. Analize za sedimente in alge že potekajo, zaključene bodo do julija).
- Določevanje ^{129}I v vzorcih zemlje in rastlin iz območij Krškega (NE Krško), Podgorice (reaktorski center), Žirovskega Vrha (rudnik urana) Jazbeca in Boršta (odlagališče jalovine) ter območij Prekmurja in Primorske (Vzorčenje v maju, zaključek analiz do oktobra).
- Določevanje ^{129}I v vzorcih zemlje iz Ukrajine (pridobivanje vzorcev že poteka).

Določitve koncentracije ^{129}I in ^{127}I v morskih algah in sedimentih

Morske alge (*Fucus virsoides*)

Lokacija	^{129}I (10^{-7} $\mu\text{g/g}$)	^{129}I (10^{-3} Bq/kg)	^{127}I (n = 4) ($\mu\text{g/g}$)	$^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ (10^{-12})
Emona	$4,16 \pm 1,08$	$2,77 \pm 0,69$	$410,62 \pm 27,06$	~ 1015
Soline Portorož	$4,71 \pm 1,32$	$3,13 \pm 0,91$	$420,11 \pm 30,67$	~ 1120
Ankaran	$4,00 \pm 1,04$	$2,65 \pm 0,69$	$448,00 \pm 34,05$	~ 895
Debeli rtič	$4,34 \pm 1,22$	$2,88 \pm 0,81$	$505,89 \pm 35,42$	~ 860
Žusterna	$3,62 \pm 0,96$	$2,41 \pm 0,63$	$371,33 \pm 25,91$	~ 975

Morski sedimenti

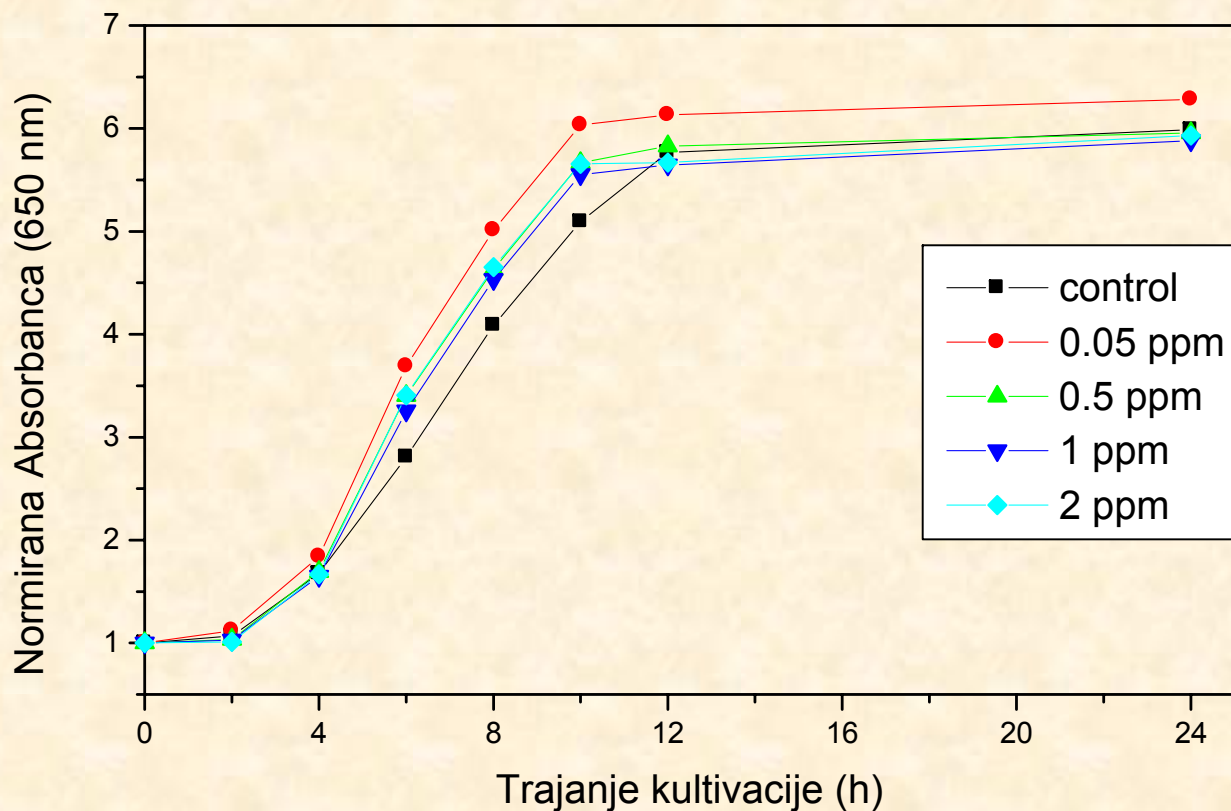
Lokacija	^{129}I (10^{-7} $\mu\text{g/g}$)	^{129}I (10^{-4} Bq/kg)	^{127}I (n = 4) ($\mu\text{g/g}$)	$^{129}\text{I}/^{127}\text{I}$ (10^{-12})
Trst	$1,31 \pm 0,34$	$8,70 \pm 2,26$	$46,40 \pm 3,16$	~ 2825
Delta reke Pad	$0,95 \pm 0,23$	$6,33 \pm 1,52$	$70,61 \pm 4,58$	~ 1345
Benetke	$0,55 \pm 0,15$	$3,63 \pm 1,02$	$16,88 \pm 0,91$	~ 3258

III. Ugotavljanje udeležbe kvasovke *S. cerevisiae* pri kroženju joda v okolju

1. Ugotavljanje živosti kvasovk, celokupne količino akumuliranega ^{127}I ter izdelava rastnih krivulj pri različnih začetnih koncentracijah ^{127}I v mediju (Pred poskus že opravljen, preostali del do avgusta).
2. Ugotavljanje vpliva različne vrste biomase na akumulacijo ^{127}I . Uporaba mrtve, liofilizirane, aktivne dispergirane ter imobilizirane biomase (do oktobra).
3. Ugotavljanje specifičnosti vezave za jod ob prisotnosti Se, Zn in Cr (do novembra).
4. Ugotavljanje radiotoksičnega delovanja ^{131}I in ^{129}I pri različnih začetnih aktivnostih na kvasovke (do decembra).

Rastne krivulje za *S. cerevisiae* pri različnih začetnih koncentracijah ^{127}I v mediju

Začetne koncentracije ^{127}I od 0,05 do 2 $\mu\text{g g}^{-1}$



Začetne koncentracije joda, dodane gojišču v obliki KI, v koncentracijskem območju od 5 do 8000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ niso imele ugodnega vpliva na rast kvasovke *S. cerevisiae*.

Zaključki

- Razvita metoda za separacijo joda z razkrojem v alkalni talini ter z adsorpcijo joda na aktivnem oglju je primerna za določanje ^{129}I v vzorcih iz okolja.
- Doseženi kemijski izkoristki za separacijo joda iz IAEA-375 Soil in morskih sedimentov so v območju med 60 in 70 % ter za morske alge med 75 in 85 %.
- Ugotovljeno je bilo dobro ujemanje med določeno in referenčno vrednostjo za vsebnost ^{129}I v IAEA-375 Soil.
- Dobljeni rezultati za ^{129}I v morskih sedimentih so v območju od 3,6 do $8,7 \cdot 10^{-4} \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$ ter za morske alge v območju od 2,4 do $3,1 \cdot 10^{-3} \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}$.
- Stabilni jod ^{127}I v nizkih začetnih koncentracijah v gojišču ($0,05 - 2,0 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) pozitivno deluje na rast kvasovke *S. cerevisiae*.

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

2. Analizne metode

2.3. Speciacija aluminija v čaju

Blaž Kralj

Institutska mentorica: Radmila Milačič

Fakultetna mentorica: Radmila Milačič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Univerze v Ljubljani

Fakultetni komentor: Peter Bukovec, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani

Pri študiju aluminijevih zvrsti v ekstraktih pravih čajev, sem preučeval črne, zelene in rdeče čaje. Koncentracije aluminija v ekstraktu čajev so bile med $0,5-4 \text{ mg dm}^{-3}$. S kombinacijo velikostno izključitvene kromatografije (VIK) in anionsko izmenjalne hitre tekočinske kromatografije (FPLC), določanjem ločenih aluminijevih zvrsti z merjenjem emisije v induktivno sklopljeni plazmi (ICP-OES) ter z elektropršilno tandemsko masno spektrometrijo (ES-MS-MS) sem ugotovil, da je 10-35 % celotnega aluminija vezanega v obliki Al-citrata. Preostali aluminij, ki se je močno adsorbiral na nosilce kolon, je najverjetneje vezan na fenolne spojine. Dodatek mleka v ekstrakt čajev in analiza z VIK z ICP-OES in ultravijolično (UV) detekcijo ter nativno elektroforezo (SDS-PAGE) je pokazala, da je 40-70 % aluminija okludiranega v mlečne proteine (kazeine), medtem ko je množina Al-citrata enaka kot v ekstraktu samem. Dodatek limone v ekstrakte čajev in analiza z FPLC-ICP-OES je pokazal, da ostane delež Al-citrata enak pri zelenih in rdečih čajih, pri črnih pa se poveča. Te ugotovitve kažejo, da se biološka dostopnost aluminija v ekstraktih čajev lahko poveča, ko pijemo čaj z mlekom in tudi, ko pijemo čaj z limono.

1st MR O-2, April 19, 2006

2. Analytical methods

2.3. Aluminium speciation in tea

Blaž Kralj

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Radmila Milačič, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Supervisor at the university: Radmila Milačič, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-supervisor at the university: Peter Bukovec, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Speciation of Al in tea infusions was performed by size exclusion and anion-exchange FPLC with ICP-OES detection and identification of Al-binding ligands by SDS page electrophoresis and ES-MS-MS analysis. The results indicated that 10-35 % of total Al in tea infusions corresponded to negatively charged Al-citrate, while the remaining Al was most likely bound to phenolic compounds. The transformation of Al species was studied in tea with milk or lemon. Results for tea with milk indicated that Al-citrate was not transformed, while about 40-70 % of total Al was occluded by milk proteins (mostly by caseins). When citric acid was added to tea infusions the percentage of negatively charged Al-citrate species remained either the same in red and green tea or was enhanced in black tea. Data of the present investigation indicate that the bioavailability of Al in tea infusions may be increased in tea with milk and also in tea with lemon.

Speciacija aluminija v čaju

1. Uvod

Čaj *Camellia sinensis*

Čaj *Camellia sinensis* je ena od rastlin, ki je tolerantna na aluminij. Stari čajni listi vsebujejo med 2 in 3 % aluminija (suha teža), vendar liste oberejo veliko prej, preden je delež tako visok. Koncentracije v listih, namenjenih za pripravo napitkov so med 300 μg in 1500 μg aluminija g^{-1} . Različne vrste čaja (črni, oolong – rdeči in zeleni čaj) pripravljajo iz iste rastline, razlikujejo se le po postopku priprave listov. Pri črnem čaju liste najprej posušijo na zraku in šele nato zvijejo, kar povzroči aktivacijo endogene polifenolne oksidaze. To sproži proces fermentacije in oksidacijo polifenolov, ki so prisotni v listih. Ko dosežejo zadovoljivo kvaliteto čaja, fermentacijo ustavijo. Proces obdelave pri zelenem čaju je drugačen. Liste najprej poparijo z vodo in tako preprečijo fermentacijo. Priprava oolong čaja je podobna pripravi črnega čaja, le da je čas fermentacije krajši.

Koncentracija aluminija v ekstraktu čaja je odvisna od mnogih dejavnikov. Najpomembnejši je starost obranih listov, ostali dejavniki pa so še genetika rastline, zemlja, na kateri raste čajevc, količina padavin, nadmorska višina ter pogoji priprave (razmerje med čajem in vodo, temperatura, čas ekstrakcije...). Koncentracije aluminija v ekstraktih čaja, navedene v literaturi, se gibljejo med 1-6 mg dm^{-3} . Pri tem je treba poudariti, da načini priprave ekstraktov niso enotni. Koncentracija aluminija v ekstraktu čaja je tako lahko tudi do 30-krat višja, kot je mejna dovoljena vrednost koncentracije aluminija v pitni vodi (200 mg dm^{-3}).

Speciacijska analiza aluminijevih zvrsti v čaju

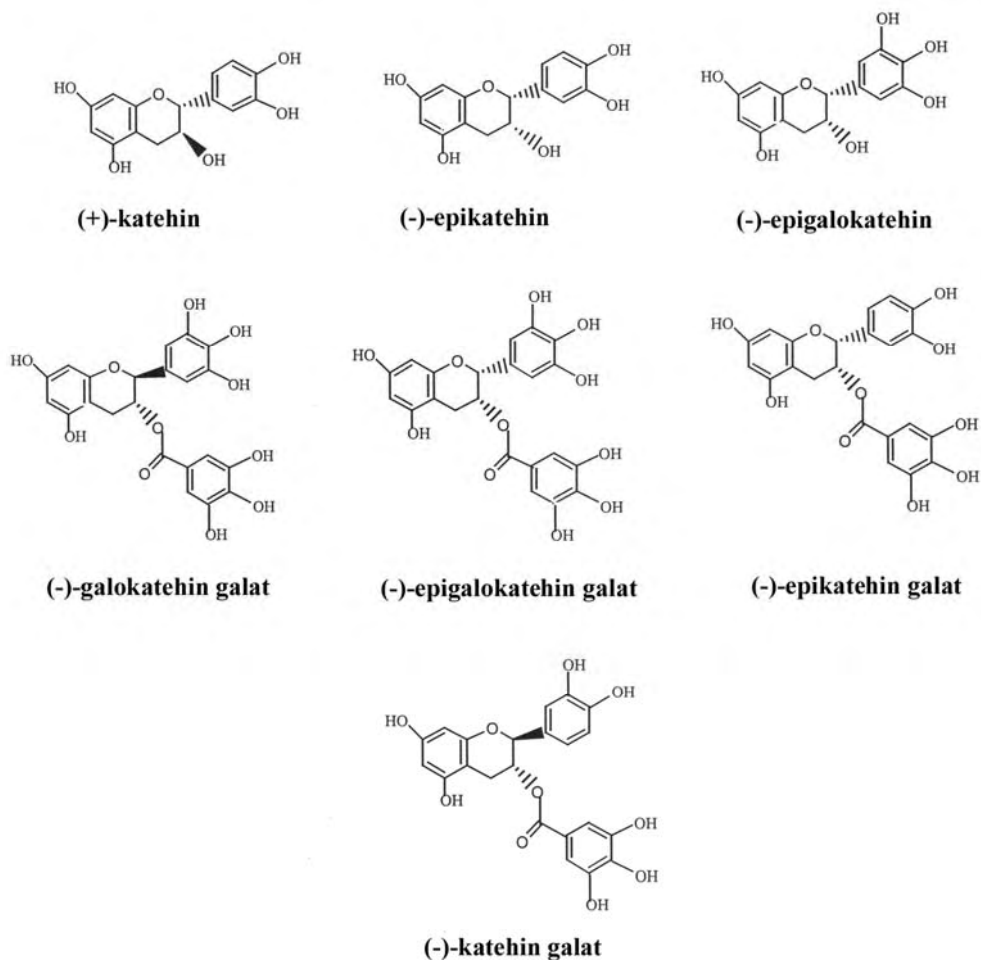
Aluminij je trda Lewisova kislina in se močno veže na ligande, ki so močne kisik-donorske skupine. Mednje sodijo fosfatne, karboksilatne in fenolatne skupine. Čaj vsebuje precej takih spojin, podatki o njihovih deležih v črnem in zelenem čaju pa so zbrani v tabeli 1. Iz tabele je razvidno, da se vrsti čaja razlikujeta predvsem po deležu posameznih vrst polifenolov, kjer pri zelenem prevladujejo preprosti, pri črnem pa kompleksni

polifenoli. Razlika je posledica fermentacije, kjer se oksidirajo preprosti polifenoli do bolj kompleksnih, ki dajo oolong in črnemu čaju rjavo barvo in okus. Večino teh spojin še vedno ni identificiranih in jih navajajo kot čajna barvila. Kemijske formule nekaterih katehinov so prikazane na sliki 3. Rdeči čaj ima večji delež preprostih polifenolov kot črni, a manjšega kot zeleni. Polifenoli imajo v rastlinah različne vloge. Skrbijo za privabljanje žuželk pri oprraševanju, služijo kot obramba pred rastlinojedci...

Tabela 1: Masni deleži posameznih spojin v suhi snovi ekstrakta črnega in zelenega čaja.

	Zeleni čaj	Črni čaj
	Masni delež (%)	Masni delež (%)
polifenoli		
katehini	30	9
preprosti polifenoli		4
flavonoli	2	2
drugi polifenoli	6	23
dušikove spojine		
kofein	3	3
drugi metilksantini	<1	<1
teanin	3	3
amino kisline	3	3
peptidi in proteini	6	6
organske kisline	2	2
sladkorji	7	7
drugi ogljikovodiki	4	4
lipidi	3	3

kalij	5	5
drugi minerali/pepel	5	5
aroma	sledovi	sledovi



Slika 1: Strukturne formule katehinov, ki so prisotni v čaju.

Glede na to, da fenolne spojine predstavljajo 40 % suhe snovi v ekstraktih čaja in imajo veliko število potencialnih vezavnih mest, predvidevajo, da so le-te glavni vezalci aluminija v čaju. Iz nekaterih ²⁷Al-NMR študij (jedrska magnetna resonanca) so ugotovili, da je v mladih listih čaja en sam aluminijev signal, ki ustreza signalu kompleksa med aluminijem in katehinom. Pri starejših listih so našli še druge manjše signale, ki ustrezajo aluminijevim kompleksom s polifenoli in organskimi kislinami. Nagata in sodelavci so ugotovili, da je večina aluminija vezana na katehine, preostanek pa na druge fenolne in

organske kisline. Mhatre s sodelavci je za študij aluminijevih zvrsti prav tako uporabil NMR in ugotovil, da je aluminij pretežno vezan na oksalat in nekatere druge neidentificirane komplekse z organskimi kislinami.

Literaturni podatki o kemijskih zvrsteh aluminija v ekstraktih čajev so si precej nasprotujoči. French s sodelavci je uporabil Barnes-Driscolov kinetični in kationsko izmenjalni postopek. Na osnovi rezultatov so sklepali, da je aluminij skoraj v celoti vezan na organske molekule. Z ultrafiltracijo pa so ugotovili, da je aluminij v ekstraktu čaja vezan pretežno na molekule je z mikroultrafiltracijo ugotovil, da je okoli 30 % aluminija v čaju vezanega na zvrsti z molskimi masami večjimi od 10000 Da. Speciaciono analizo so izvedli tudi z velikostno izključitveno kromatografijo (VIK) v kombinaciji z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) ali z detekcijo s spektrofotometrijo. Opažanja Owena s sodelavci se dobro ujemajo z skupino Flatena in Lunda, ki trdijo, da se je 24 % aluminija v čaju eluiralo s kolone pri zadrževalnem volumnu, ki ustreza molekulski masi med 4000 in 6500 Da. Ostali aluminij se je absorbiral na kolono. Erdemoglu s sodelavci je uporabil dve koloni za frakcionacijo aluminija v ekstraktu turškega črnega čaja. Ekstrakt je analiziral na koloni, ki je bila napolnjena z neionskim adsorbentom Amberlite XAD-7. Eluent s te kolone je ločeval še na kelatni smoli Chelex-100. Predpostavili so, da adsorbiran aluminij na XAD-7 koloni (28-33 %) predstavlja aluminijeve hidrolizne polifenolne zvrsti, frakcija, ki se je zadržala na Chelex-100 koloni (10-19 %), pa aluminijeve kationske zvrsti. Ti zaključki so le domneve, saj nobene od teh zvrsti niso določili. Albertijeva in sodelavci so določali konstante stabilnosti aluminijevih zvrsti z vezavo aluminija na kelatno smolo Chelex-100. Ugotovili so, da je aluminij vezan na močne komplekse, kjer je konstanta adsorpcije večja od $10^{5,11}$. Čeprav so različni raziskovalci intenzivno preučevali speciaciono aluminija v čajih, ostajajo še vedno odprta vprašanja o porazdelitvi aluminijevih zvrsti.

2. Namen dela

Iz uvodnega poglavja je razvidno, da so kljub številnim raziskavam in doseženemu napredku metode za speciaciono aluminijevih zvrsti v bioloških sistemih še vedno v razvoju. Predvsem na področju analitike visokomolekularnih aluminijevih zvrsti je še nekaj odprtih

vprašanj. Zato je bil namen mojega dela razvoj analiznih metod za zanesljivo določanje visokomolekularnih aluminijevih zvrsti v ekstraktih čaja.

Iz pregleda literature je razvidno, da kemijske oblike aluminija v čaju niso bile definirane ter da so si ocene glede njihovih molskih mas in aluminijevih zvrsti nasprotujoče. Za speciacijsko analizo aluminijevih zvrsti v čajih sem uporabil velikostno izključitveno kromatografijo (VIK), anionsko in kationsko izmenjalno kromatografijo ter CIM kromatografske diske. Aluminij sem določal z atomsko absorpcijsko (AAS) in optično emisijsko spektrometrijo (OES) ter z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Ligande sem določal z nativno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE) in s tandemsko masno spektrometrijo z elektropršenjem (ES-MS-MS). S pomočjo metod, ki sem jih razvil, sem identificiral aluminijeve zvrsti v ekstraktih pravih čajev. Preučeval sem tudi tvorbo in pretvorbo aluminijevih kompleksov pri dodatku limone ali mleka v ekstrakt čaja.

Rezultati in diskusija

Speciacijska analiza aluminijevih zvrsti v pravih čajih

Optimizacija pogojev določanja aluminija z ICP-OES

Uporaba anionsko izmenjalne Mono Q FPLC kolone z ICP-OES detekcijo omogoča kvantitativno ločbo Al-citrata z dobro ponovljivostjo merjenja ($\pm 3\%$ za 6 zaporednih ločb) in z ugodno mejo detekcije $0,15 \mu\text{g cm}^{-3}$. Da bi lahko zanesljivo določal celotne koncentracije aluminija v listih čaja, v ekstraktu čaja in v frakcijah po ločbi na kromatografskih kolonah, sem pri ICP-OES določitvah primerjal interference na dveh emisijskih črtah podobne občutljivosti (309,278 nm in 396,152 nm). Podatki o prekrivanju spektroskopskih črt kažejo, da sta ti dve črti prosti spektralnih interferenc elementov, ki jih lahko pričakujemo v merjenih vzorcih. Točnost meritev aluminija sem preveril z merjenjem referenčnega materiala SPWW1 (Waste Water 1, Spectrapure standards AS, Oslo, Norveška). Izmerjena vrednost $2,00 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-3}$ pri črti 309,278 nm in $2,01 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-3}$ pri 396,152 nm se je dobro ujemala s certificirano vrednostjo, ki je $2,00 \pm 0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$. Tudi določitve aluminija v ekstraktu čaja sem opravil pri obeh črtah. Določeni koncentraciji $3,78 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-3}$ pri 309,278 nm in $3,85 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-3}$ pri

396,152 nm se dobro ujemata. Za preverjanje točnosti določitev aluminija z ICP-OES sem istemu čaju dodal tudi $2,00 \pm 0,02 \mu\text{g cm}^{-3}$ in $4,00 \pm 0,04 \mu\text{g cm}^{-3}$ aluminija. Ujemanje med pričakovano in izmerjeno vrednostjo v teh vzorcih je bilo med 100 in 102 % pri obeh emisijskih črtah aluminija. Na osnovi teh podatkov sem se odločil, da bom meril aluminij pri valovni dolžini 396,152 nm zaradi boljšega razmerja med signalom in šumom (S/N). Pri koncentraciji aluminija 1 mg cm^{-3} je pri črti 396,152 nm vrednost S/N 32, pri črti 309,278 nm pa 6.

Da bi določil vpliv eluentov, ki sem jih uporabljal pri kromatografskih ločbah, na učinkovitost razprševanja in posledično na točnost določitve koncentracije aluminija z ICP-OES, sem koncentracijo aluminija v frakcijah, eluiranih s kromatografskih kolon, določil z in brez uporabe internega standarda. Znano je, da itrij kot interni standard ($10 \mu\text{g cm}^{-3}$ Y) učinkovito kompenzira matrične vplive. Izkazalo se je, da so bile koncentracije aluminija v frakcijah, ločenih na FPLC kolonah, okoli 20 % nižje, če nisem uporabljal internega standarda. Pri uporabi internega standarda sem pri vzorcih z znano dodano množino aluminija (frakcije po kolonski ločbi) dobil ujemanje med pričakovano in izmerjeno vrednostjo med 99-101 %. Vpliv TRIS pufra, ki sem ga uporabil kot eluent pri ločbi na VIK, je bil pri določitvi aluminija v ločenih frakcijah na ICP-OES sicer majhen vendar sem za zanesljivo določitev aluminija po kromatografskih ločbah vseeno uporabljal itrij.

Točnost določitve aluminija v listih čaja z mikrovalovnim razkrojem sem preveril z uporabo referenčnega materiala Standard Reference Material 1573a (Trace Elements in Tomato Leaves, NIST, Gaithersburg, ZDA). Določitev aluminija sem opravil v šestih paralelnih določitvah. Izmerjena vrednost (povprečje šestih paralelnih določitev) $606 \pm 10 \text{ mg kg}^{-1}$ se je dobro ujemala s certificirano vrednostjo $598 \pm 12 \text{ mg kg}^{-1}$. Meja zaznavnosti za določitev aluminija v listih čaja je bila $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$, ponovljivost merjenja pa 0,5 %.

Celotne koncentracije aluminija v čaju in pH čajev

Pred speciacijsko analizo sem določil celotno koncentracijo aluminija v listih in ekstraktih čajev ter izmeril pH ekstraktov šestih črnih, dveh rdečih in dveh zelenih čajev katerih poreklo je bilo kitajsko, indijsko, japonsko, nepalsko, šrilanško in kenjsko.

Celotne koncentracije aluminija v listih in ekstraktih čajev so podane v tabeli 9. Celotna koncentracija aluminija v listih čaja je bila med 187-1199 mg kg⁻¹. Najvišjo koncentracijo sem določil v listih kitajskega rdečega čaja oolong se chung (1199 ± 60 mg kg⁻¹), najnižjo pa v indijskem črnem čaju assam dirial (187 ± 10 mg kg⁻¹). Ker gre za isto rastlino, na koncentracijo aluminija v listih vpliva predvsem prst, na kateri rastlina raste, in starost listov čaja ob obiranju. Podobne koncentracije aluminija v listih čaja so bile objavljene tudi v literaturi

pH ekstraktov vseh čajev je bil okoli 5,5. Koncentracije aluminija v ekstraktih čajev so bile med 0,5-4 mg dm⁻³. Najvišjo koncentracija aluminija sem določil v ekstraktu japonskega zelenega čaja bancha (3,8 ± 0,3 mg dm⁻³), medtem ko sta bili najnižji koncentraciji aluminija v kitajskem rdečem čaju Pu-Erh in kitajskem zelenem China gunpowder temple of heaven (0,7 ± 0,1 mg dm⁻³). Tudi te vrednosti so podobne vrednostim, objavljenim v literaturi. Iz tabele 2 je razvidno, da neposredne povezave med koncentracijo aluminija v listih čaja in v ekstraktu čaja ni. Iz tega lahko sklepam, da je koncentracija aluminija v ekstraktu čaja odvisna tudi od časa ekstrakcije ter narave aluminijevih zvrsti, ki so prisotne v listih. Glede na to, da sta bila med analiziranimi čaji samo dva iz iste province (yunnan in pu-erh), ni mogoče ugotavljati korelacije med vsebnostjo aluminija in geografskim poreklom, čeprav je iz tabele razvidno, da so koncentracije aluminija v listih in v ekstraktih pri obeh čajih med nižjimi. »Bancha« pomeni v japonščini pozna trgatev. Visoke koncentracije aluminija v listih (980 ± 50 mg kg⁻¹) in v ekstraktu tega čaja (3,8 ± 0,3 mg dm⁻³) se ujemajo s podatki iz literature, skladajo pa se tudi s tem, da se s starostjo koncentracija aluminija v listih čaja povečuje.

Tabela 2: Celotne koncentracije aluminija v listih in v ekstraktu čajev; koncentracije aluminija sem določil z ICP-OES; rezultati podajajo povprečje treh paralelnih določitev s standardnim odklonom merjenja.

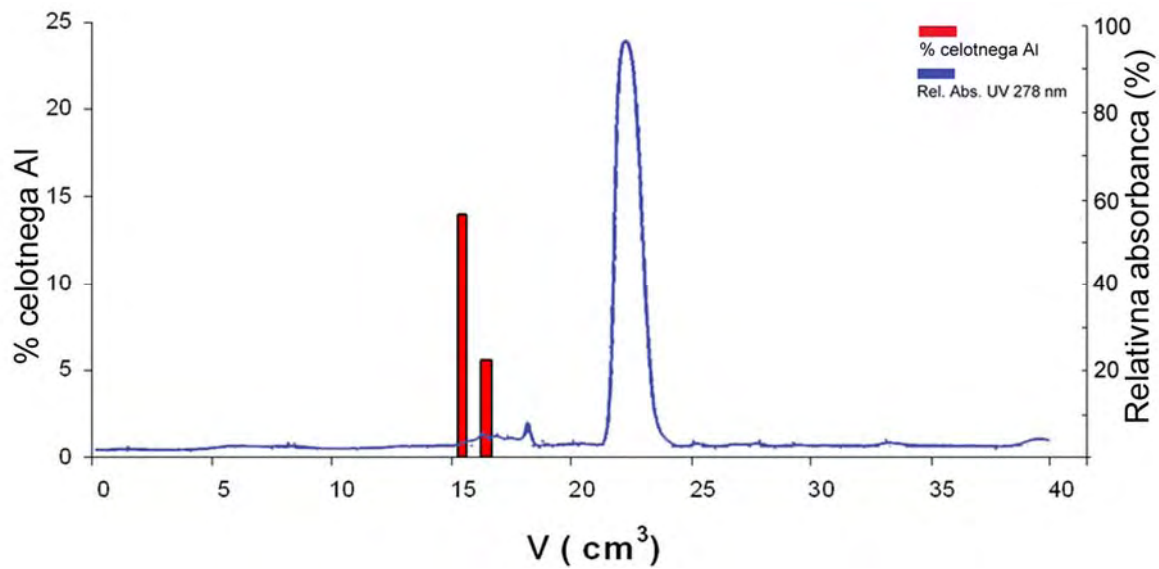
Vzorec	Celotni aluminij v čajnih listi (mg kg ⁻¹)	Celotni aluminij v ekstraktu čaja (mg dm ⁻³)
Golden Nepal (črni čaj)	220 ± 10	1,4 ± 0,1
Kenya gfop Mariny (črni čaj)	288 ± 20	2,7 ± 0,3

Keemun (črni čaj)	528 ± 25	1,6 ± 0,1
Ceylon op1 Kenilworth (črni čaj)	662 ± 33	2,7 ± 0,3
Assam tgfop-1 Dirial (črni čaj)	187 ± 10	1,7 ± 0,2
Yunnan (črni čaj)	248 ± 10	1,2 ± 0,1
China Gunpowder Temple of Heaven (zeleni čaj)	692 ± 35	0,7 ± 0,1
Bancha (zeleni čaj)	980 ± 50	3,8 ± 0,3
Pu-Erh (rdeči čaj)	371 ± 20	0,7 ± 0,1
China Oolong Sechung (rdeči čaj)	1199 ± 60	2,7 ± 0,2

Porazdelitev aluminijevih zvrsti v ekstraktih čaja na VIK koloni

Tris-HCl se uporablja kot primeren eluent za analizo aluminijevih zvrsti v ekstraktih čaja. Ker je bil pH večine ekstraktov čajev okoli 5,5 ($5,5 \pm 0,2$), sem tudi Tris-HCl s koncentracijo $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ pripravil pri tem pH. Da bi preprečil morebitno nespecifično adsorbcijo in desorbcijo aluminijevih zvrsti na koloni, sem ionsko moč eluenta povečal z dodatkom NaCl ($0,15 \text{ mol dm}^{-3}$). Aluminij sem določal v ločenih frakcijah po $0,9 \text{ cm}^3$ z ICP-OES, kromatografsko ločbo pa sem spremljal z UV detektorjem pri valovni dolžini 278 nm. Absorpcija pri tej valovni dolžini je značilna za spojine, ki vsebujejo aminokislino in aromatske obročje. Razlog za izbiro te valovne dolžine niso samo aromatski polifenoli, ki so prisotni v ekstraktih čaja, ampak tudi dejstvo, da sem v nadaljevanju študiral pretvorbo aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja z mlekom, kjer so prisotni proteini (ki so sestavljeni iz aminokislin). Značilen kromatogram ekstrakta čaja prikazuje slika 2. Razvidno je, da se je 20 % aluminija eluiralo pri retencijskem volumnu med $14,9 \text{ cm}^3$ in $16,7 \text{ cm}^3$. Preostali aluminij se je močno adsorbiral na kolono. Zaporedne ločbe so pokazale, da adsorbirane aluminijeve zvrsti ne motijo naslednjih določitev. Kolono sem

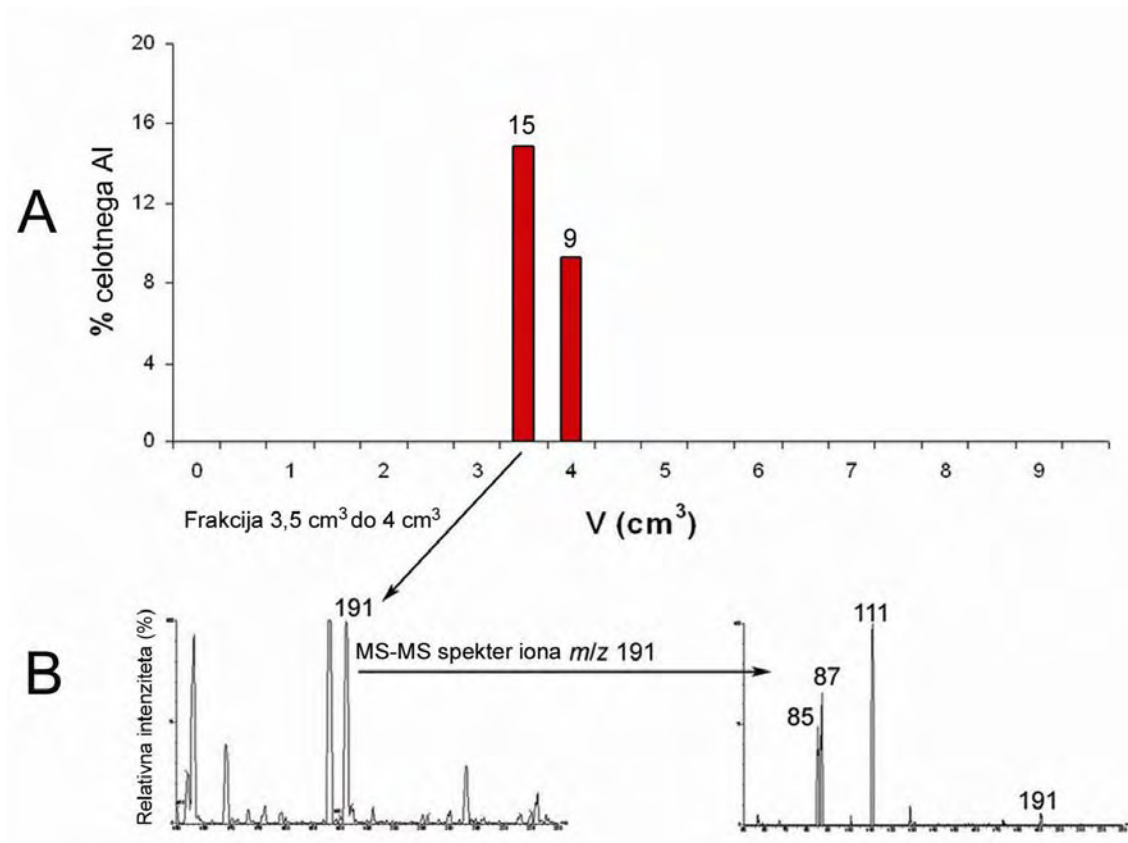
umeril z mešanico standardnih proteinov. Retencijski volumen, pri katerem so se eluirale aluminijeve zvrsti, ustreza molekulskim masam med 4600 Da in 2100 Da z maksimumom pri 3800 Da. Kromatogrami ostalih ekstraktov čajev so bili podobni, delež eluiranega aluminija pa je bil med $11 \% \pm 2 \%$ in $36 \% \pm 4 \%$ (podatki so zbrani v prvem stolpcu v tabeli 10). Največji delež aluminija se je eluiral pri nepalskem črnem čaju golden nepal ($36 \pm 4 \%$), najnižji pa pri kitajskem rdečem čaju pu-erh ($11 \% \pm 2\%$). Podatki o deležu eluiranega aluminija se ujemajo s tistimi, ki so objavljeni v literaturi. Tako je na primer Lund s sod. objavil, da se pri analizi ekstrakta čaja 24 % aluminija eluira z VIK kolone pri retencijskem volumnu, ki ustreza molekulski masi med 4000 Da in 6500 Da, preostanek pa se adsorbira na polnilo kolone. Ker ima VIK kolona optimalno področje ločevanja pri molskih masah med 3000 Da in 70000 Da, je razlika v molskih masah eluiranih zvrsti med mojimi rezultati in rezultati, opisanimi v literaturi, v območju eksperimentalne napake. Glede na to, da so nekateri avtorji poročali, da so v čaju prisotni tudi aluminijevi kompleksi z organskimi kislinami, me je zanimalo, pri katerem retencijskem volumnu se le-ti eluirajo s kolone. Zato sem pripravil standardni raztopini aluminijevega citrata ($5 \text{ mg dm}^{-3} \text{ Al}$, pH 5,5) in aluminijevega oksalata ($5 \text{ mg dm}^{-3} \text{ Al}$, pH 5,5). Ko sem injiciral aluminijev citrat, se je aluminij kvantitativno eluiral pri retencijskem volumnu med $14,9 \text{ cm}^3$ in $16,7 \text{ cm}^3$, pri injiciranju oksalata pa se je aluminij vezal na kolono in se ni eluiral. Naredil sem še poskus, pri katerem sem ekstraktu čaja dodal standardno raztopino aluminijevega citrata ($5 \text{ mg dm}^{-3} \text{ Al}$, pH 5,5). Aluminij se je eluiral pri retencijskem volumnu med $14,9 \text{ cm}^3$ in $16,7 \text{ cm}^3$, povečanje koncentracije aluminija pa je bilo sorazmerno dodatku. Ti rezultati kažejo, da VIK kolona ni dovolj selektivna za natančno določitev molekulskih mas teh aluminijevih zvrsti.



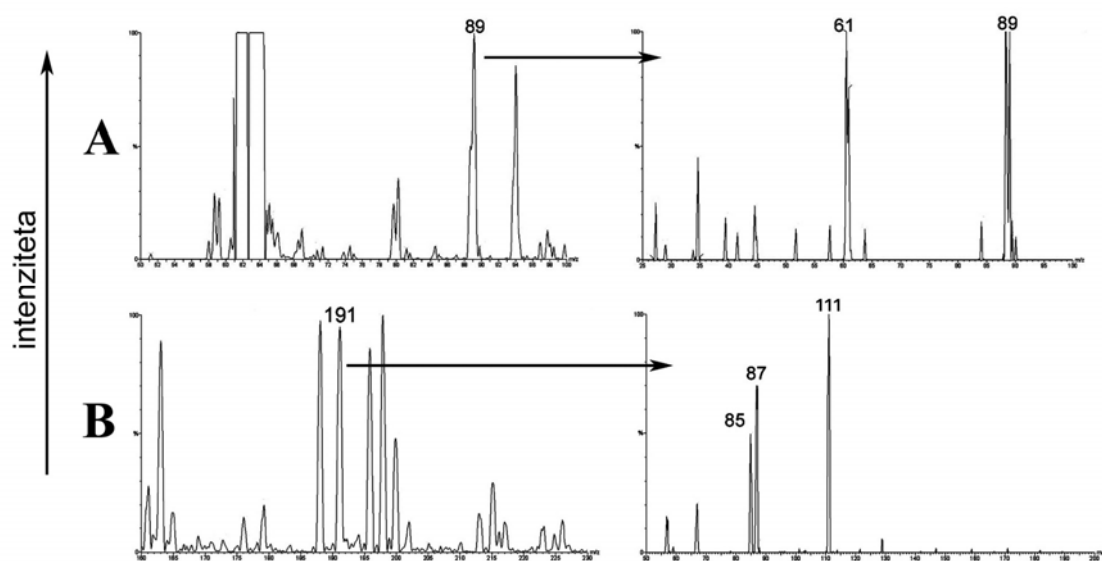
Slika 2: Porazdelitev aluminijevih zvrsti v čaju keemun na VIK z UV in ICP-OES detekcijo. Stolpci predstavljajo delež aluminija, ločenega na koloni (povprečje treh paralelnih določitev), črta pa predstavlja odziv UV detektorja (relativna absorbanca pri 278 nm).

Porazdelitev aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja na Mono Q FPLC koloni

Aluminijeve zvrsti v ekstraktu čaja sem preučeval tudi na anionsko izmenjalni Mono Q FPLC koloni. Ker sem glede na rezultate analiz ekstraktov čaja na VIK koloni predvideval, da so v čaju prisotni tudi aluminijevi kompleksi z organskimi kislinami, sem uporabil postopek, ki je omogočal uspešno ločitev negativno nabitih aluminijevih zvrsti na FPLC koloni. Ker eluent vsebuje nitratni ion, ki v UV področju močno absorbira, UV detekcija ni bila mogoča. V ločenih frakcijah sem aluminij določal z ICP-OES. Značilen kromatogram čaja je predstavljen na sliki 3. Razvidno je, da se 24 % celotnega aluminija eluira med 3,5 cm³ in 4,5 cm³. Preostanek aluminija se močno veže na polnilo kolone. S ponovitvami analiz sem ugotovil, da aluminij, ki se je vezal na polnilo kolone, ni motil nadaljnjih analiz. Retencijski volumen eluiranih aluminijevih zvrsti ustreza negativnemu kompleksu Al-citrata. Da bi lahko identificiral ligand, ki veže aluminij, sem z ES-MS-MS analiziral frakcije, ki so vsebovale aluminij. Na sliki 9 sta masna in MS-MS spektra standardnih raztopin Al-citrata in Al-oksalata. Značilni masi m/z sta pri citratu 191 in pri oksalatu 89, v MS-MS spektru so pri citratu prisotni m/z 111, 87 in 85 ter pri oksalatu 89 in 61. Masni spekter frakcije čaja in MS-MS analiza sta predstavljena na sliki 7B. V masnem spektru frakcije med 3,5 cm³ in 4 cm³ je prisoten značilen vrh m/z 191. V spektru njegovih hčerinskih ionov so prisotni ioni značilnih m/z 111, 87 in 85, kar potrjuje, da je ligand, ki veže aluminij, citrat. MS analiza slepega vzorca je pokazala, da ioni z m/z 162, 163, 169, 173, 176, 179, 188, 196, 210, 213 in 226 izhajajo iz eluentov, ki sem jih uporabljal pri ES-MS-MS in FPLC analizah. Ker v masnem spektru ni bilo prisotnih drugih mas, sem lahko sklepal, da je citrat edini ligand, ki veže aluminijeve ione v tej frakciji. Enak spekter sem dobil pri analizi frakcije, ki se je eluirala med 4,0 cm³ in 4,5 cm³, kar tudi potrjuje prisotnost citrata. Analize preostalih ekstraktov čaja z Mono Q FPLC – ICP-OES so dale kromatograme enakih oblik, delež aluminija, ki se je eluiral s kolone, pa je bil med 10 % ± 2 % in 34 % ± 4 %. Z ES-MS-MS analizami sem v frakcijah, ki so vsebovale aluminij, pri ekstraktih vseh čajev potrdil prisotnost citrata. Iz rezultatov lahko sklepam, da je delež aluminija, vezanega na citrat, v ekstraktih čaja med 10 % ± 2 % in 34 % ± 4 %. Največji delež Al-citrata sem določil v nepalskem črnem čaju golden nepal (34 % ± 4 %), najnižjega pa pri kitajskem rdečem čaju pu-erh (10 % ± 2 %).



Slika 3 A: Porazdelitev aluminijevih zvrsti čaja keemun na anionsko izmenjalni Mono Q FPLC z ICP-OES detekcijo (povprečje 3 paralelnih določitev). **B:** ES-MS spekter frakcije, ki se je eluirala med 3,5 cm³ in 4 cm³ in spekter hčerinskih ionov iona m/z 191.



Slika 4: Slika spektrov za standardne raztopine Al-oksalata in hčerinskih ionov fragmenta m/z 89 ($M-H$)⁻ (A) ter Al-citrata in hčerinskih ionov m/z 191($M-H$)⁻ (B).

Primerjava speciacijskih analiz na obeh kromatografskih kolonah

Primerjal sem rezultate speciacijskih analiz ekstraktov čajev na VIK in FPLC kolonah. Podatki so zbrani v tabeli 3. Iz tabele je razvidno, da se je v ekstraktih čaja eluiral enak delež aluminijevih zvrsti z VIK in anionsko izmenjalne Mono Q FPLC kolone. S kombinacijo speciacijske analize anionsko izmenjalne Mono Q FPLC-ICP-OES in ES-MS-MS sem dokazal, da je aluminijeva zvrst v ekstraktih čajev negativno nabiti kompleks Al-citrata. Glede na to, da je delež eluiranega aluminija z VIK kolone enak deležu na FPLC koloni in da je retencijski volumen negativnega Al-citrata na VIK koloni identičen, lahko sklepam, da je tudi zvrst, ki se je eluirala z VIK kolone, negativni kompleks Al-citrata, kljub temu, da retencijski volumen kaže na zvrst z molsko maso med 4600 Da in 2100 Da. VIK kolona torej ni dovolj selektivna za določitev molekulskih mas NM-Al zvrsti. Aluminijeve zvrsti, ki se niso eluirale z VIK in FPLC kolon, so se močno vezale na kolono. Delež aluminija, vezan na te zvrsti, je bil med 65 % in 90 %. Z razpoložljivimi analiznimi tehnikami jih nisem mogel identificirati. Na osnovi podatkov iz literature lahko sklepam, da je aluminij vezan na fenolne zvrsti, saj le-te predstavljajo 40 % suhe snovi v ekstraktu čaja. Tudi NMR študije v listih čaja so potrdile komplekse aluminija s fenolnimi spojinami. Iz tabele 3 je razvidno tudi, da sta deleža Al-citrata najnižja v obeh čajih, ki izvirata iz pokrajine Yunnan (yunnan $13 \% \pm 2 \%$ in pu-erh $10 \% \pm 2 \%$). Rezultati NMR študij kažejo, da se aluminijevi kompleksi z organskimi kislinami v listih pojavijo po določenem času, v mladih listih pa jih ni. Zato bi lahko sklepal, da je bila starost listov čajev golden nepal, china gunpowder in bancha v času obiranja višja kot pri ostalih. To vsekakor drži za bancha (bancha - pozna trgatev). Glede na to, da je Al-citrat ena izmed najbolj biološko dostopnih oblik aluminija, sem v tabeli 4 podal koncentracije aluminija, vezanega v obliki citrata, v ekstraktih čajev. Razvidno je, da vsebuje največ aluminija v obliki citrata ($0,99 \text{ mg dm}^{-3} \pm 0,14 \text{ mg dm}^{-3}$) ekstrakt čaja bancha, najmanj pa ($0,07 \text{ mg dm}^{-3} \pm 0,02 \text{ mg dm}^{-3}$) rdeči čaj pu erh.

Tabela 3. Delež NM-Al zvrsti, določenih z VIK-UV-ICP-OES, in negativno nabitega Al-citrata, določenega z anionsko izmenjalno Mono Q FPLC-ICP-OES. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh paralelnih določitev skupaj s standarnim odklonom.

Vzorec	Delež NM-Al zvrsti, določenih z VIK-UV-ICP-OES (%)	Delež negativno nabitega Al-citrata kompleksa, določenega z anionsko izmenjalno FPLC-ICP-OES (%)	Razlika (%)
Golden Nepal (črni čaj)	36 ± 4	34 ± 4	2 ± 6
Kenya gfop Marinyn (črni čaj)	22 ± 3	19 ± 3	3 ± 4
Keemun (črni čaj)	20 ± 3	24 ± 3	4 ± 4
Ceylon op1 Kenilworth (črni čaj)	17 ± 3	19 ± 3	2 ± 4
Assam tgfop-1 Dirial (črni čaj)	17 ± 3	14 ± 2	3 ± 4
Yunnan (črni čaj)	14 ± 2	13 ± 2	1 ± 3
China Gunpowder Temple of Heaven (zeleni čaj)	29 ± 3	27 ± 3	2 ± 4
Bancha (zeleni čaj)	26 ± 3	26 ± 3	0 ± 4
Pu-Erh (rdeči čaj)	11 ± 2	10 ± 2	1 ± 3
China Oolong Sechung (rdeči čaj)	23 ± 3	20 ± 3	3 ± 4

Tabela 4. Koncentracije aluminija, vezanega v obliki citrata, v ekstraktih čajev, določene z Mono Q FPLC-ICP-OES. Rezultati so podani kot povprečje treh paralelnih določitev skupaj s standardnim odklonom.

Vzorec	Koncentracija aluminija, vezanega v obliki negativno nabitega Al-citrat kompleksa (mg dm ⁻³) (določen z Mono Q FPLC-ICP-OES)
Golden Nepal (črni čaj)	0,48 ± 0,06
Kenya gfop Marinyn (črni čaj)	0,51 ± 0,10
Keemun (črni čaj)	0,38 ± 0,05
Ceylon op1 Kenilworth (črni čaj)	0,51 ± 0,10
Assam tgfop-1 Dirial (črni čaj)	0,23 ± 0,04
Yunnan (črni čaj)	0,16 ± 0,03
China Gunpowder Temple of Heaven (zeleni čaj)	0,19 ± 0,03
Bancha (zeleni čaj)	0,99 ± 0,14
Pu-Erh (rdeči čaj)	0,07 ± 0,02
China Oolong Sechung (rdeči čaj)	0,54 ± 0,17

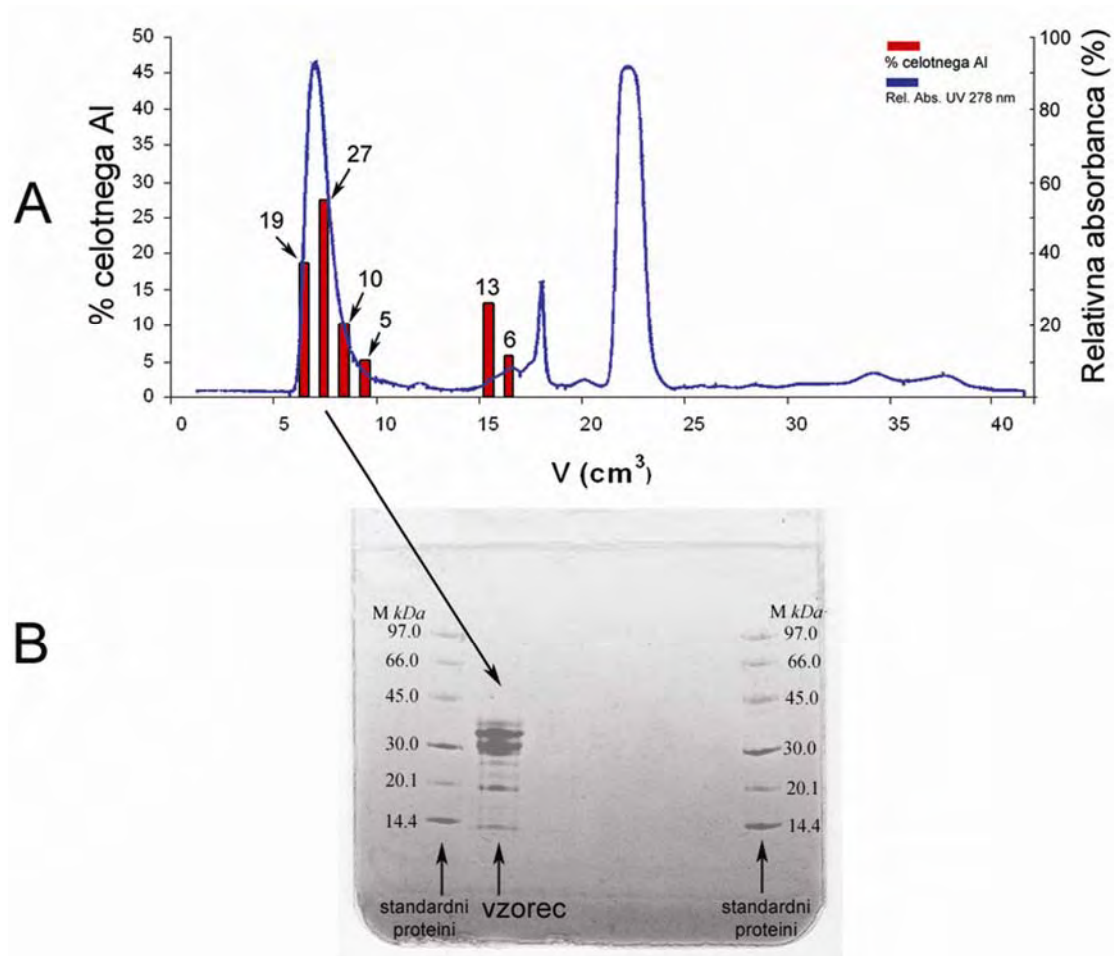
Porazdelitev aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja na Mono S FPLC koloni

Študiral sem tudi ločbo aluminijevih zvrsti v ekstraktih čajev na kationsko izmenjalni Mono S FPLC koloni. Uporabil sem postopek, ki je omogočal uspešno ločevanje pozitivno nabitih aluminijevih zvrsti. Aluminij sem v ločenih frakcijah določal z ICP-OES. Izkazalo se je, da so v ekstraktih čajev prisotne samo negativne in nevtralne aluminijeve zvrsti, saj se je celoten aluminij eluiral s fronto topila (med 0,5 cm³ in 1,5 cm³).

Aluminijeve zvrsti v čaju z mlekom

Da bi ugotovil, kaj se zgodi z aluminijevimi zvrstmi, ko v čaj dodamo mleko, sem v 25 cm³ ekstrakta čaja dodal po 0,2, 0,5, 1, 2 in 5 cm³ toplotno obdelanega mleka (UVT mleko). Uporabil sem VIK kolono, aluminij sem določal v ločenih frakcijah z ICP-OES, kromatografski ločbi pa je sledila UV detekcija pri valovni dolžini 278 nm. S povečevanjem volumna mleka se je delež aluminija, ki se je eluiral s kolone, povečal. Pri dodatku več kot 1 cm³ mleka pa je ta delež postal konstanten. Tudi kromatogrami so bili enaki. Zato sem v nadaljevanju dodal v ekstrakt čaja 1 cm³ mleka. Tipičen kromatogram ekstrakta čaja z mlekom (keemun črni čaj) je predstavljen na sliki 5A. Razvidno je, da se je 20 % aluminija eluiralo pri retencijskem volumnu med 14,9 cm³ in 16,3 cm³, medtem ko se je 58 % aluminija eluiralo pri retencijskem volumnu med 5,9 cm³ in 9,5 cm³. Preostali aluminij (22 %) se je močno vezal na polnilo kolone. Zaporedne analize so pokazale, da aluminij, ki se je adsorbiral na kolono, ni motil naslednjih ločb. Glede na retencijske volumne bi sklepal, da se med 14,9 cm³ in 16,3 cm³ eluirajo zvrsti, ki imajo molekulske mase med 4600 Da in 2100 Da, vendar sem z drugimi analizami dokazal, da je ta zvrst Al-citrat (poglavje 0). Med 5,9 cm³ in 9,5 cm³ se eluirajo spojine, ki imajo molekulska masa večjo od 70 kDa. To frakcijo sem analiziral s SDS-PAGE. Rezultat predstavlja slika 5B. Iz slike je razvidno, da je aluminij, ki se je eluiral v tej frakciji, vezan na proteine, ki imajo molekulske mase med 25 kDa in 35 kDa. Glede na retencijski volumen eluiranih zvrsti na VIK koloni, ki ustreza masi 70 kDa, lahko sklepam, da so proteini v skupkih koloidnih delcev. Kazeini sestavljajo večino mlečnih proteinov (okoli 80 %), njihove molekulske mase so med 19 in 25 kDa. Pri toplotni obdelavi, katere cilj je trajno mleko, pride do cepitve nekaterih kazeinov in spojitve z drugimi, zato je molekulska masa kazeinov v trajnem mleku nekoliko višja (med 25 in 35 kDa). S SDS-PAGE sem določil, da je molekulska masa proteinov, na katere je bil vezan aluminij, med 25 in 35 kDa, kar ustreza kazeinom v toplotno obdelanem mleku. Za kazeine je znano, da s kalcijevimi in fosfatnimi ioni tvorijo kompleks, ki ga imenujemo micel. Zaradi tvorbe micelija sem z VIK kolone razbral precej višjo molekulska masa teh proteinov. Na osnovi rezultatov speciacijskih analiz lahko trdim, da se znaten delež aluminija ali aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja z dodatkom mleka vključuje v micelij mlečnih proteinov. Porazdelitev aluminijevih zvrsti v ekstraktih čaja z mlekom je predstavljena v tabeli 13. Če primerjamo te podatke s podatki ekstraktov čajev iz tabele 10, vidimo, da se je delež aluminija, ki se eluira s kolone, precej

povečal in je med $70 \% \pm 4 \%$ pri japonskem zelenem čaju bancha in $90 \% \pm 4 \%$ pri kenijskem črnem čaju kenya gfpo mariny. Delež aluminija, ki je vezan na proteine, je med $40 \% \pm 3 \%$ in $70 \% \pm 4 \%$, medtem ko je delež aluminija v NM-Al kompleksih med $9 \% \pm 2 \%$ in $39 \% \pm 3 \%$. Najvišji delež aluminija, vezanega na proteine, je v ekstraktu kitajskega rdečega čaja pu-erh, najnižji pa v ekstraktu japonskega zelenega čaja bancha. S primerjavo podatkov iz tabel 2 in 5, sem ugotovil, da se delež NM-Al zvrsti (aluminijevega citrata) v ekstraktih čajev po dodatku mleka ne spremeni. To kaže, da so NM-Al zvrsti v ekstraktu čaja stabilne in se aluminij, ki je nanje vezan, ne pretvori v proteinske komplekse. Proteini najverjetneje kompleksirajo del aluminijevih zvrsti s fenolnimi spojinami, ki se v ekstraktu čaja ne eluirajo s kolone. Ta rezultat se ujema z ugotovitvijo, da je čaj z mlekom lažje prebavljiv, ker se fenolne spojine vežejo na proteine in se tako lažje prebavijo. V mleku so fosfati, ki preprečujejo aluminijevo absorpcijo v telo, in beljakovine, ki pospešujejo vnos aluminija v telo. Zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave, da bi ugotovil, kako je z dostopnostjo aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja z mlekom.



Slika 5: Porazdelitev aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja keemun z mlekom na VIK koloni z UV in ICP-OES detekcijo. Stolpci predstavljajo delež celotnega aluminija, ki se je ločil na koloni, črta pa predstavlja odziv UV detektorja (relativna absorbanca pri 278 nm). B: SDS-PAGE proteinov po kromatografski ločbi čaja z mlekom. Analizo sem opravil v treh paralelnih določitvah.

Tabela 5: Porazdelitev aluminijevih zvrsti v čaju z mlekom (25 cm³ ekstrakta čaja + 1 cm³ mleka) na VIK koloni z UV in ICP-OES detekcijo. Rezultati podani kot so povprečje treh paralelnih določitev skupaj s standarnim odklonom.

Vzorec	Delež aluminija vezanega na proteine (%)	Delež aluminija, vezanega na NM zvrsti (%)	Delež aluminija, eluiranega s kolone (%)
Golden Nepal (črni čaj)	50 ± 3	39 ± 3	89 ± 4
Kenya gfop Mariny (črni čaj)	69 ± 4	21 ± 2	90 ± 4
Keemun (črni čaj)	58 ± 4	19 ± 2	77 ± 4
Ceylon op1 Kenilworth (črni čaj)	66 ± 4	22 ± 2	88 ± 4
Assam tgfop-1 Dirial (črni čaj)	62 ± 4	16 ± 2	78 ± 4
Yunnan (črni čaj)	69 ± 4	16 ± 2	85 ± 4
China Gunpowder Temple of Heaven (zeleni čaj)	57 ± 3	32 ± 3	89 ± 4
Bancha (zeleni čaj)	40 ± 3	30 ± 3	70 ± 4
Pu-Erh (rdeči čaj)	70 ± 4	9 ± 2	79 ± 4
China Oolong Sechung (rdeči čaj)	48 ± 3	27 ± 2	75 ± 4

Aluminijeve zvrsti v ekstraktu čaja z limono

Limonin sok je precej pogost dodatek zeliščnim, zelenim in tudi ostalim čajem. Vsebuje veliko snovi, ki lahko tvorijo komplekse z aluminijem (npr. organske kisline, flavinoidi). Kljub temu je najverjetneje, da aluminij tvori komplekse s citronsko kislino (zaradi visoke konstante vezave in zaradi visoke koncentracije citronske kisline v limoninem soku ($0,22 \text{ mol dm}^{-3}$). Pretvorbo aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja z limono sem preučeval tako, da sem v 25 cm^3 čaja dodal 1 cm^3 $0,22 \text{ mol dm}^{-3}$ citronske kisline ali 1 cm^3 filtriranega limoninega soka. Ligand, ki je vezal aluminij, sem identificiral z ES-MS-MS. Po dodatku citronske kisline ali limoninega soka se je pH ekstrakta čaja znižal na 3. Pri preliminarnih analizah se je izkazalo, da se rezultati, dobljeni z limoninim sokom in citronsko kislino, niso bistveno razlikovali. Zaradi lažje kontrole pogojev sem nadaljnje analize aluminijevih zvrsti v ekstraktu čaja izvajal z dodatkom citronske kisline. Rezultati meritev so predstavljeni v tabeli 6. Dodatek citronske kisline ni vplival na retencijski volumen aluminijevih zvrsti, ki so se eluirale s kolone v frakciji med $3,5 \text{ cm}^3$ in $4,5 \text{ cm}^3$. Delež negativno nabitega Al-citrata se je povečal le v ekstraktih štirih črnih čajev, pri ostalih pa je ostal enak. Glede na to, da citrat pospešuje absorpcijo aluminija v telo, lahko sklepam, da pitje črnih čajev človeku poveča dostopnost aluminija. Pri ostalih čajih lahko povečana koncentracija citronske kisline v ekstraktu v procesih prebave, ko se razgradijo aluminijevi kompleksi povzroči tvorbo Al-citrata, ki poveča absorpcijo aluminija v telo. Vsekakor pa je ta predvidevanja potrebno potrditi z dodatnimi eksperimenti.

Tabela 6: Porazdelitev aluminijevih zvrsti v čaju in v čaju z dodatkom citronske kisline (25 cm^3 čaja + 1 cm^3 $0,22 \text{ mol dm}^{-3}$ citronske kisline) na anionsko izmenjalni Mono Q FPLC koloni z ICP-OES detekcijo. Rezultati predstavljajo povprečje treh paralelnih določitev s standarnim odklonom

Vzorec	Delež negativno nabitega Al-citrat kompleksa v čaju (%)	Delež negativno nabitega Al-citrat kompleksa v čaju s citrnsko kislino (%)
Golden Nepal (črni čaj)	34 ± 4	29 ± 4
Kenya gfop Mariny (črni čaj)	19 ± 3	20 ± 3
Keemun (črni čaj)	24 ± 3	42 ± 5
Ceylon op1 Kenilworth (črni čaj)	19 ± 3	29 ± 3
Assam tgfop-1 Dirial (črni čaj)	14 ± 2	28 ± 4
Yunnan (črni čaj)	13 ± 2	25 ± 3
China Gunpowder Temple of Heaven (zeleni čaj)	27 ± 3	27 ± 3
Bancha (zeleni čaj)	26 ± 3	25 ± 3
Pu-Erh (rdeči čaj)	10 ± 2	11 ± 2
China Oolong Sechung (rdeči čaj)	20 ± 3	25 ± 3

3. Zaključek

Pri študiju aluminijevih zvrsti v ekstraktih pravih čajev sem preučeval črne, zelene in rdeče čaje. Koncentracije aluminija v ekstraktu čajev so bile med $0,5 \text{ mg dm}^{-3}$ in 4 mg dm^{-3} . S kombinacijo VIK in anionsko izmenjalne FPLC z ICP-OES detekcijo sem ugotovil, da se 10-

35% celotnega aluminija eluira pri retencijskem volumnu, ki je značilen za negativno nabiti kompleks Al-citrata. Preostali aluminij, ki se je močno adsorbiral na nosilce kolon, je najverjetneje vezan na fenolne spojine. ES-MS-MS analize frakcij, ki so vsebovale aluminij in so se eluirale s FPLC kolone, so potrdile prisotnost citrata. Dokazal sem, da VIK kolona ni dovolj selektivna, saj sem na osnovi retencijskega volumna eluiranih aluminijevih zvrsti v ekstraktih čajev določil mase med 4,6 kDa in 2,1 kDa, vendar se je pri istem retencijskem volumnu eluiral tudi Al-citrat. Tako lahko zaključim, da so tudi podatki iz literature, kjer so drugi raziskovalci na VIK kolonah določili podobne molekulske mase aluminijevih zvrsti v čajih, vprašljivi. Dodatek mleka v ekstrakt čajev je spremenil porazdelitev aluminijevih zvrsti. Rezultati na osnovi VIK z ICP-OES in UV detekcijo so pokazali, da je 40-70 % aluminija okludiranega v mlečne proteine, medtem ko se množina Al-citrata ni spremenila. SDS-PAGE proteinske frakcije, ki je vsebovala aluminij in se je eluirala z VIK kolone, je pokazala, da je aluminij najverjetneje vezan na mlečne kazeine (25 kDa do 35 kDa). Dodatek limone v ekstrakte čajev in analiza z anionsko izmenjalno FPLC-ICP-OES in ES-MS-MS je pokazala, da ostane delež negativno nabitega Al-citrata enak pri zelenih in rdečih čajih, pri ekstraktih črnih čajev pa se poveča. Te ugotovitve kažejo, da se biološka dostopnost aluminija v ekstraktih čajev lahko poveča, ko pijemo čaj z mlekom, in tudi, ko pijemo čaj z limono. Da bi potrdili ta predvidevanja, pa so vsekakor potrebne nadaljnje raziskave.

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

2. Analizne metode

2.4. Primerjava ekstrakcijskih metod za določanje organokositrovih spojin v sedimentih in školjkah v morskem okolju

Tadeja Milivojevič Nemanič

Institutski mentor: Janez Ščančar

Fakultetna mentorica: Radmila Milačič, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Univerze v Ljubljani

Fakultetna komentorica: Lucija Zupančič Kralj, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Univerze v Ljubljani

Organokositrove spojine (OKS) spadajo med ene najbolj strupenih antropogenih snovi, vnesenih v okolje. Njihova uporaba je začela naraščati po letu 1950, ko so spoznali fungicidne in biocidne lastnosti trisubstituiranih OKS.

Za določanje OKS se najpogosteje uporablja plinska kromatografija, saj omogoča odlično ločbo z uporabo različnih selektivnih detektorjev. V analizi OKS sta najbolj kritična koraka ekstrakcija in derivatizacija.

V delu predstavljam primerjavo različnih ekstrakcijskih postopkov za določanje OKS v morskih sedimentih in školjkah, ki jim je sledila derivatizacija z natrijevim tetraetil boratom (NaBEt_4) in ločba ter detekcija s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo (GC-MSD). Primerjali in optimizirali smo različna topila (ocetno kislino, metanol, HCl v metanolu, tetrametil amonijev hidroksid (TMAH)), načine ekstrakcije (mehansko stresanje ter ultrazvočno in mikrovalovno ekstrakcijo), čas in temperaturo ekstrakcije.

Predstavljeni so tudi rezultati monitoringa OKS v slovenskem delu Jadranskega morja v času od leta 2000–2005.

Ključne besede: organokositrove spojine; ekstrakcijski postopki; GC-MSD, monitoring

1st MR O-2, April 19, 2006

2. Analytical methods

2.4. Comparison of various extraction methods for the determination of organotin compounds in sediments and mussels from the marine environment

Tadeja Milivojevič Nemanič

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Janez Ščančar

Supervisor at the university: Radmila Milačić, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Co-Supervisor at the university: Lucija Župančič Kralj, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana

Organotin (OT) compounds are some of the most toxic substances that were over anthropogenically introduced into the environment. Their widespread use started after 1950 when the fungicidal and biocidal activity of triorganotins was recognized.

Gas chromatography in combination with various selective detectors is commonly used for the determination of OTs. The most critical steps in the analytical procedure are extraction and derivatization.

The aim of our work was to compare different extraction procedures for the determination of OTs in sediment and mussels from the marine environment. Certified reference material PACS-2 was extracted under different conditions, derivatised with sodium tetraethyl borate and extracted into iso-octane. Ethylated species were determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Three extraction solvents (acetic acid, a mixture of acetic acid with methanol and mixture of acetic acid, methanol and water) and three extraction procedures (mechanical shaking, sonification and microwave-assisted extraction) were critically evaluated.

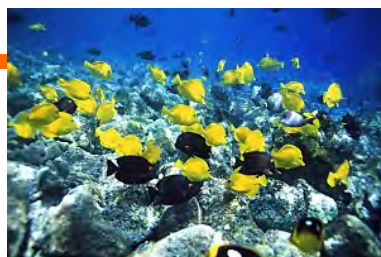
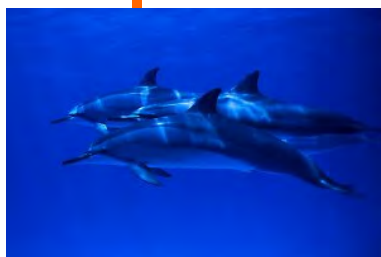
In the present work also results from 5 years (2000-2005) OT monitoring of the Slovenian part of the Adriatic sea are reported.

Keywords: organotin compounds, extraction procedures, GC-MSD, monitoring



Primerjava ekstrakcijskih metod za določanje organokositrovih spojin v sedimentih in školjkah v morskem okolju

Tadeja Milivojevič Nemanič
Janez Ščančar, Radmila Milačič
Institute Jožef Stefan
Odsek za znanosti o okolju,



02

1



Pregled

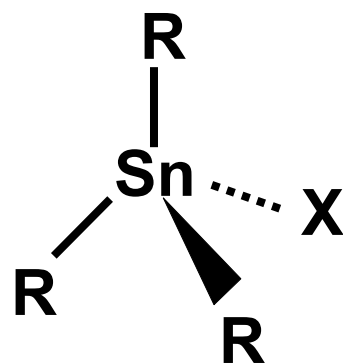
- Splošno o organokositrovih spojinah (OKS)
- Strupenost OKS in razgradnji procesi
- Predstavitev dosedanjega dela
- Analizni postopek
- Ekstrakcijska shema
- 5-letni monitoring
- Nadaljnje delo



Splošno o organokositrovih spojinah (OKS)

- Organokovinske spojine

- Struktura:



R :alkilna (*Me, Bu, Oc,...*)
ali arilna skupina (*Ph*)

X : anionska skupina (*Cl, F, O, OH, Ac, ...*)

- Razvoj:

- sintetizirane 1852
- proizvodnja po 1950
 - odkritje biocidnih in fungicidnih lastnosti

<i>Kratica</i>	<i>Spojina</i>
TBT	tributil kositer
DBT	dibutil kositer
MBT	monobutil kositer
TPhT	trifenil kositer
DPhT	difenil kositer
MPhT	monofenil kositer
TOcT	trioktil kositer
DOcT	dioktil kositer
MOcT	monooktil kositer
TPrT	tripropil kositer



Proizvodnja in poraba OTC

<i>Uporaba v industriji</i>	<i>Funkcija</i>	<i>OTC</i>	*
<i>PVC stabilizatorji</i>	Stabilizator proti svetlobnem in toplotnem razpadu	R_2SnX_2 , R_2SnX_3 R= Me, Bu, Oc	
<i>Zaščitni premazi za ladje</i>	Biocid	R_3SnX R= Bu, Ph	
<i>Agrokemikalije</i>	Fungicid, insekticid, sredstvo proti pršicam, sredstvo proti gorenju	R_3SnX R= Bu, Ph, Cy	

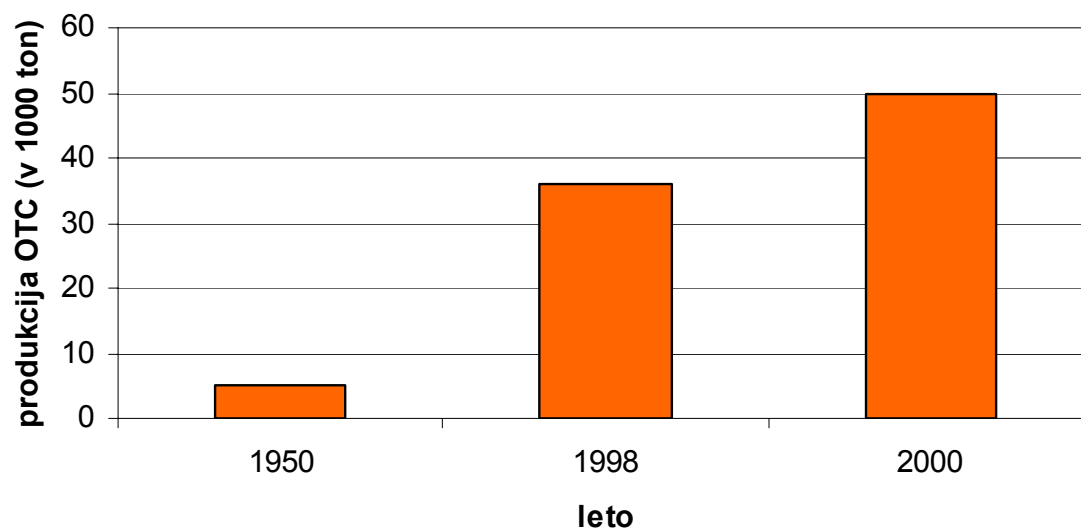
Zaščita lesa

Sredstva za obdelavo stekla

Zaščita materialov (kamen, usnje, papir)

Impregnacija tekstila

Vzreja perutnine

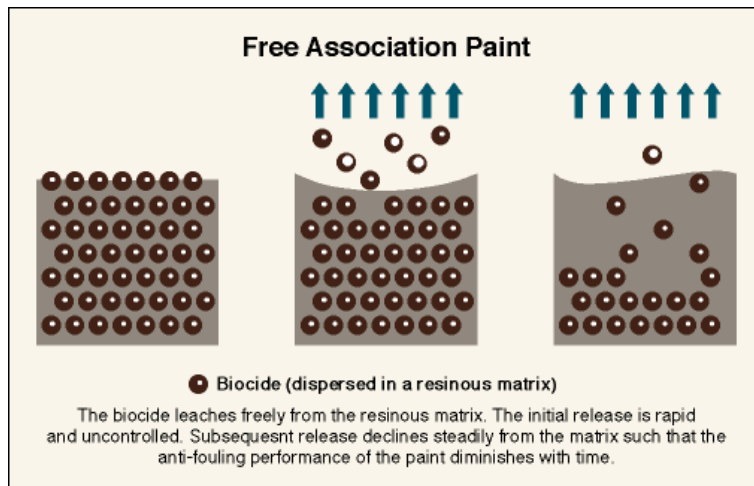


* Ref.: Hoch, M., Applied Geochemistry, 16, 2001, 719-743

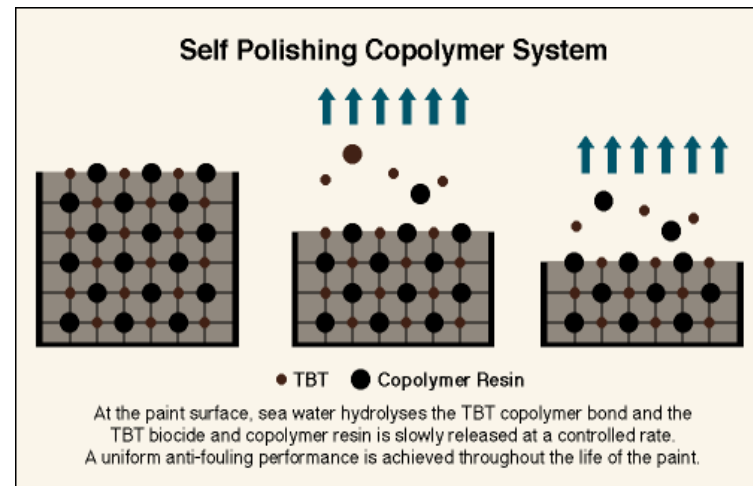


Zaščitni premazi

- "Free associated paint" (~2 leti)



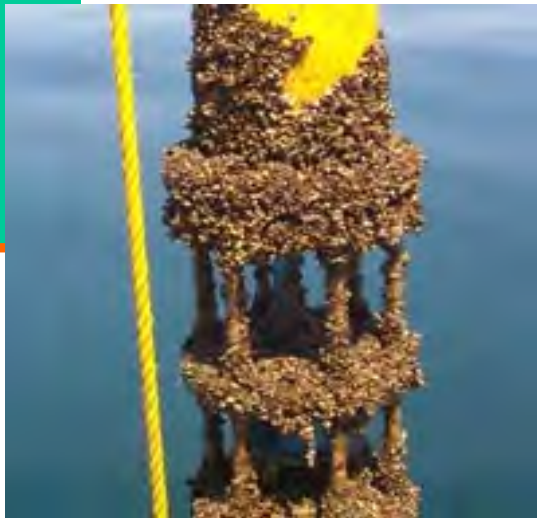
- "Self polishing copolymer system" (~ 5 let)



- Zakaj so tako pomembni?
 - prihranki pri gorivu
 - daljše obdobje razpoložljivosti plovil



Zaščitni premazi





Zaščitni premazi





Strupenost TBT

Koncentracija v
morski vodi



Strupeni vplivi

- 1 ng TBT /L
- 10 ng TBT /L
- 100 ng TBT /L

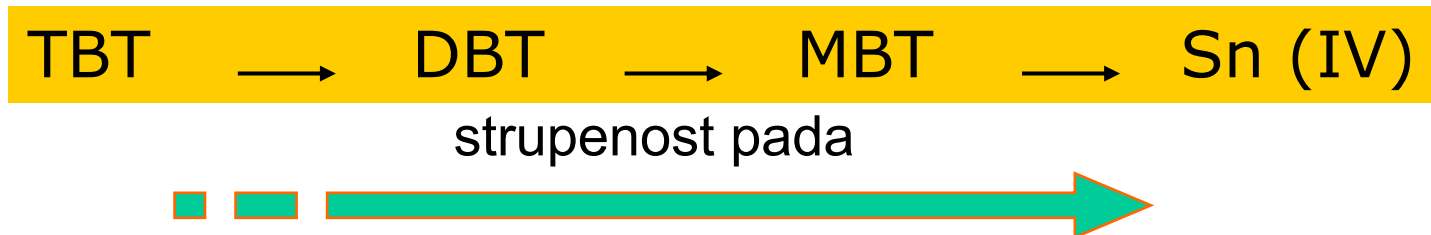
- Imposeks pri morskih polžih
- Zmanjšana rast in anomalije pri školjkah
- Zmanjšana rast rib

OKS v morskih sesalcih in vodnih pticah



Razgradnji procesi TBT

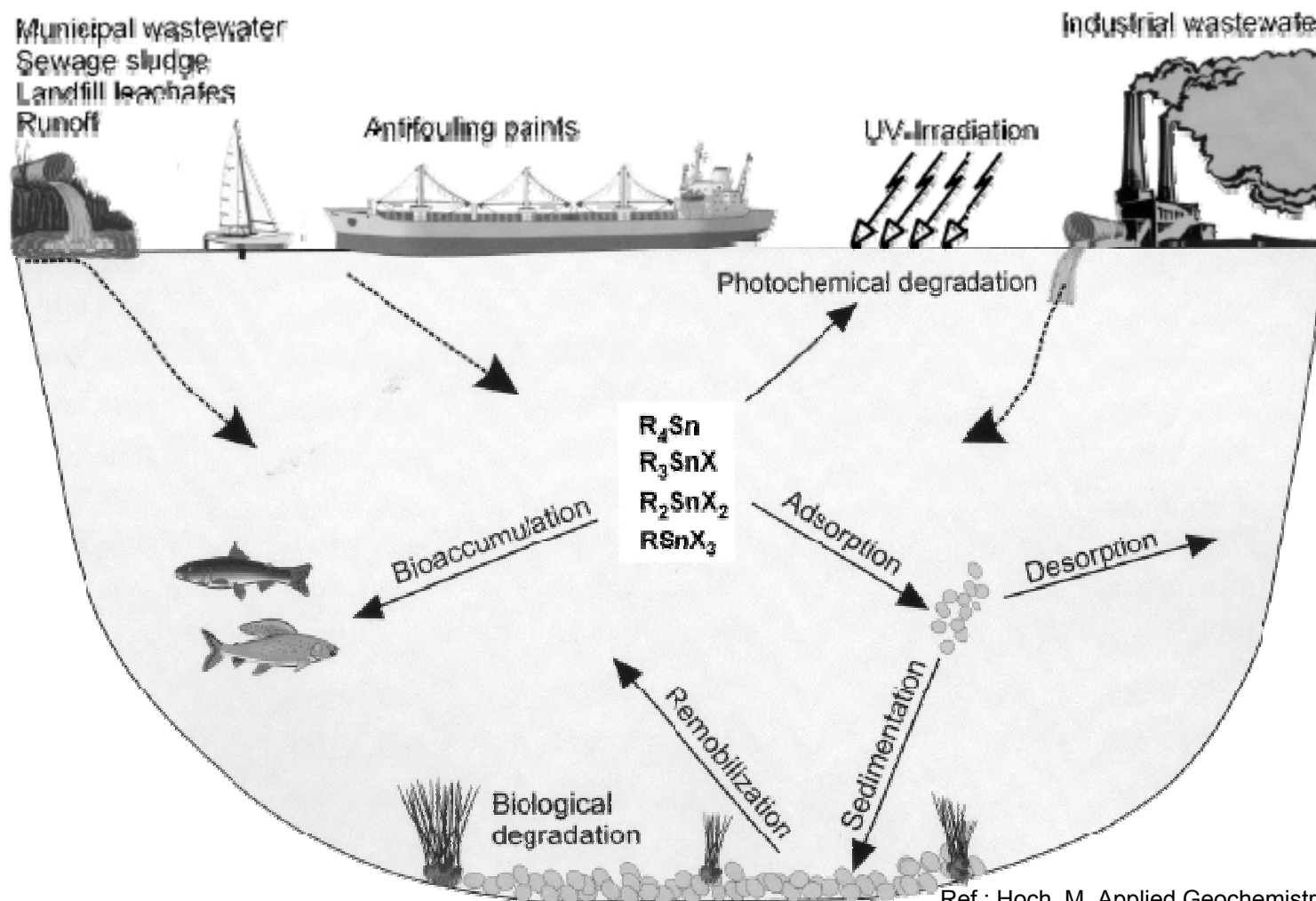
- Mikrobiološka in UV razgradnja:



- Elementaren Sn in njegovi anorganski produkti so praktično nestrupeni
- Razpolovna doba OTC:
 - v vodi reda velikosti nekaj tednov
 - v sedimentih reda velikosti nekaj let



Kroženje OTC v morskem okolju



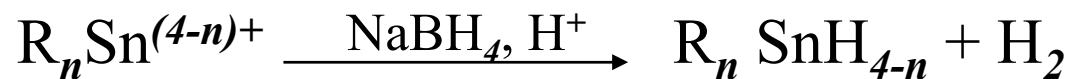


Priprava vzorca in detekcija

- Ekstrakcija

- Derivatizacija:

- NaBH₄



- NaBEt₄



- Grignard



- Separacija:

- GC

- HPLC

- Selektivna detekcija:

- MSD, AAS, FID, ICP-MS, FPD, PFPD

R, R' - alkilna skupina
n = 1-3
X - halogen



Predstavitev dosedanjega dela

- Derivatizacija:
 - Grignarjev reagent (PeMgBr)
 - NaBEt₄
- Separacija in analiza:
 - GC-MS
 - GC-PFPD
- Monitoring (2000-2005):
 - Vode
 - Sedimenti
 - Školjke



Primerjava Grignarda in NaBEt₄

Ekstrakcija

- ca. 0.5 g vzorca
- + 0.05 % raztopina tropolona v MeOH
- + konc. HCl
- LLE z **DCM** v razt. NaCl

Menjava topila

- + 1-2 ml izooktan
- izganjanje DCM s tokom N₂

Derivatization

- + 1 ml PeMgBr, UZ
- + 1 M H₂SO₄
- LLE s heksanom

Čiščenje

- koncentriranj s tokom N₂
- čiščenje s heksan:benzen 1:1
- koncentriranj s tokom N₂

Ločba in detekcija

- GC-MS/SIM

Ekstrakcija

- ca. 0.5 g vzorca l
- LLE z 10 ml topilal

Derivatization in ekstrakcija

- 1-2 ml ekstrakta
- + 100 mL acetatnega pufra (pH=4.8±0.2)
- + 0.5 mL NaBEt₄ (2%)
- LLE v isooktan

Ločba in detekcija

- GC-MS/SIM

	Konc. v školjkah, ng/g s.s.		
	TBT	DBT	MBT
Grignard	519	174	44
NaBEt ₄	442	113	56



Ločba in detekcija

Izopotska sestava Sn

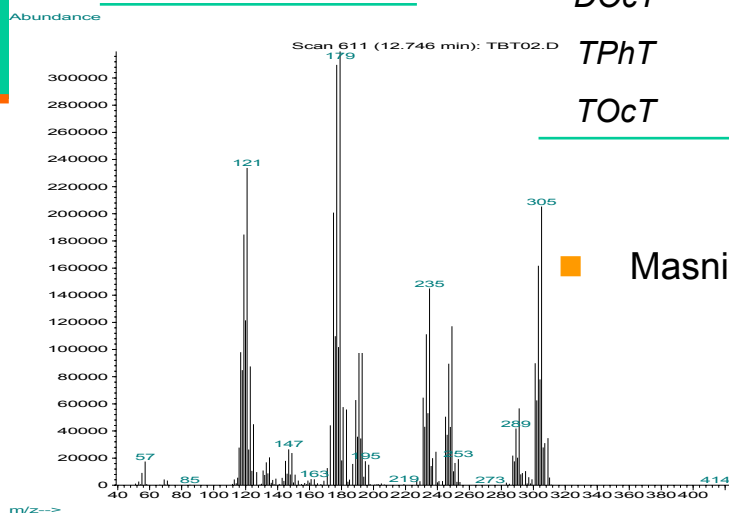
Masno število	Delež (%)
116	14,31
117	7,61
118	24,03
119	8,58
120	32,85
122	4,72
124	5,94

Retenzijski časi in karakteristični ioni

Spojina	$t_{ret.}$ min	m/z
MBT	5,2	231, 233, 235
TPrT	6,0	249, 251, 253
DBT	7,1	259, 261, 263
MPhT	8,3	251, 253, 255
TBT	9,0	287, 289, 291
MOcT	10,3	287, 289, 291
DPhT	13,6	299, 301, 303
DOcT	15,1	371, 373, 375
TPhT	16,5	347, 349, 351
TOcT	18,2	371, 373, 375

Pogoji snemanja

način injiciranja	"splitless"
nosilni plin	helij
pretočna hitrost nosilnega plina	1,2 ml/min
temperatura injektorja	260°C
temperatura vmesnika	280°C
način ionizacije	ionizacija z elektroni (EI)
energija ionizacije	70 eV
napetost detektorja	1,4 kV
temperatura vira	150°C



Masni spekter TBT



Ekstrakcijska shema

optimizacija topila, načina ekstrakcije, časa in temperature

<i>Sedimenti - topilo</i>	<i>Školjke - topilo</i>	<i>Oznaka ekstrakcije</i>	<i>Ekstrakcija</i>
100 % očetna kislina	HCl v MeOH (0,1; 0,5; 1 M)	<i>M</i>	Ekstrakcija s stresanjem
očetna kislina: metanol = 3: 1	AcOH v MeOH (0,5; 5; 13 M)	<i>UZ</i>	Ultrazvočna ekstrakcije
očetna kislina: metanol: voda = 1: 1: 1	TMAH (25 % vodna razt.)	<i>MW</i>	Ekstrakcija s pomočjo mikrovalov

<i>PACS-2</i>	<i>Cert.vred., ng/g</i>
<i>MBT</i>	600*
<i>DBT</i>	1047±64
<i>TBT</i>	890±105

<i>CRM 477</i>	<i>Cert.vred., ng/g</i>
<i>MBT</i>	1012±189
<i>DBT</i>	785±61
<i>TBT</i>	900±78

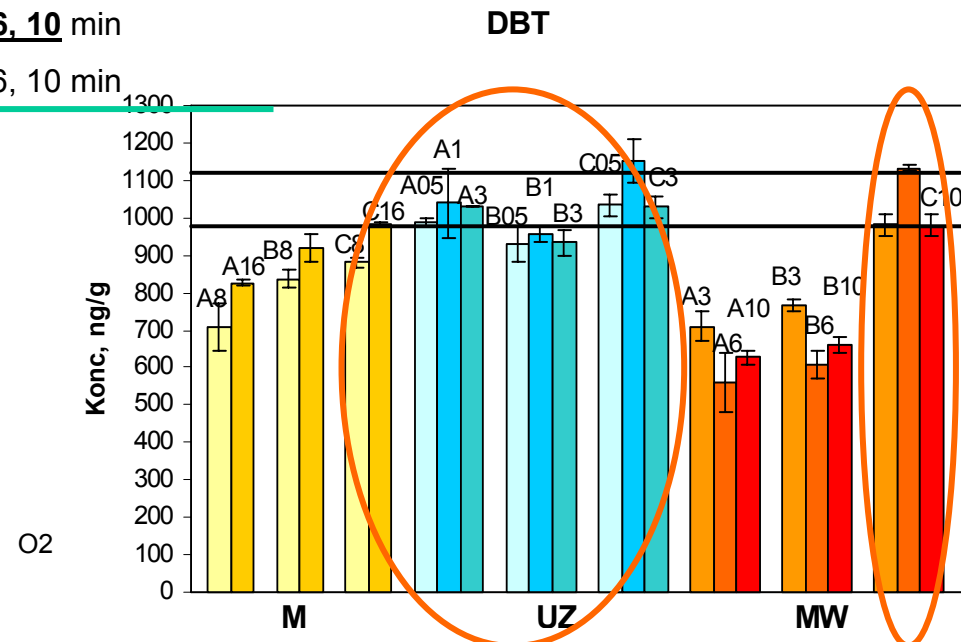


Ekstrakcijska shema - sedimenti

Ekstrakcija	Topilo	Čas ekstrakcije	
M 20°C,	100% AcOH (A)	<u>8</u> , 16 ur	X neustrezni izkoristki
	AcOH:MeOH = 3:1 (B)	8, 16 ur	
	AcOH:MeOH:H ₂ O = 1:1:1(C)	8, 16 ur	
UZ 50 °C	100% AcOH (A)	0.5, <u>1</u> , 3 ure	
	AcOH:MeOH = 3:1 (B)	0.5, 1, 3 ure	
	AcOH:MeOH:H ₂ O = 1:1:1(C)	0.5, 1, 3 ure	
MW 50°C	100% AcOH (A)	<u>3, 6, 10</u> min	
	AcOH:MeOH = 3:1 (B)	<u>3, 6, 10</u> min	
	AcOH:MeOH:H ₂ O = 1:1:1(C)	3, 6, 10 min	

UZ, 1 ura, 50°C; 100 % AcOH

	Izkoristek, %
MBT	100
DBT	94
TBT	101





Izkoristki ekstrakcij školjk (%)

	<i>UZ</i>	<i>M</i>	<i>MW</i>
	1 ura, 50°C: <u>0.1</u> , <u>0.5</u> , 1M	0,1 M: 8, <u>16</u> ur	0.1M, 50°C: 3, 10 min
<i>HCl</i>	0.5 M, 50°C: <u>0.5</u> , <u>1</u> , <u>3</u> , 6 ur 0.5 M, 1 ura: 25, <u>50</u> , <u>70</u> °C	0,5 M: 8, 16 ur	0.1 M 90°C: 3, 10 min
<i>AcOH</i>	1 ura, 50°C: 0.5, <u>5</u> , <u>13</u> M	8, 16 ur	50°C: <u>3</u> , 10 min 90°C: 3, 10 min
<i>TMAH</i>	1 ura, 50°C	8, 16 ur	50°C: 3, 10 min 90°C: 3, 10 min

X ustrezní izkoristki

UZ, 1 ura, 50°C; 0.1 M HCl v MeOH

	Izkoristek, %
MBT	88
DBT	100
TBT	93



Zaključki

- Možnost uporabe vseh metod: M, UZ, MW
- Možnost uporabe vseh topil in vseh ekstrakcijskih tehnik
- Najoptimalnejša metoda:
 - ultrazvočna ekstrakcija

Monitoring

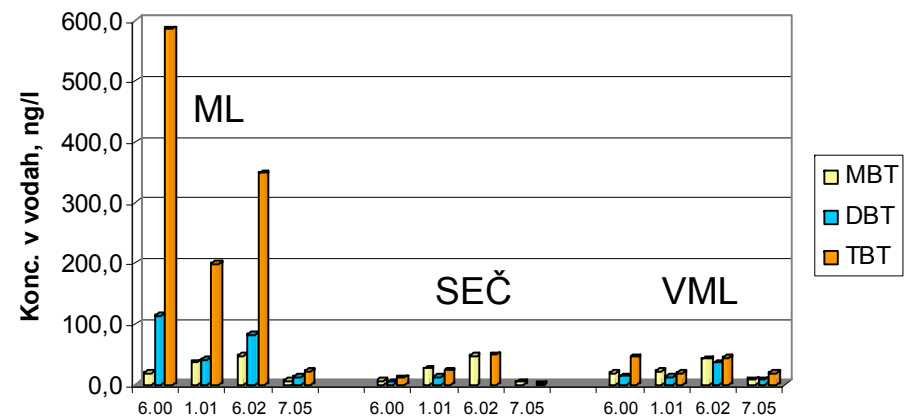
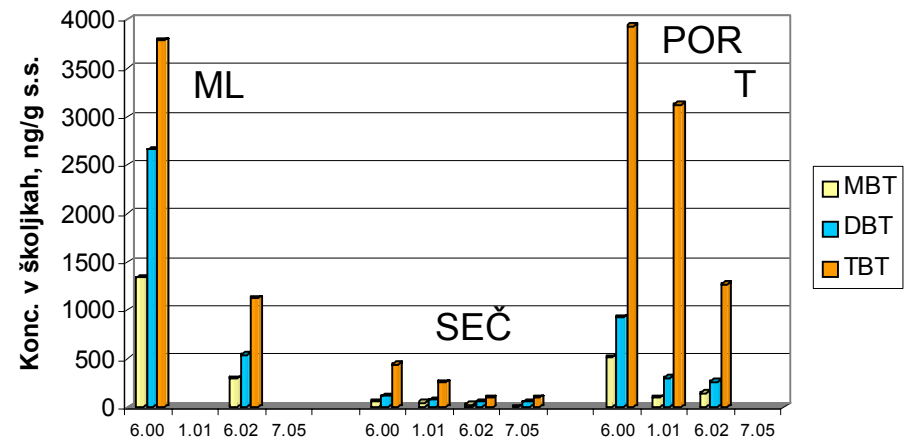
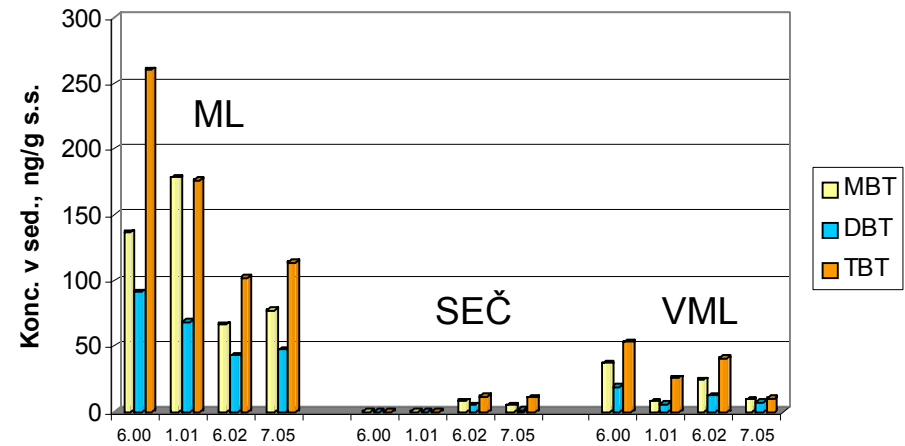
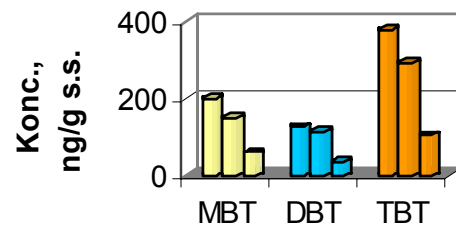
- Piranski zaliv
 - 2000-2005
 - sedimenti, školjke, vode
 - 8 točk





Monitoring

- Onesnaženje z OKS se je zmanjšalo
- Do vnosa OKS prihaja v marini
- PhT in OcT so pod ali tik nad mejo detekcije
- Težava v marini: točkasto onesnaženje





Nadaljnje delo

- Vpeljava metode izotopskega razredčenja za OKS



Hvala



za pozornost!





Problemi /alternative?!?

- ni dovolj učinkovitih alternativnih produktov
- nekontroliran "fouling" vodi v korozijo in s tem zmanjšano varnost
- manjši interval med barvanji – večji stroški
- nepoznano okoljsko tveganje zaradi uporabe alternativnih premazov
- zvišanje toplogrednih vplivov: emisija CO₂ bi se zvečala za 0,03% *

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

2. Analizne metode

2.5. Uporaba matričnih modifikatorjev za določanje Cd, Pb in As v sedimentih z elektrotermično atomsko absorpcijsko spektrometrijo

Simona Murko

Institutski mentor: Janez Ščančar

Fakultetni mentor: Janez Ščančar, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana

Optimizirali smo parametre za določanje kadmija, svinca in arzena v vzorcih sedimentov z ETAAS z Zeemanovo korekcijo ozadja. Uporabili smo zaprt mikrovalovni razkroj in mešanico kislin HNO₃, HCl in HF. Fluoride smo kompleksirali s H₃BO₃. H₃BO₃ je povzročila povečano hlapnost kadmija, svinca in arzena, kloridi v vzorcu pa so prispevali k visokemu ozadju, ki ga ni bilo možno kompenzirati z Zeemanovo korekcijo ozadja. Za točno in ponovljivo merjenje kadmija, svinca in arzena smo preverili uporabnost različnih matričnih modifikatorjev in optimizirali parametre elektrotermičnega temperaturnega programa. Uporabili smo dušikovo kislino (1:3), paladijev nitrat ter mešanico paladijevega in magnezijevega nitrata. Optimizacijo postopka za vsak posamezen element smo opravili v mešanici kislin, ki smo jo uporabili pri mikrovalovnem razkroju in pri analizi certificiranih referenčnih materialov vzorcev sedimentov. Najprimernejši matrični modifikator za določanje kadmija in svinca v sedimentih je bila dušikova kislina (1:3). Z znižanjem ozadja, ki je posledica kemijske pretvorbe kloridov v nitrate, je omogočila točne in zanesljive določitve obeh elementov pri temperaturi sežiga 300 oziroma 400 °C. Uporaba mešanice paladijevega in magnezijevega nitrata je omogočila učinkovit sežig matrice vzorca pri 1300 °C pri določanju arzena v sedimentih. Optimizirane analizne postopke smo uporabili za določanje vsebnosti kadmija, svinca in arzena v sedimentih reke Save. Rezultati kažejo, da v analiziranih vzorcih sedimentov ni bistveno povišanih koncentracij omenjenih elementov.

Ključne besede: kadmij, svinec, arzen, sedimenti, zaprt mikrovalovni razkroj vzorcev, ETAAS, matrični modifikatorji

1st MR O-2, April 19, 2006

2. Analytical methods

2.5. Use of various matrix modifiers for the determination of Cd, Pb and As by ETAAS in sediments

Simona Murko

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Janez Ščančar

Supervisor at the university: Janez Ščančar, Jožef Stefan International Postgraduate School

Parameters for the determination of cadmium, lead and arsenic in sediments by ETAAS with Zeeman background correction were optimised. Closed vessel microwave assisted digestion was applied for decomposition of samples, using a mixture of HNO₃, HCl and HF acids. H₃BO₃ was added to complex fluoride ions. H₃BO₃ increased the volatility of cadmium, lead and arsenic, while chlorides present in the samples contributed to the high background signal. Therefore, it was not possible to compensate the background by Zeeman correction. The applicability of various matrix modifiers for accurate and reproducible determination of cadmium, lead and arsenic was evaluated. For this purpose the parameters of the electrothermal temperature programme were optimised. The following matrix modifiers were investigated: nitric acid (1:3), palladium nitrate and a mixture of palladium and magnesium nitrate. The optimisation procedure was performed for each particular element in the mixture of acids applied in the digestion of samples, and by the analysis of certified sediment reference materials. Nitric acid (1:3) was found to be the most appropriate matrix modifier for the determination of cadmium and lead in sediments. By reducing the background, as a consequence of chemical transformation of chlorides to nitrates, accurate and reliable determination of cadmium and lead was possible at ashing temperatures of 300 and 400 °C, respectively. The use of a mixture of palladium and magnesium nitrate enabled the efficient ashing of the sample matrix at 1300 °C and accurate and reliable determination of arsenic in sediments. The optimised analytical procedures were successfully applied in the determination of cadmium, lead and arsenic in sediments of the River Sava. Results indicate that the sediment samples analysed did not contain elevated concentrations of the measured elements.

Keywords: cadmium, lead, arsenic, sediments, closed vessel microwave assisted digestion, ETAAS, matrix modifiers

UPORABA MATRIČNIH MODIFIKATORJEV ZA DOLOČANJE Cd, Pb IN As V SEDIMENTIH Z ELEKTROTERMIČNO ATOMSKO ABSORPCIJSKO SPEKTROMETRIJO

Simona Murko

Namen dela je bila optimizacija parametrov za določanje kadmija, svınca in arzena v vzorcih sedimentov z ETAAS. Posebno pozornost smo posvetili optimizaciji temperature sežiga vzorca. Vzorce smo pripravili z mikrovalovnim razkrojem. Pri tem smo uporabili mešanico kislin HNO_3 , HCl in HF . Dodatek H_3BO_3 v drugem delu mikrovalovnega razkroja smo uporabili za pretvorbo fluoridov v topne komplekse z borno kislino (HBF_4). Uporabnost različnih matričnih modifikatorjev (dušikova kislina, redčena z vodo v razmerju 1:3, paladijev nitrat ter mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata) za določanje koncentracij posameznega elementa smo preverjali z analizo certificiranih referenčnih materialov sedimentov. Optimizirane analizne postopke smo uporabili za določanje vsebnosti kadmija, svınca in arzena v vzorcih sedimentov reke Save.

Kadmij, svinec in arzen so kemijski elementi, ki so za žive organizme lahko toksični že pri nizkih koncentracijah. Običajno so v zemeljski skorji prisotni v sledovih. Njihov glavni antropogeni vir so različne vrste industrij in rudarstvo. Kadmij in svinec spadata v skupino kovin medtem ko je arzen polkovina.

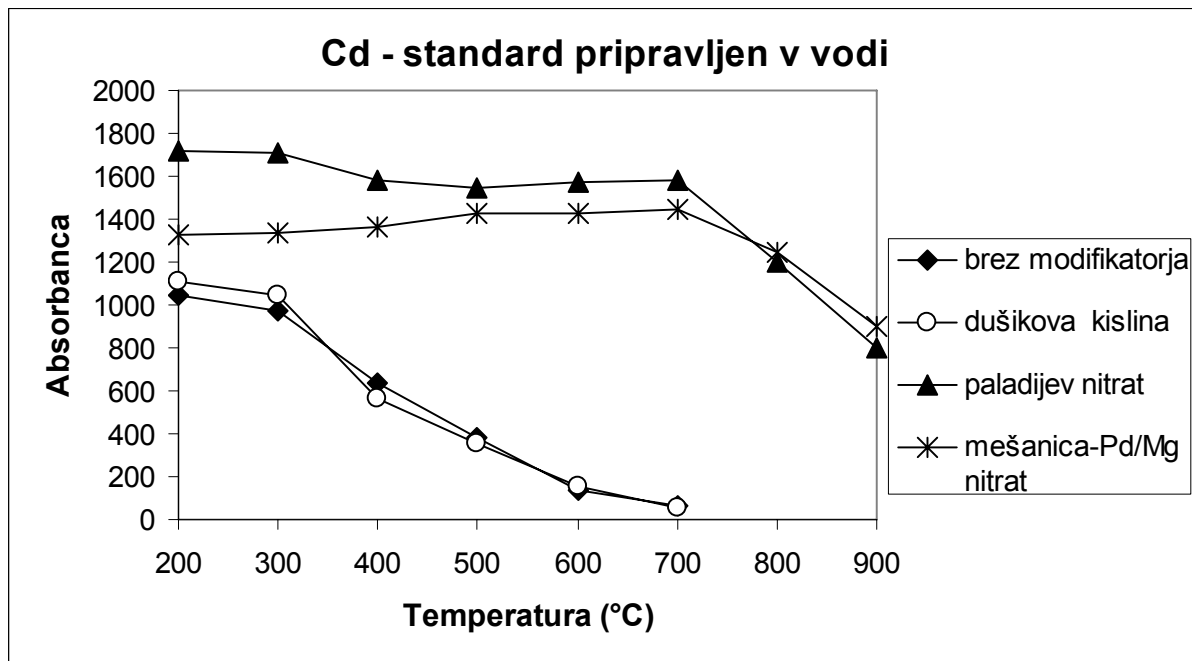
Zakonodaja o dovoljenih koncentracijah elementov v sledovih v vzorcih sedimentov ne obstaja. Na voljo imamo številna vodila, ki podajajo nivoje njihovih koncentracij v sedimentih z vidika toksičnih učinkov. Uporabili smo vodilo ameriške agencije za varovanje okolja.

Pri ETAAS je uporaba matričnih modifikatorjev pomemben del analiznega postopka. V literaturi se največkrat omenja uporaba amonijevega fosfata, magnezijevega nitrata in soli paladija, niklja in bakra. Glavna naloga modifikatorjev je stabilizacija relativno hlapnih elementov, tako da so možne visoke temperature sežiga, ki sestavine matrice učinkovito pretvorijo v hlapno obliko še pred fazo atomizacije. Modifikatorji omogočajo dvig temperature sežiga, ne da bi pri tem prišlo do izgube prostih atomov merjenega elementa. Visoka temperatura sežiga učinkovito zmanjša interference matrice vzorca, kar posledično vodi do znižanja ozadja.

Optimizacija temperature sežiga

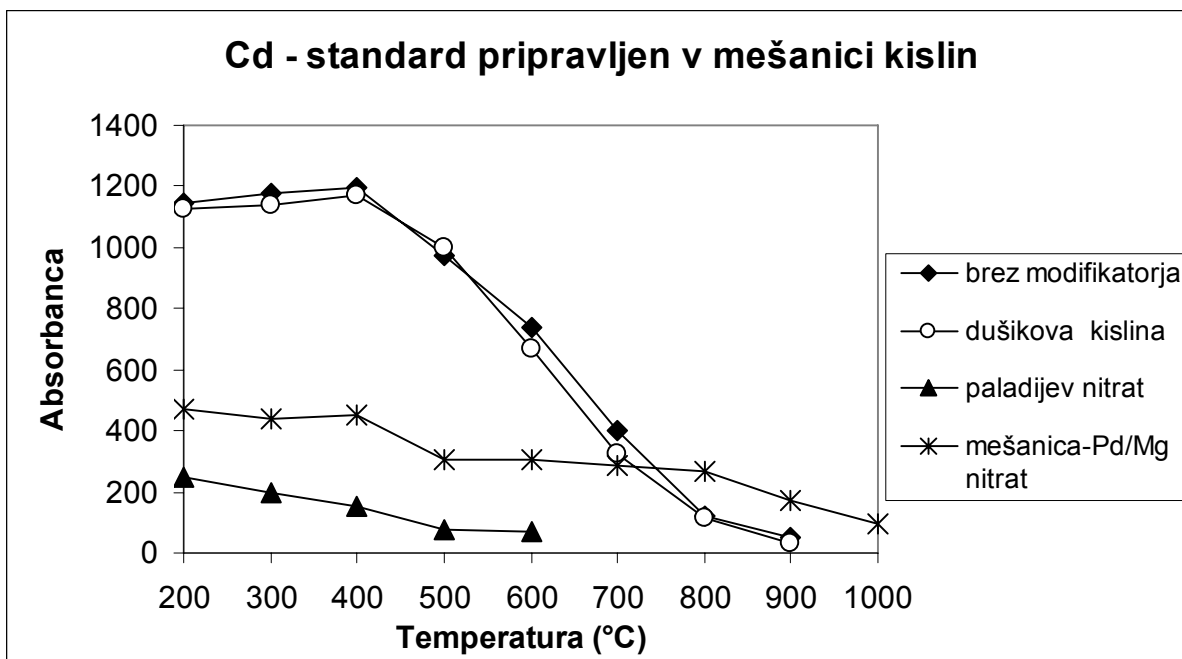
Vzorci smo mikrovalovno razkrojili v mešanici kislin (HNO_3 , HCl , HF in H_3BO_3). S postopnim dvigom temperature smo določili najvišjo temperaturo sežiga za posamezen element. Optimizacijo smo pričeli brez uporabe modifikatorja, nato pa so se modifikatorji vrstili vedno po enakem vrstnem redu; dušikova kislina (1:3 redčena z vodo) → paladijev nitrat → mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata.

Rezultate postopka optimizacije faze sežiga za kadmij, svinec in arzen pa prikazujejo grafi 1 do 6.



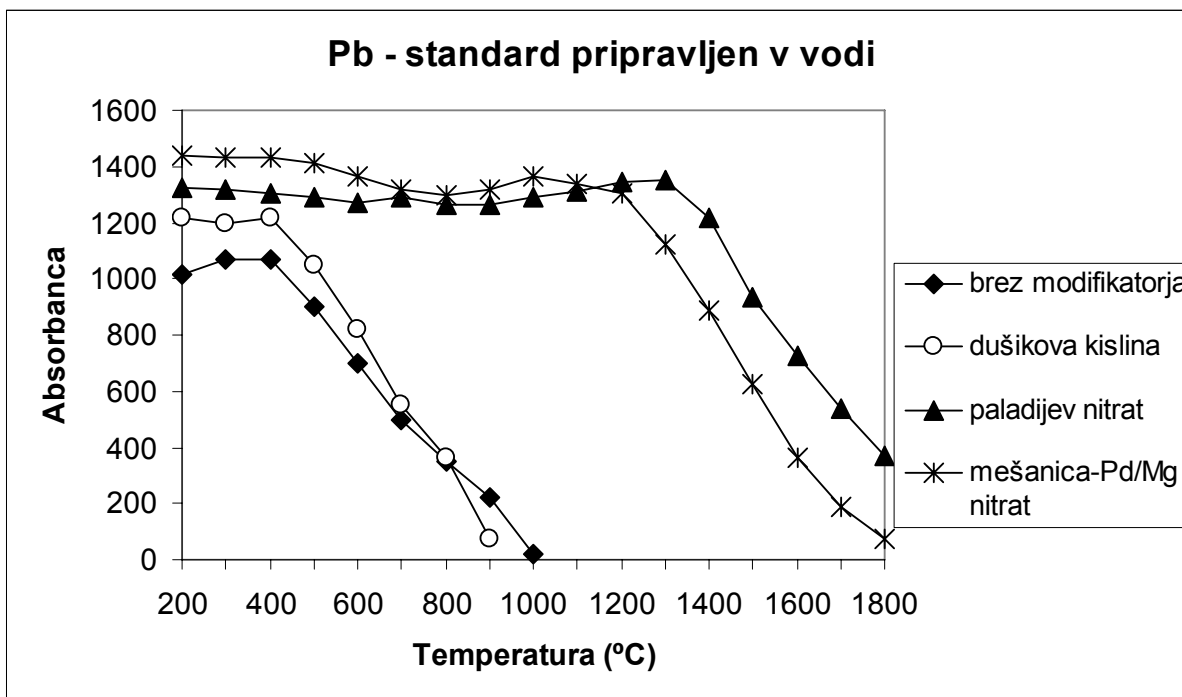
Graf 1: Optimizacija faze sežiga za vodno standardno raztopino kadmija (2,5 ng cm⁻³).

Iz grafa 1 je razvidno, da se standardna raztopina kadmija, pripravljena v vodi, obnaša podobno, če ne uporabimo modifikatorja ali če je kot matrični modifikator uporabljena dušikova kislina (1:3). Pri temperaturi višji od 300 °C pride do izgub prostih kadmijevih atomov. Paladijev nitrat ter mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata se obnašata podobno. V obeh primerih dodatek modifikatorja dovoljuje dvig temperature brez izgub prostih kadmijevih atomov do 700 °C.



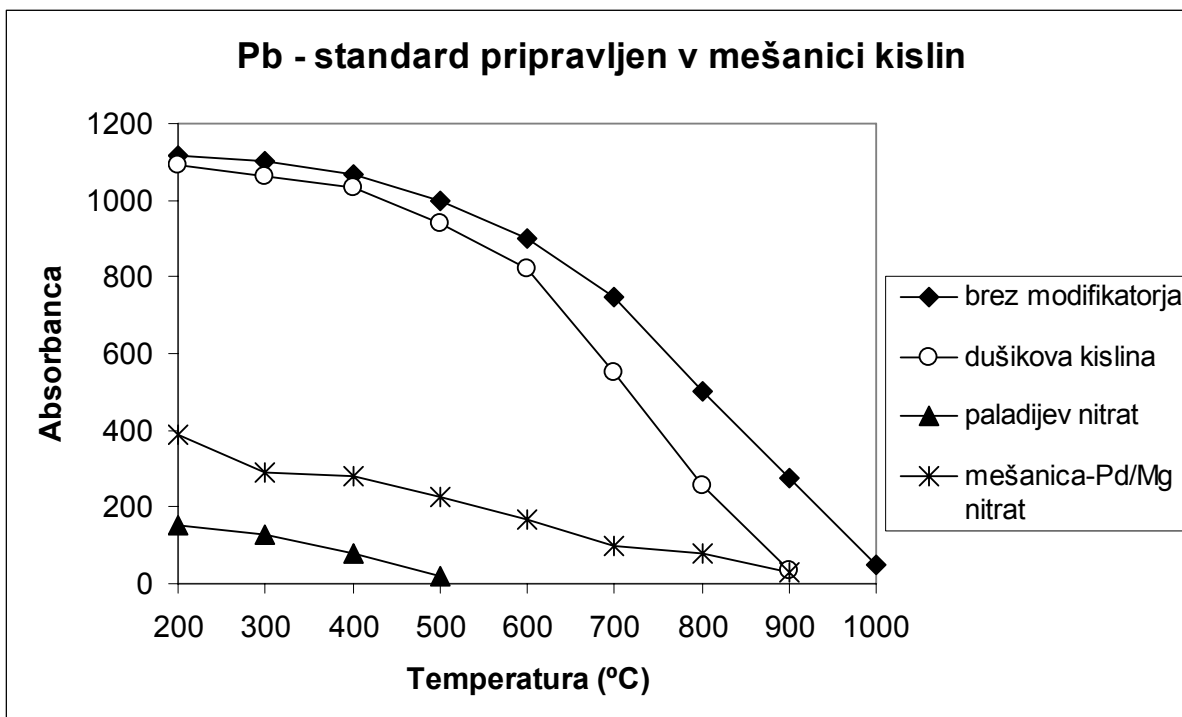
Graf 2: Optimizacija faze sežiga za standardno raztopino kadmija ($2,5 \text{ ng cm}^{-3}$), pripravljena v mešanici kislin, ki smo jih uporabili za razkroj vzorcev.

Rezultati, ki jih prikazuje graf 2 kažejo, da se standardna raztopina kadmija, pripravljena z mikrovalovnim razkrojem v mešanici kislin, obnaša podobno, če kot matrični modifikator uporabimo dušikovo kislino (1:3) ali če modifikatorja ne uporabimo. Pri temperaturi višji od $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pride do izgub prostih kadmijevih atomov. Prednost uporabljenega modifikatorja je v tem, da nekoliko zniža signal ozadja hkrati pa omogoči točno in ponovljivo merjenje koncentracij kadmija v mešanici kislin. Dodatek paladijevega nitrata ter mešanice paladijevega in magnezijevega nitrata vodi do velikih izgub prostih kadmijevih atomov. Omenjeni učinek je z višanjem temperature izrazitejši.



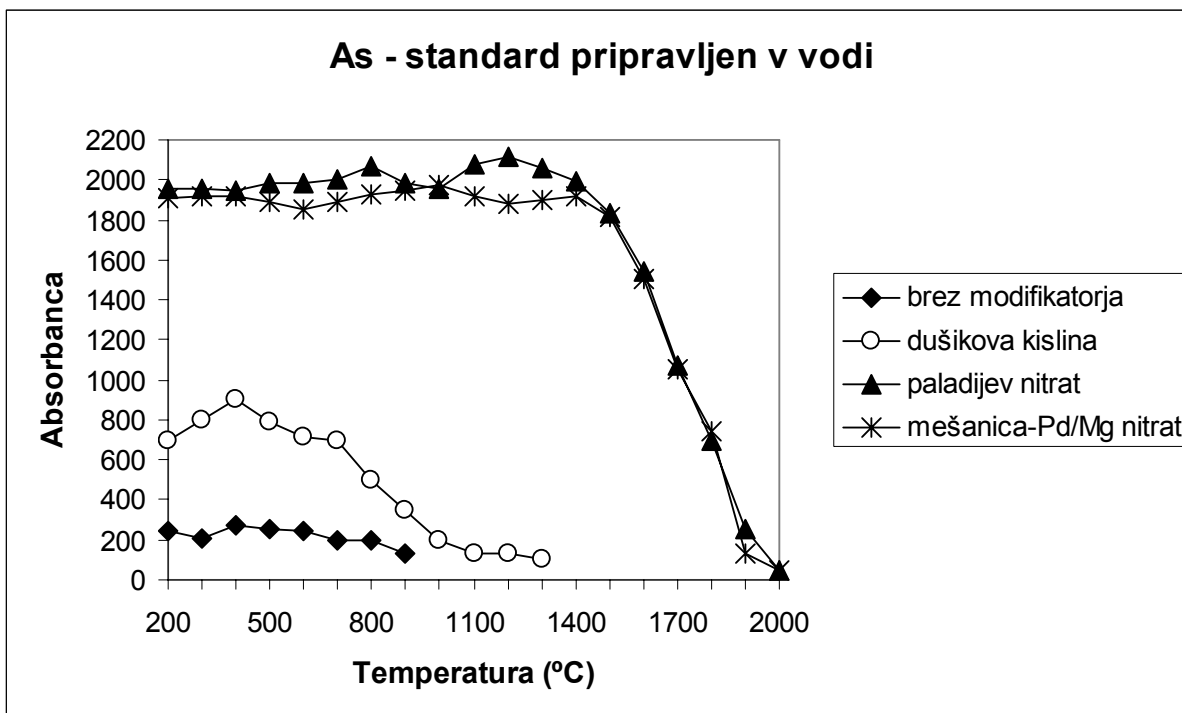
Graf 3: Optimizacija faze sežiga za vodno standardno raztopino svinca (40 ng cm^{-3}).

Podatki, ki jih prikazuje graf 3 kažejo, da se standardna raztopina svinca pripravljena v vodi obnaša podobno, če ne uporabimo modifikatorja ali če uporabimo dušikovo kislino (1:3). Pri temperaturi višji od $400 \text{ }^\circ\text{C}$ pride do izgub prostih svinčevih atomov. Paladijev nitrat ter mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata se obnašata podobno. Dodatek modifikatorja dovoljuje dvig temperature brez izgub prostih svinčevih atomov do $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ v primeru mešanice in do $1300 \text{ }^\circ\text{C}$ pri paladijevem nitratu.



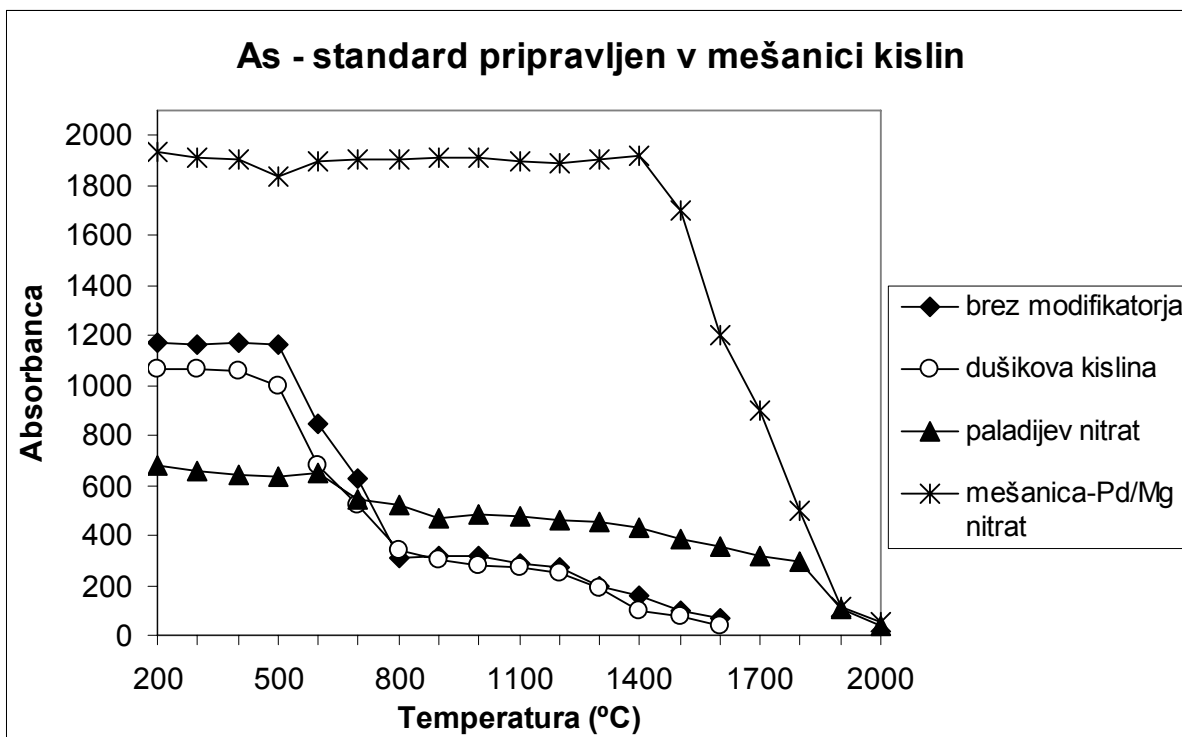
Graf 4: Optimizacija faze sežiga za standardno raztopino svineca (40 ng cm^{-3}), pripravljena v mešanici kislin, ki smo jih uporabili za razkroj vzorcev.

Rezultati, ki jih prikazuje graf 4 kažejo, da se standardna raztopina svineca, pripravljena z mikrovalovnim razkrojem v mešanici kislin, obnaša podobno, če modifikatorja ne uporabimo ali če uporabimo dušikovo kislino (1:3). Pri temperaturi višji od $400 \text{ }^\circ\text{C}$ pride do izgub prostih svinčevih atomov. Prednost uporabljenega modifikatorja je v tem, da nekoliko zniža signal ozadja, hkrati pa omogoča točno in ponovljivo merjenje koncentracij svineca v mešanici kislin. Dodatek paladijevega nitrata ter mešanice paladijevega in magnezijevega nitrata vodi do velikih izgub prostih svinčevih atomov. Omenjeni učinek je z višanjem temperature izrazitejši.



Graf 5: Optimizacija faze sežiga za vodno standardno raztopino arzena (40 ng cm^{-3}).

Podatki, prikazani v grafu 5 kažejo, da so absorbance standardne raztopine arzena, ki smo jo pripravili v vodi v primeru, ko modifikatorja ne uporabimo zelo nizke, zato lahko arzen z ETAAS določimo le, če uporabimo modifikator. Uporaba matričnega modifikatorja zviša merjene vrednosti absorbance. Temperaturo sežiga lahko, brez izgub prostih arzenovih atomov, dvignemo do $400 \text{ }^\circ\text{C}$ v primeru uporabe dušikove kisline ter do $1400 \text{ }^\circ\text{C}$ pri paladijevem nitratu ter mešanici paladijevega in magnezijevega nitrata.



Graf 6: Optimizacija faze sežiga za standardno raztopino arzena (40 ng cm^{-3}), pripravljena v mešanici kislin, ki smo jih uporabili za razkroj vzorcev.

Iz grafa 6 je razvidno, da se standardna raztopina arzena, ki smo jo pripravili z mikrovalovnim razkrojem v mešanici kislin, obnaša podobno, če ne uporabimo modifikatorja ali če uporabimo dušikovo kislino (1:3). Pri temperaturi višji od $400 \text{ }^\circ\text{C}$ pride do izgub prostih arzenovih atomov. Dodatek paladijevega nitrata zniža absorbance arzena, ki z višanjem temperature počasi upadajo. Mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata zviša absorbance arzena za približno dvakrat v primerjavi z absorbancami, ki smo jih izmerili brez dodatka modifikatorja. Temperaturo sežiga lahko, brez izgub prostih arzenovih atomov, dvignemo do $1400 \text{ }^\circ\text{C}$. Prednost uporabljenega modifikatorja je tudi v tem, da zniža signal ozadja v takšni meri, da omogoča določanje arzena v mešanici kislin.

Analiza referenčnih materialov in izbira matričnega modifikatorja

Z namenom, da bi preverili točnost in natančnost uporabljenega analiznega postopka za določitev kadmija, svınca in arzena v vzorcih sedimentov in izbrali optimalni matrični modifikator, smo analizirali referenčna materiala CRM 277 (Trace elements in estuarine sediment) in SRM 2704 (Buffalo river sediment). Vzorce smo mikrovalovno razkrojili v že omenjeni mešanici kislin. Koncentracije kadmija, svınca in arzena smo določili z ETAAS pri optimalnih pogojih merjenja. Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili standarde pripravljene v mešanici kislin, ki smo jih uporabili za razkroj vzorcev in metodo standardnega dodatka.

Na osnovi eksperimentalno dobljenih rezultatov smo izbrali najustreznejše matrične modifikatorje. Za določanje kadmija in svınca v vzorcih sedimentov z ETAAS je to dušikova kislina (1:3). Mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata pa je najustreznejši matrični modifikator za določanje arzena v vzorcih sedimentov.

Analiza sedimentov reke Save

Optimizirane analize postopke smo uporabili za določanje vsebnosti kadmija, svınca in arzena v sedimentih reke Save. Vzorce smo mikrovalovno razkrojili v že omenjeni mešanici kislin.

Najvišje izmerjene koncentracije Cd, Pb in As v vzorcih sedimentov reke Save in koncentracije, ki jih podaja vodilo ameriške agencije za varovanje okolja so navedene v tabeli 1.

Tabela 1: Koncentracije Cd, Pb in As v vzorcih sedimentov reke Save in vrednosti PEL

element	Najvišja izmerjena koncentracija ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PEL* ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cd	0,73	4,21
Pb	47,8	301
As	14,6	41,6

*PEL – Probable Effect Level; verjetne koncentracije za toksične učinke

Koncentracije kadmija, svınca in arzena v vzorcih sedimentov reke Save so nižje od koncentracij, ki jih podaja uporabljeno vodilo.

Optimizacija temperature sežiga za določanje kadmija, svinca in arzena v vzorcih sedimentov z ETAAS je pokazala da so najoptimalnejše temperature sežiga: Cd 300 °C, Pb 400 °C in As 1300 °C. Dušikova kislina (1:3) je naustreznejši matrični modifikator za določanje Cd in Pb v vzorcih sedimentov. Za določanje As v vzorcih sedimentov je naustreznejši matrični modifikator mešanica paladijevega in magnezijevega nitrata. Rezultati analize sedimentov reke Save kažejo, da v analiziranih vzorcih sedimentov ni bistveno povišanih koncentracij omenjenih elementov.

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

3. Kroženje snovi v porečjih

3.1. Kroženje ogljika v rečnih sistemih (reka Sava v Sloveniji)

Tjaša Kanduč

Institutska mentorica: Sonja Lojen

Institutska komentorica: Nives Ogrinc

Fakultetni mentor: Jože Pezdič, Oddelek za geologijo Naravoslovnotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Porečje reke Save je največje v Sloveniji in obenem pritok reke Donave, druge največje reke v Evropi, ki predstavlja enega največjih snovnih tokov ogljika v svetu (Pawellek et al., 2002). Podatke glavnih elementov in stabilnih izotopov ogljika v raztopljenih in suspendiranih fazah ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{PIC}}$) smo pridobili tekom različnih vzorčnih sezon v reki Savi in njenih pritokih. S pomočjo masne bilance in difuzijskega modela smo izračunali najpomembnejše procese, ki vplivajo na zaloge ogljika v reki Savi in ocenili možnost uravnoveženja z atmosferskim CO_2 .

Reka Sava je tipična HCO_3^- - Ca^{2+} - Mg^{2+} reka, saj raztapljanje karbonatov (kalcit z magnezijem) v glavnem vpliva na njeno kemijsko sestavo. Termodinamični izračun indeksov nasičenja kaže na prenasajenje karbonatov v rečnem sistemu. Izračunani pCO_2 v porečju Save so nad atmosferskim pCO_2 , kar pomeni da reka Sava in njeni pritoki predstavljajo vir CO_2 v ozračje v vseh vzorčnih sezonah. Vrednosti $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ se spreminjajo od $-13,5$ do $-3,3$ ‰ tekom različnih vzorčnih sezon in so kontrolirani z geološko sestavo porečja kot tudi s procesi v terestričnem ekosistemu, kot je preperevanje kamnin, spiranje preperinskega CO_2 in uravnoveženja z atmosferskim CO_2 .

Povprečni dolgoletni snovni tok raztopljenega anorganskega ogljika (DIC) ocenjujemo na podlagi podatkov pretokov in alkalnosti na $4,1 \times 10^{11}$ g C/leto, ob upoštevanju odvodnjevalne površine pa na $3,3 \times 10^7$ g C/(leto km^2) na lokaciji Bregana na meji s Hrvaško. Povprečni letni snovni tok raztopljenega organskega ogljika (DOC) na lokaciji Bregana na meji s Hrvaško ocenjujemo na $3,0 \times 10^{10}$ g C/leto, ob upoštevanja površine porečja reke Save pa na $2,8 \cdot 10^6$ g C/(leto $\cdot \text{km}^2$). Snovni tok partikulatnega organskega ogljika (POC) ocenjujemo na $5,2 \times 10^{10}$ g C/leto, ob upoštevanju odvodnjevalne površine porečja reke Save pa na $4,8 \times 10^6$ g C/(leto km^2).

Koncentracijski in izotopski difuzijski model (Broecker, 1974) kažeta, da ima proces uravnoveženja rečnega in atmosferskega CO_2 večji pomen v porečju Save, ki je sestavljeno iz permo-karbonskih skrilavih glinavcev kot mezozojskih karbonatnih kamnin.

Anorganska masna bilanca k celotnemu snovnemu toku DIC na vzorčni točki Bregana kaže, da so prispevki: (1) pritoki, (2) izmenjava z atmosfero, (3) razgradnja organske snovi, in (4) raztapljanje karbonatov v sledečih razmerjih: 70: $-1:11:19$ % v spomladanski vzorčni sezoni 2004, 63: $-7:17:26$ % v septembrski vzorčni sezoni 2004 in 71: $-5:11:23$ % v zimski vzorčni sezoni 2005. Rezultati kažejo, da pritoki najbolj vplivajo na kemijsko sestavo vode in na snovni tok ogljika v vseh vzorčnih sezonah.

Ključne besede: rečni sistem, snovni tok ogljika, stabilni izotopi ogljika

1st MR O-2, April 19, 2006

3. Mass cycling in river catchments

3.1. Carbon cycling in river systems (River Sava in Slovenia)

Tjaša Kanduč

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Sonja Lojen

Co-Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Nives Ogrinc

Supervisor at the university: Jože Pezdič, Department of Geology, Faculty of Natural Sciences and Engineering, University of Ljubljana

The Sava catchment is the largest in Slovenia and at the same time one of the tributary streams of the River Danube, the second largest river in Europe, which represents one of the largest carbon fluxes in the world (Pawellek et al., 2002). Data on major elements as well as carbon stable isotopes in dissolved and suspended species ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{PIC}}$) were obtained during different sampling seasons in the River Sava and its tributaries. Mass balance calculations as well as a diffusion model were employed to establish the most important processes influencing Sava carbon budgets and to determine the probability of equilibration with atmospheric CO_2 .

The River Sava in Slovenia is a typical a HCO_3^- - Ca^{2+} - Mg^{2+} river where dissolution of carbonate minerals (calcite with magnesium) controls its major chemistry. According to their thermodynamic saturation state, the River Sava and its tributaries exhibit oversaturation of calcite in their waters. The calculated pCO_2 in the River Sava and its tributaries is above atmospheric CO_2 pressure (on average 5 times supersaturated) and acts as a source of CO_2 in all sampling seasons. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ values ranging from -13.5 to -3.3 ‰ during different sampling seasons are controlled by the geological composition of the watershed, as well as processes in the terrestrial ecosystem, such as dissolution of rocks (carbonate and clastics), leaching of soil derived CO_2 and equilibration with atmospheric CO_2 .

Cumulatively, the overall annual dissolved inorganic carbon (DIC) flux of the River Sava at the border with Croatia is about 4.1×10^{11} g C/year, while according to the Sava drainage area DIC flux would be 3.3×10^7 g C/(year km^2). The average annual dissolved organic carbon (DOC) flux at location Bregana at the border with Croatia is estimated to be 3.0×10^{10} g C/year, according to Sava drainage area the DOC flux would be 2.8×10^6 g C/(year km^2). Annual particulate organic carbon (POC) flux is estimated to be 5.2×10^{10} g C/year, according to the drainage area of the Sava basin POC flux would be 4.8×10^6 g C/ (year km^2).

Concentration and isotope diffusion models (Broecker, 1974) showed that exchange between atmospheric and river CO_2 takes place in impermeable shale and clays rather than in the carbonate watershed, where dissolution of Mesozoic carbonates is preferential.

Inorganic carbon mass balance calculations showed that the relative contributions of (1) tributaries, (2) exchange with the atmosphere, (3) decay of organic matter, and (4) dissolution of carbonates to the total DIC flux at the border with Croatia were 70: $-1:11:19$ % in the spring of 2004, 63: $-7:17:26$ % in autumn of 2004 and 71: $-5:11:23$ % in the winter of 2005. The results indicate that the tributaries principally control River Sava chemistry and $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ values during all sampling seasons.

Key words: river system, carbon flux, stable isotopes of carbon



Tjaša Kanduč

**Kroženje ogljika v rečnih sistemih
(reka Sava v Sloveniji)**

Laboratorij za izotopsko geokemijo, Odsek
za znanosti o okolju, IJS

DAN MR, LJUBLJANA, APRIL 2006

OSNOVE IZOTOPSKE GEOKEMIJE

Tabela 1: Povprečen delež stabilnih izotopov glavnih elementov v ekoloških raziskavah:

Element	Izotop	Delež v naravi (%)
Vodik	^1H	99,985
	^2H	0,015
Ogljik	^{12}C	98,89
	^{13}C	1,11
Dušik	^{14}N	99,63
	^{15}N	0,37
Kisik	^{16}O	99,759
	^{17}O	0,037
	^{18}O	0,204
Žveplo	^{32}S	95,00
	^{33}S	0,76
	^{34}S	4,22
	^{36}S	0,014



Možne konfiguracije izotopskih oblik molekul CO₂ v naravi:

$^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$

Izotopska sestava (definicija):

$$\delta_{vz} = \frac{R_{VZ} - R_{RM}}{R_{RM}} \cdot 1000 \quad [‰]$$



Kjer je:

R (ratio) - razmerje stabilnih izotopov med redkejšim težjim izotopom in lažjim, bolj pogostim izotopom: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$.

VZ – vzorec

RM – referenčni material (VSMOW, VPDB, VCDT, AIR)

Izotopska frakcionacija:

• Izotopske izmenjevalne reakcije

• Kinetične reakcije

• Migracija,
spremembe

difuzija, fazne

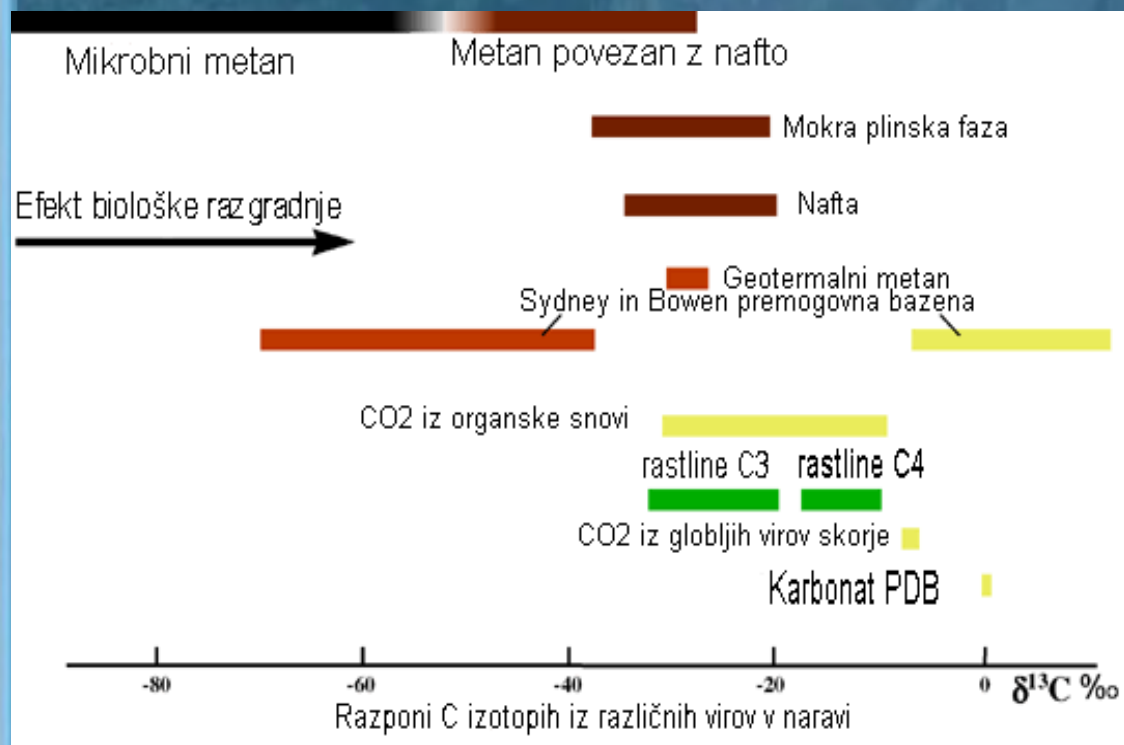
Faktor izotopske frakcionacije:

$$\alpha_{A-B} = \frac{R_A}{R_B}$$

Obogatitveni faktor:

$$\varepsilon_{(A-B)} = \delta_A - \delta_B \approx 1000 \ln \alpha_{A-B}$$

Porazdelitev stabilnih izotopov ogljika v naravi in njihova uporaba



Slika 1: Razpon $\delta^{13}\text{C}$ v naravi (Petroleum Geochemistry group CSIRO, 2000)



Dopolnilna metoda za:

- **sledenje procesov** v biogeokemičnih ciklih v različnih ekosistemih (ogljikov, dušikov, žveplov cikel) in hidrogeološkem ciklu ter **določanje izvora** različnih faz (npr. plini CO_2 in CH_4 iz Velenjskega bazena)
- primer **kroženje ogljika v porečju reke Save v Sloveniji**, v nadaljevanju

PREDHODNE RAZISKAVE

Reke predstavljajo transport erozijskih produktov iz kontinentov v oceane, kjer celotni letni snovni tok ogljika ocenjujejo na

2,5-5 ·10¹³ molov ogljika v partikulatnih in raztopljenih oblikah, kar daje 5,6 do 11,3 % ogljika, ki se ga kopiči v atmosferi (Degens et al., 1987, Meybeck, 1987, Pawellek et al.,)

NAMEN NALOGE

- **Razumeti dinamiko kemijske sestave** reke Save in njenih pritokov ter $\delta^{13}\text{C}$ v raztopljenih in suspendiranih fazah v času in prostoru (različne sezone in pretočni režimi)
- **Ovrednotiti procese**, snovne tokove ogljika in kroženje ogljika v porečju reke Save s pomočjo podatkov o pretokih, izotopske sestave raztopljenih in suspendiranih zvrsti
- **Primerjati** snovne tokove ogljika z drugimi rekami v svetu, ter oceniti biogeokemijsko stanje reke Save

ZNAČILNOSTI POREČJA SAVE V SLOVENIJI



Slika 2: Izvir Save Dolinke (1)

• Dolžina: 219 km

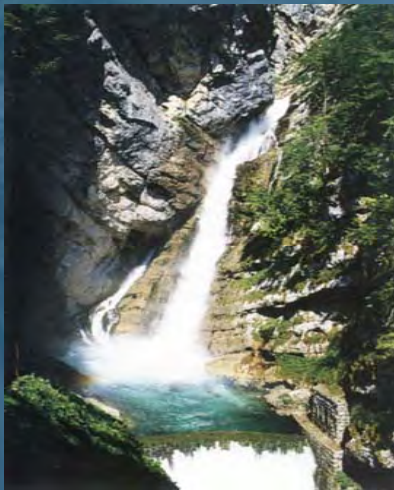
• Povprečni letni pretok:

Zg. tok (9) - 18,6 m³/s

Sr. tok (31) - 181,7 m³/s

Sp. tok (39) - 290 m³/s

• A = 10872 km²



Slika 3: Izvir Save Bohinjke (6)



Slika 4: Pritok reke Krke (38)



Slika 5: Reka Sava na meji s Hrvaško (41)

VZORČENJE

41 vzorčnih točk (20 vzorčnih točk na reki Savi, 21 vzorčnih točk na pritokih reke Save, glej Sliko 8)

Različne vzorčne sezone (april 2004, september 2004, januar 2005)

Dodatno vzorčenje za izračune masne bilance in interpretacije

Vzorčenje **suspendirane snovi** ($\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$, $\delta^{15}\text{N}$) v plastenke (1 l), filtriranje preko GF/F filtra, predhodno kisljenje z 1M HCl

Vzorčenje **suspendiranega anorganskega ogljika** ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PIC}}$), prefiltrirano preko GF/F filtra (cca. 1,5 litra)

Vzorčenje **mezozojskih karbonatov** ($\delta^{13}\text{C}_{\text{carb.}}$), ki gradijo pobočja reke Save in grušč v reki Savi, **rastlin**, ki sestavljajo obrežje Save in **preperin**

Vzorčenje padavin sočasno z vzorčenjem reke Save

POVRŠINSKA VODA POREČJA SAVE

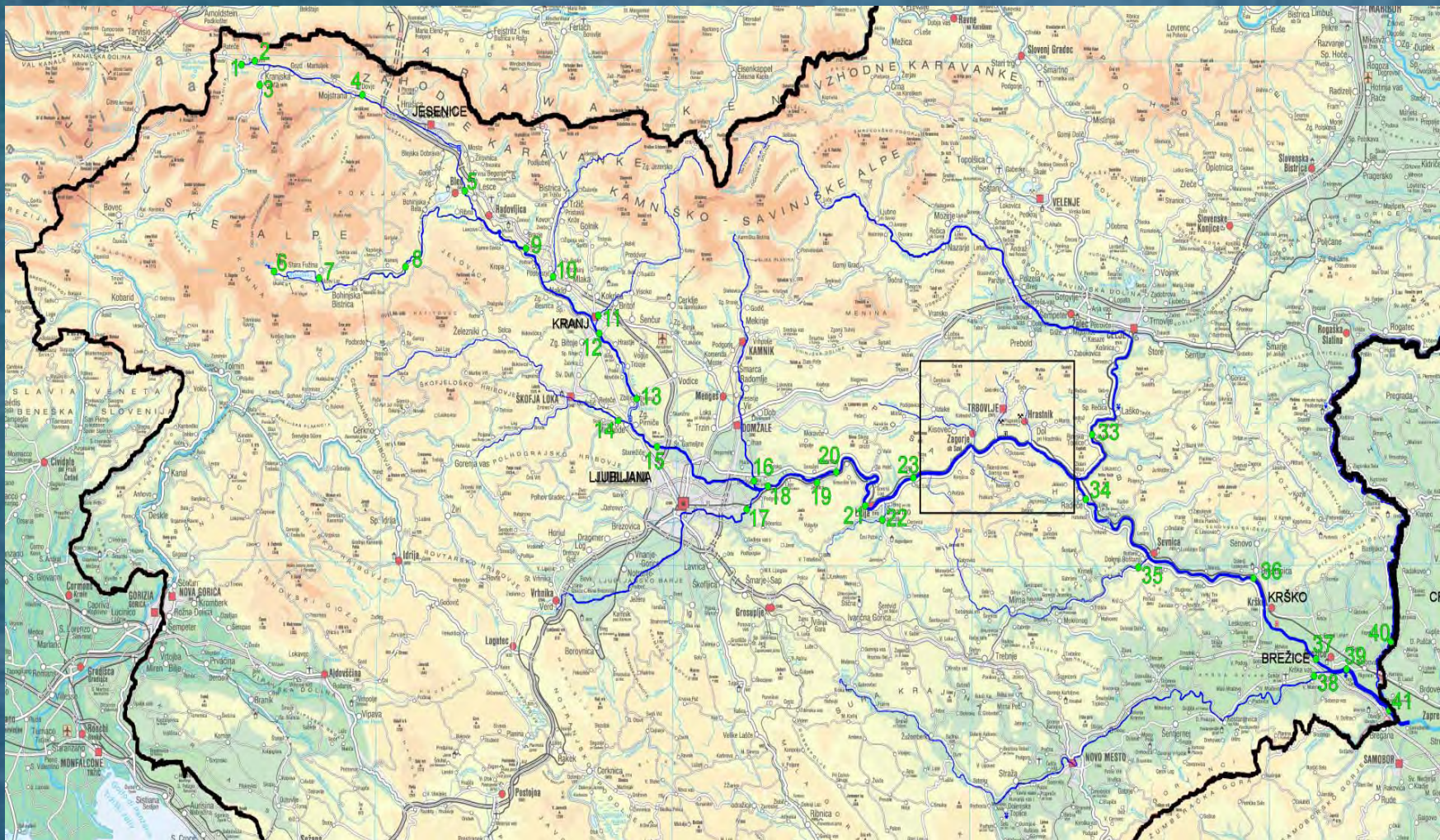
Na terenu T, pH, konduktivnost, raztopljen kisik (DO)

Vzorčenje **podzemne vode** na Kranjsko-Sorškem polju in Ljubljanskem polju in Krško-Brežiškem polju, v letu 2004.

Vzorčenje **v Zasavju** (rudniška, industrijska odpadna voda in odpadna voda z nasipov), avgust 2004

- Vzorce prefiltrirali preko 0,45 μm PTFE filtra, hranjenje 1e-teh v hladilniku do analiz v HDPE posodah za meritve kationov, anionov, alkalnosti, $\delta^{18}\text{O}$ in δD
- Vzorce za meritve konc. kationov (predhodno kisljenje s HNO_3)
- Vzorce za DIC (CuCl_2), DOC (HCl), $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ shranili v steklenih posodah in napolnili do vrha
- Za meritve $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ vzorčili 4,5 l vode v plastenke, predhodno kisljenje in obarjanje BaCl_2 v BaSO_4





Slika 6: Karta vzorčnih točk

Podatke o **pretokih** smo dobili z Agencije za okolje

Termodinamsko modeliranje s programom **PHREEQC** for Windows (Parkhurst & Appelo, 1999)

Ostali podatki

Glavne elemente (Ca, Mg, K, Na, Si, Al, SO_4^{2-} , Cl^- , NO_3^-) in elemente v sledovih smo določili z ICP – OES in IC.

DIC smo določili kolumnometrično z UIC Model 5014

DOC smo določili s Shimadzu TOC-5000A analizatorjem

University of Michigan, USA

IRMS Europa Scientific 20-20 CF SL:

- $\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{rastl.}}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{prep.}}$
- $\delta^{15}\text{N}_{\text{sus.}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{rastl.}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{prep.}}$
- $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$

Analizne metode

MS Varian Mat 250:

- $\delta^{18}\text{O}$
- δD

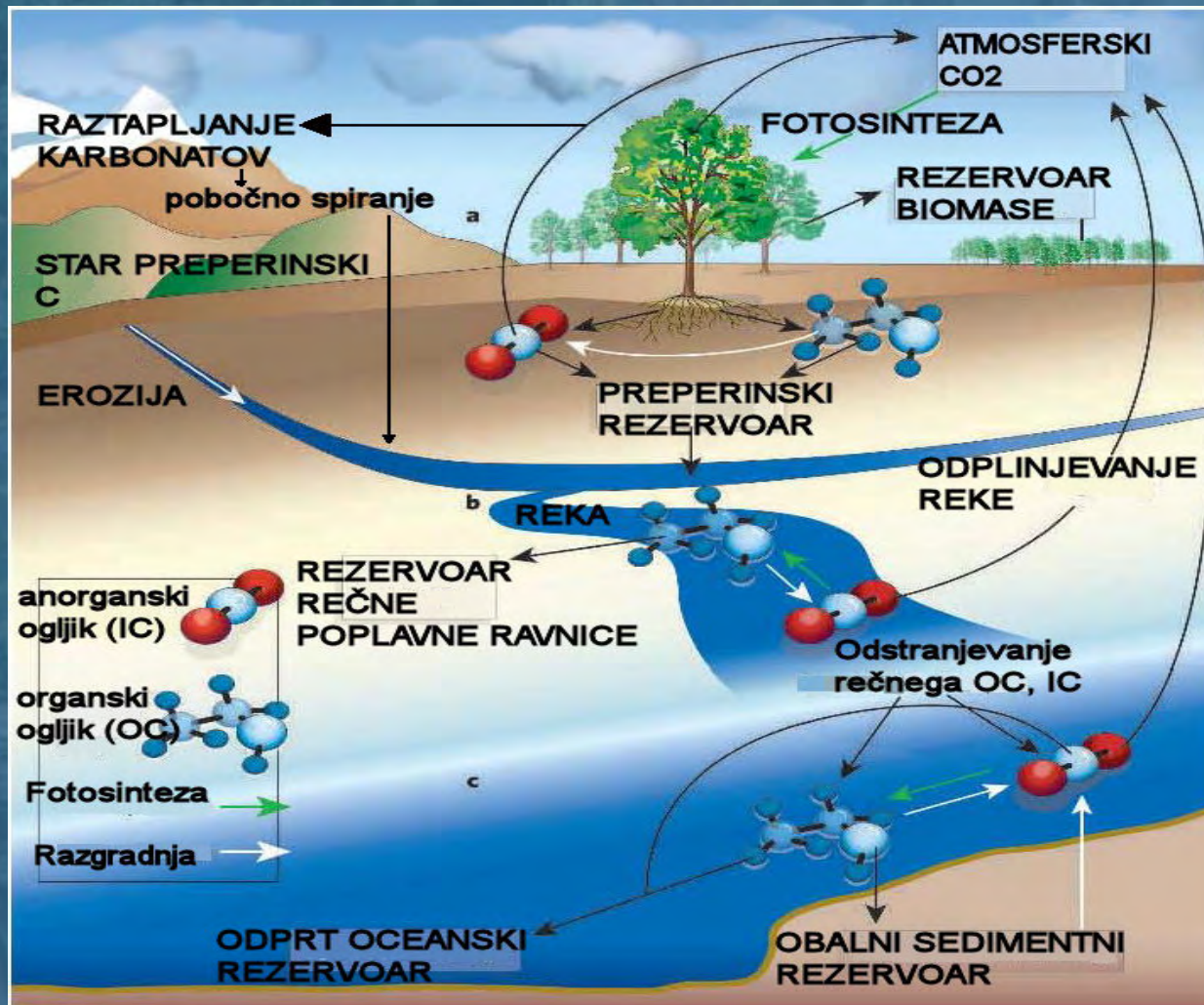
IRMS Europa Scientific 20-20 CF TG:

- $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$
- $\delta^{13}\text{C}_{\text{PIC}}$
- $\delta^{13}\text{C}_{\text{karb}}$

Celokupno alkalnost smo določili s pomočjo Granove titracije (Gieskes, 1974)

Institut Jožef Stefan,
Laboratorij za izotopsko geokemijo

OGLJIKOV CIKEL V REČNIH SISTEMIH

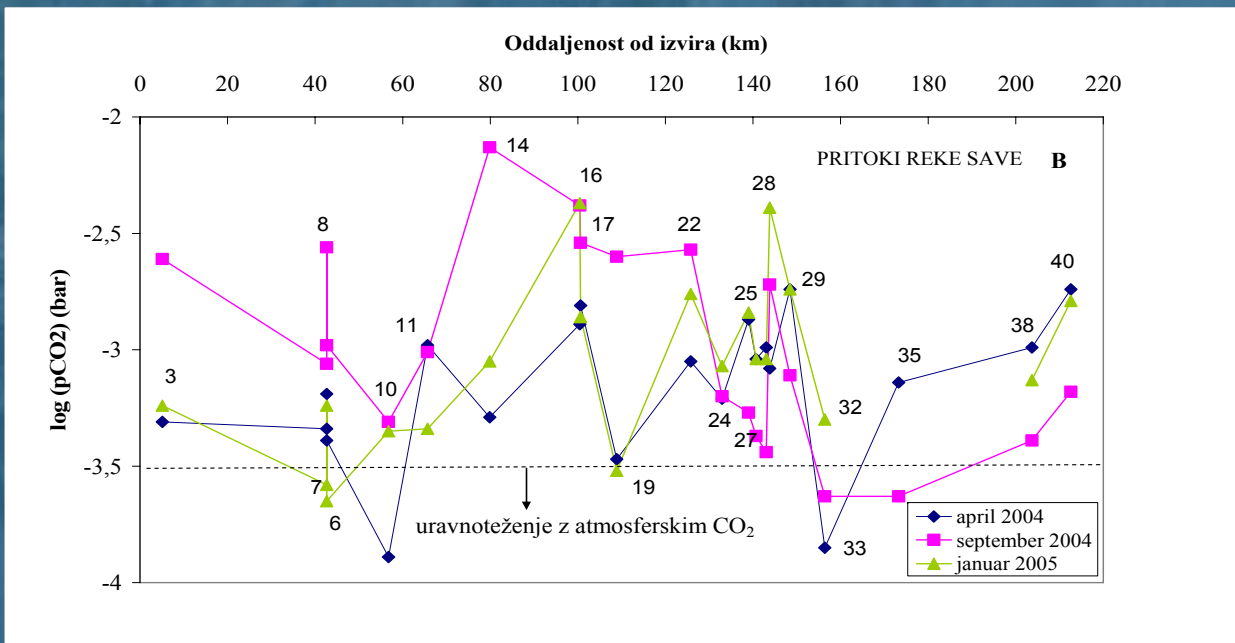
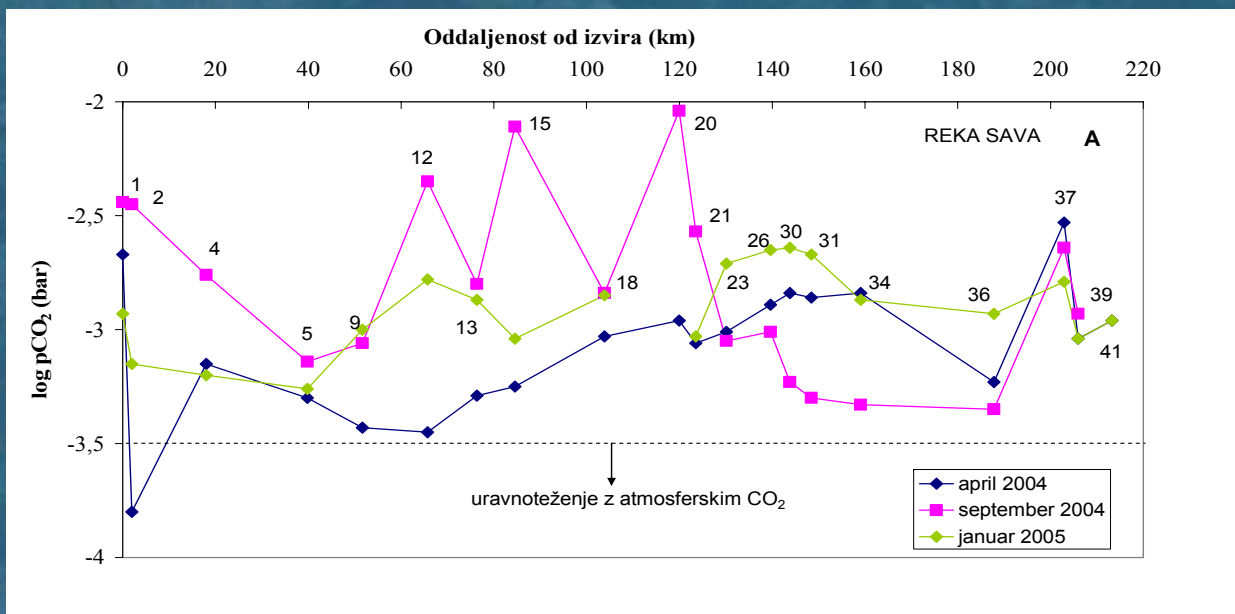


- a) terestrični ekosistem: fotosinteza v kopenskih rastlinah fiksira atmosferski CO₂, raztapljanje karbonatov

- b) transformacija organskega ogljika v anorganski ogljik v rečnem sistemu

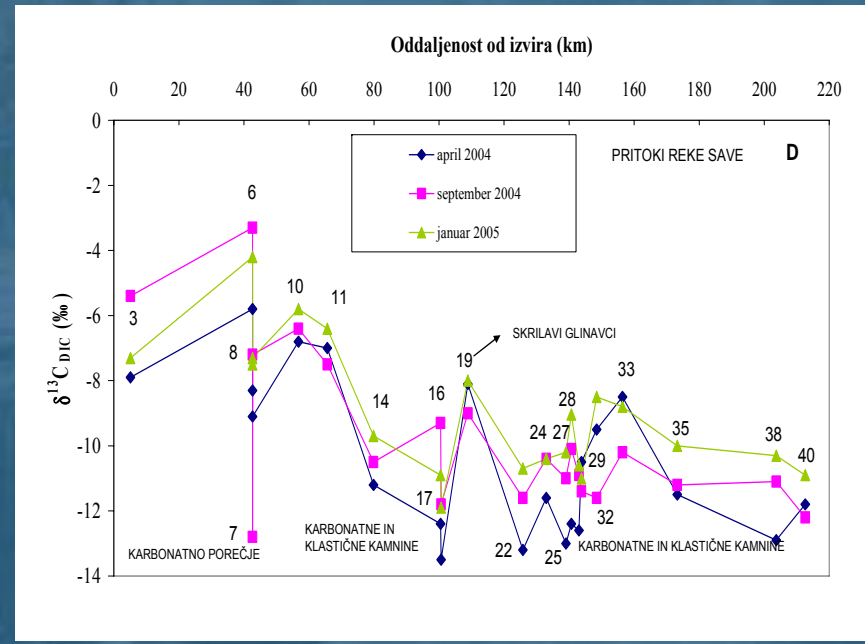
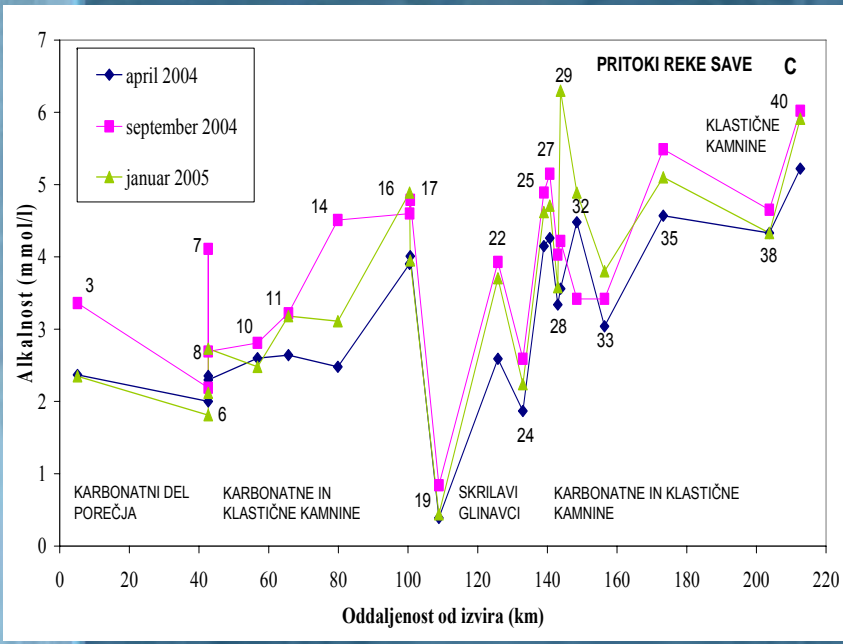
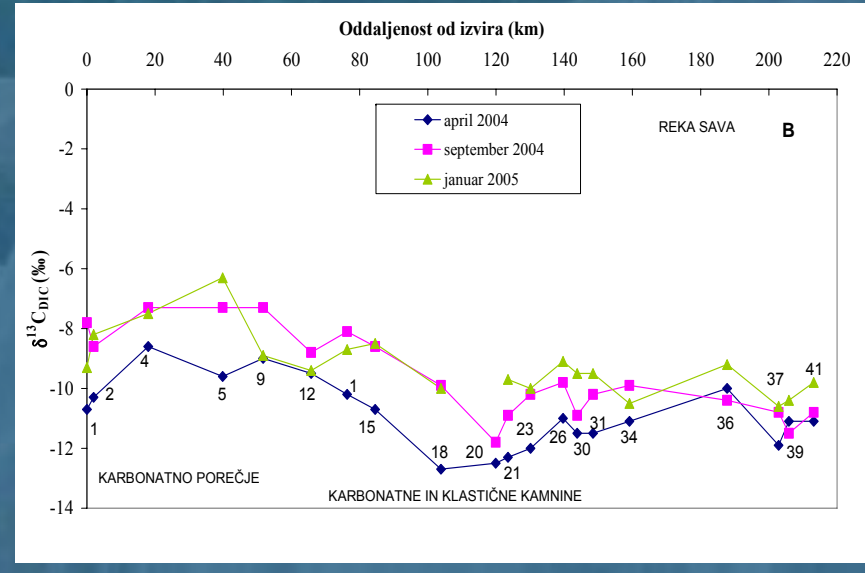
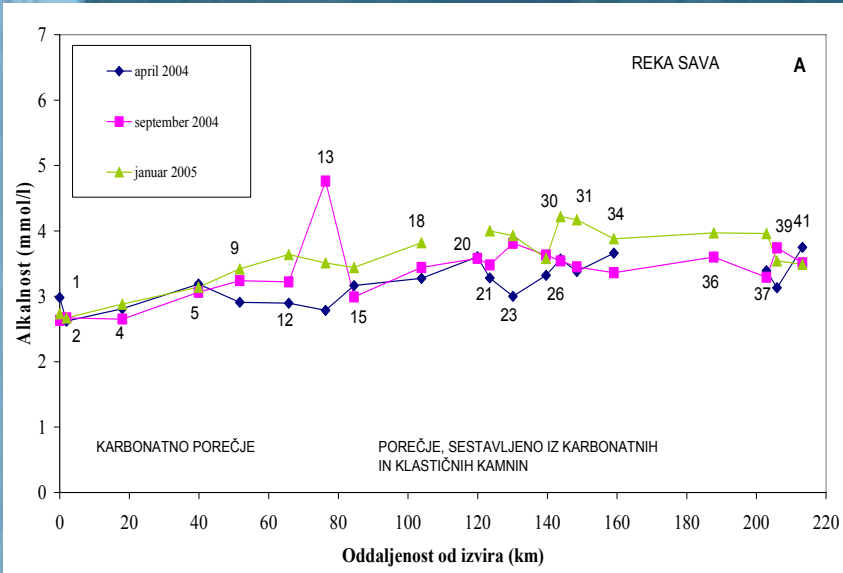
- c) nadaljevanje procesov (fotosinteza, razgradnja, izmenjava CO₂ z atmosfero) v obalnih oceanih

Slika 7: Kroženje ogljika v rečnem sistemu (dopolnjeno po Mayorga, 2005)

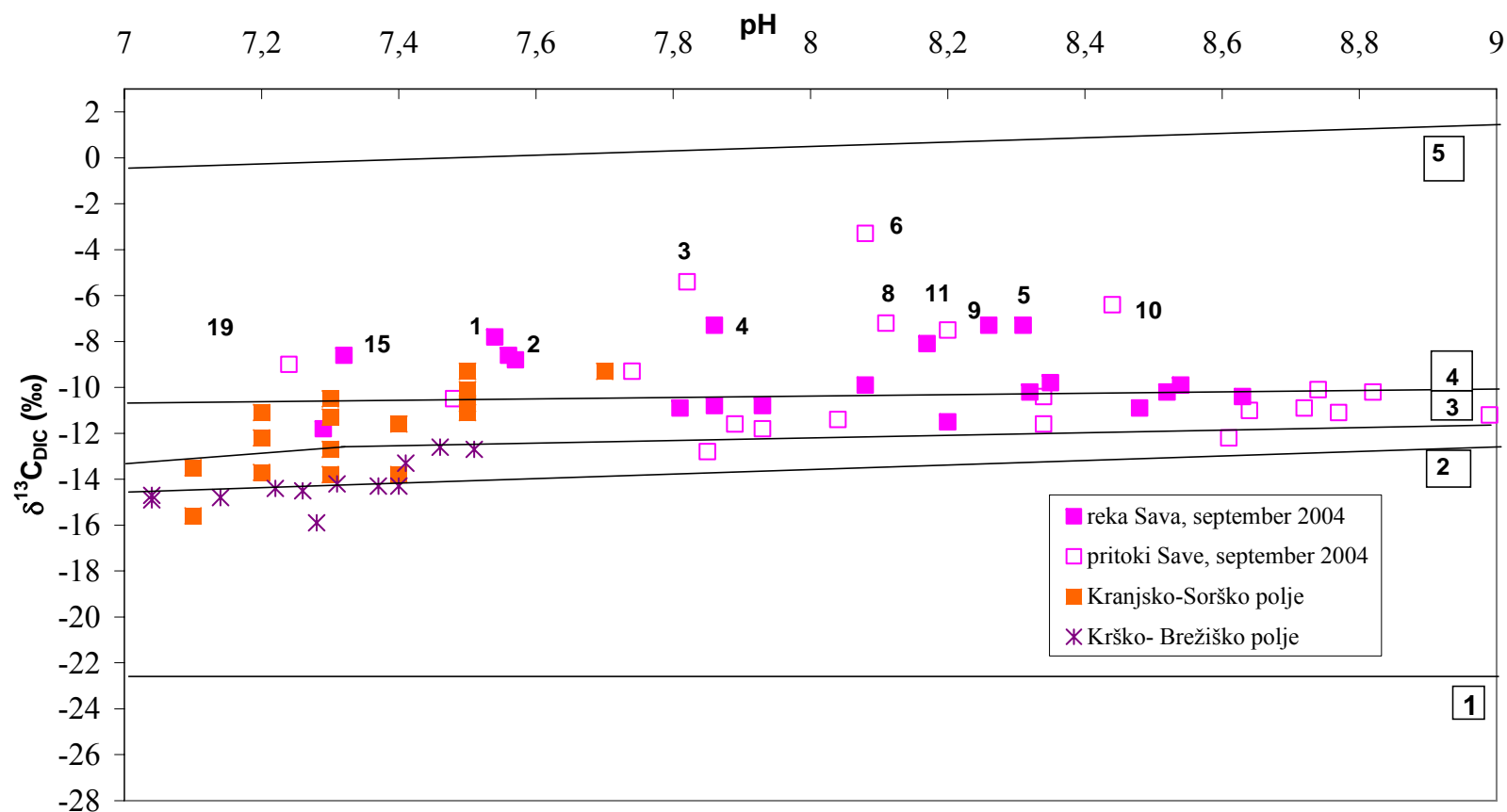


• pCO₂ nad ravnotežnim atmosferskim CO₂ (316 ppm ~ 10^{-3,5}) v vseh vzorčnih sezonah razen v spomladanski na lokacijah (6,19)

Slika 8: Sezonsko spreminjanje pCO₂ v odvisnosti od oddaljenosti od izvira reke Save



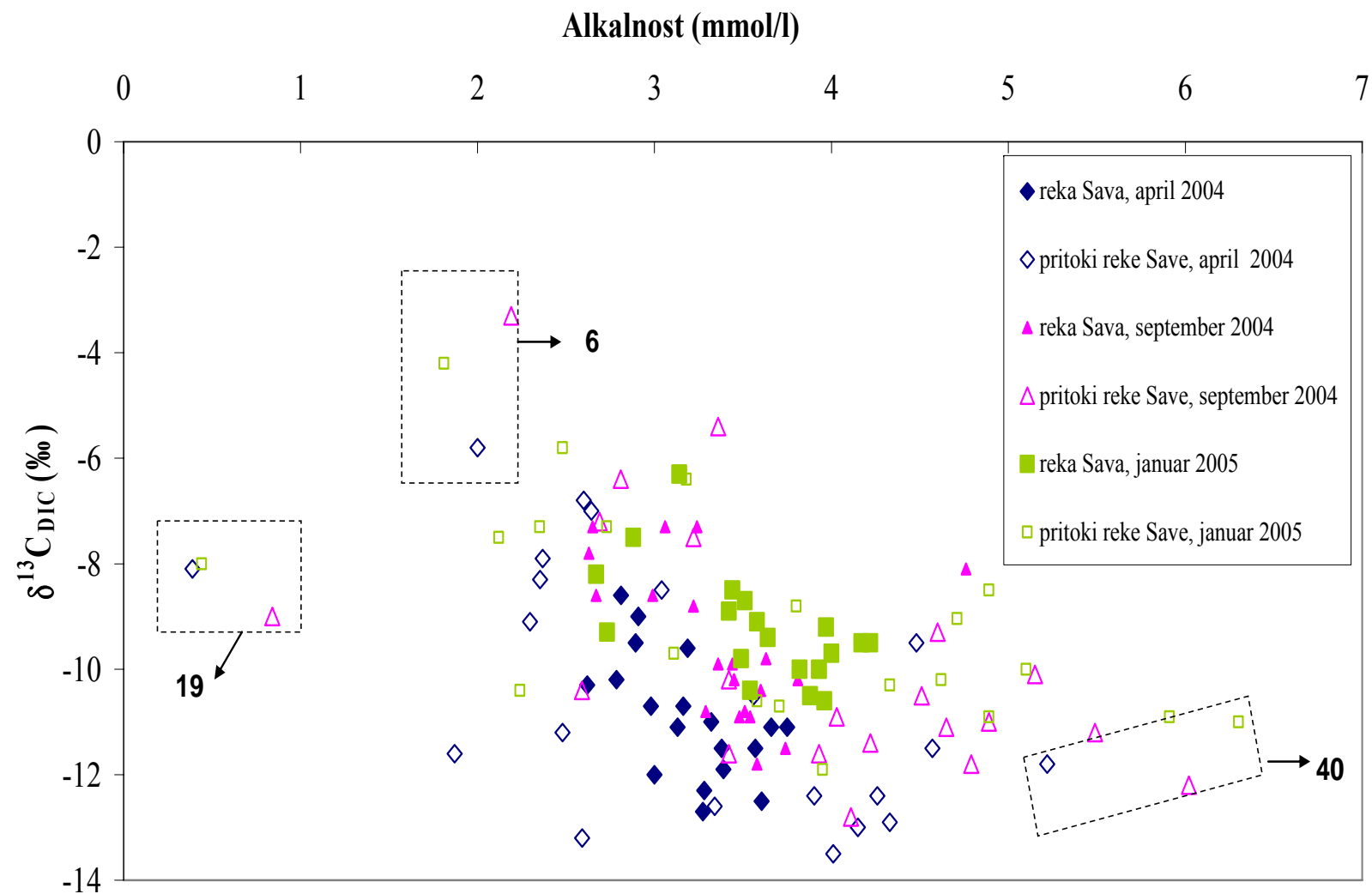
Slika 9: Sezonsko spreminjanje alkalnosti in $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ (april, 2004, september, 2004 in januar 2005) od oddaljenosti od izvira (A, B reka Sava, B, D pritoki reke Save)



Slika 10: $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ v odvisnosti od pH v rečni vodi in podzemnih vodah, september 2004

Oštevilčene linije:

1-neravnotežno raztapljanje silikatov z $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = -22,3$ ‰; **2**-odprt sistem uravnoveženja DIC z $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = -22,3$ ‰ v podzemni vodi; **3**-zaprt sistem uravnoveženega raztapljanja karbonatov z $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = -22,3$ ‰; **4**-neravnotežno raztapljanje karbonatov z $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} = -22,3$ ‰; **5**-odprt sistem uravnoveženja med DIC in zračnim CO_2 z $\delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2}$ of $-7,8$ ‰ (dopolnjeno po Barth et al., 2003)



Slika 11: Odvisnost $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ od alkalnosti (april, 2004, september, 2004 in januar 2005) v porečju reke Save

DIFUZIJSKI MODEL

Koncentracijski difuzijski model (Broecker, 1974):

$$[DIC] = [CO_2]_{eq} - ([CO_2]_{eq} - [CO_2]_0) \cdot e^{-\frac{D}{z \cdot h} \cdot t} \quad (1)$$

Izotopski difuzijski model (Broecker, 1974):

$$\delta^{13}C_{DIC} = (\delta^{13}C_a - \varepsilon) - (\delta^{13}C_a - \varepsilon - \delta^{13}C_{DIC,0}) \cdot e^{-\left(\frac{D[CO_2]_{eq}}{z \cdot h [DIC]}\right) \cdot t} \quad (2)$$

Izračuna časov uravnoveženja po koncentracijskem in

izotopskem modelu (enačbi 1 in 2) se približno ujemata (2,1 in 3,9 ure) samo na lokaciji (19), ki je locirana v permo-karbonskih skrilavih glinavcih in raztapljanje karbontov nima večjega pomena.

Simboli v enačbah (1) in (2):

- $\delta^{13}C_{DIC}$ (‰) - izotopska sestava raztopljenega anorganskega ogljika v vodi
- $[DIC]$ (mmol/l) - koncentracija raztopljenega anorganskega ogljika v vodi
- $\delta^{13}C_a$ (‰) - izotopska sestava atmosferskega CO_2 (privzeta vrednost -7,8 ‰ po Levin et al., 1987)
- ε - obogatitveni faktor med CO_2 in HCO_3^- (Levin et al., 1987)
- $\delta^{13}C_{DIC,0}$ (‰) - začetna $\delta^{13}C_{DIC}$, ki je privzeta vrednost -12,5 ‰ (Aucour et al., 1999)
- $[CO_2]_{eq}$ - koncentracija raztopljenega CO_2 v ravnotežju z atmosferskim CO_2
- t (min) - čas
- h (cm) - debelina mejne plasti
- D/z (cm/h) - hitrost izmenjave na višini vodnega stolpca, ki se uravnoteži z atmosfero na enoto časa

Masna bilanca DIC na meji s Hrvaško (vzorčna točka 41):

$$F_{\text{DIC RS}} = F_{\text{DIC pri}} - F_{\text{DIC ex}} + F_{\text{DIC org}} + F_{\text{DIC carb}}$$

$$F_{\text{DIC RS}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{RS}} = F_{\text{DIC pri}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC pri}} - F_{\text{DIC ex}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{ex}} + F_{\text{DIC org}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{POC}} + F_{\text{DIC carb}} \cdot \delta^{13}\text{C}_{\text{carb}}$$

Kjer je,

$$F = Q \cdot \text{DIC} [\text{mol/s}]$$

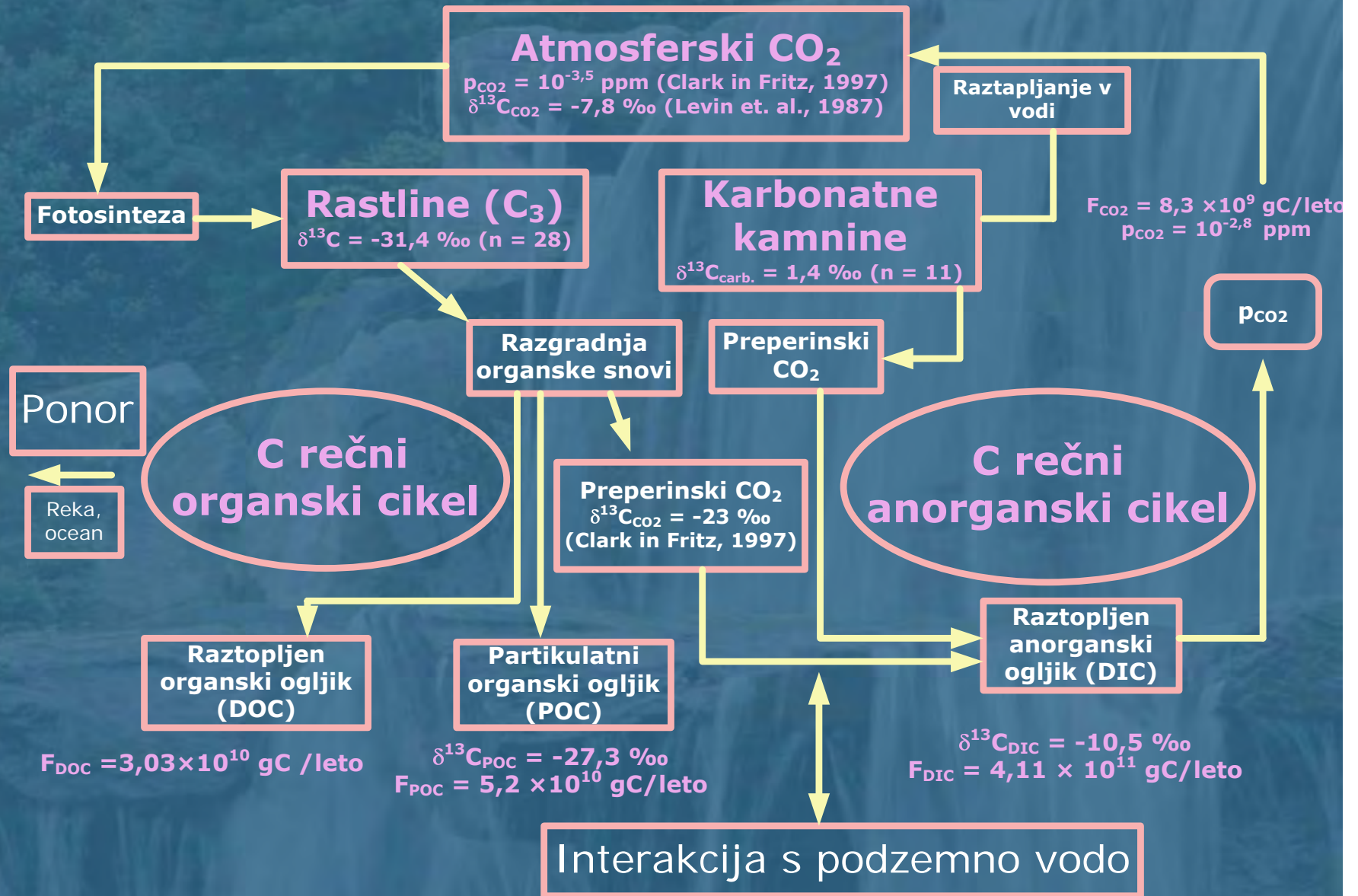
$\delta^{13}\text{C}_{\text{ex}}$ od 1,2 do 1,4 ‰ (Levin et al., 1987)

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{POC}} = -26,7 \text{ ‰},$$

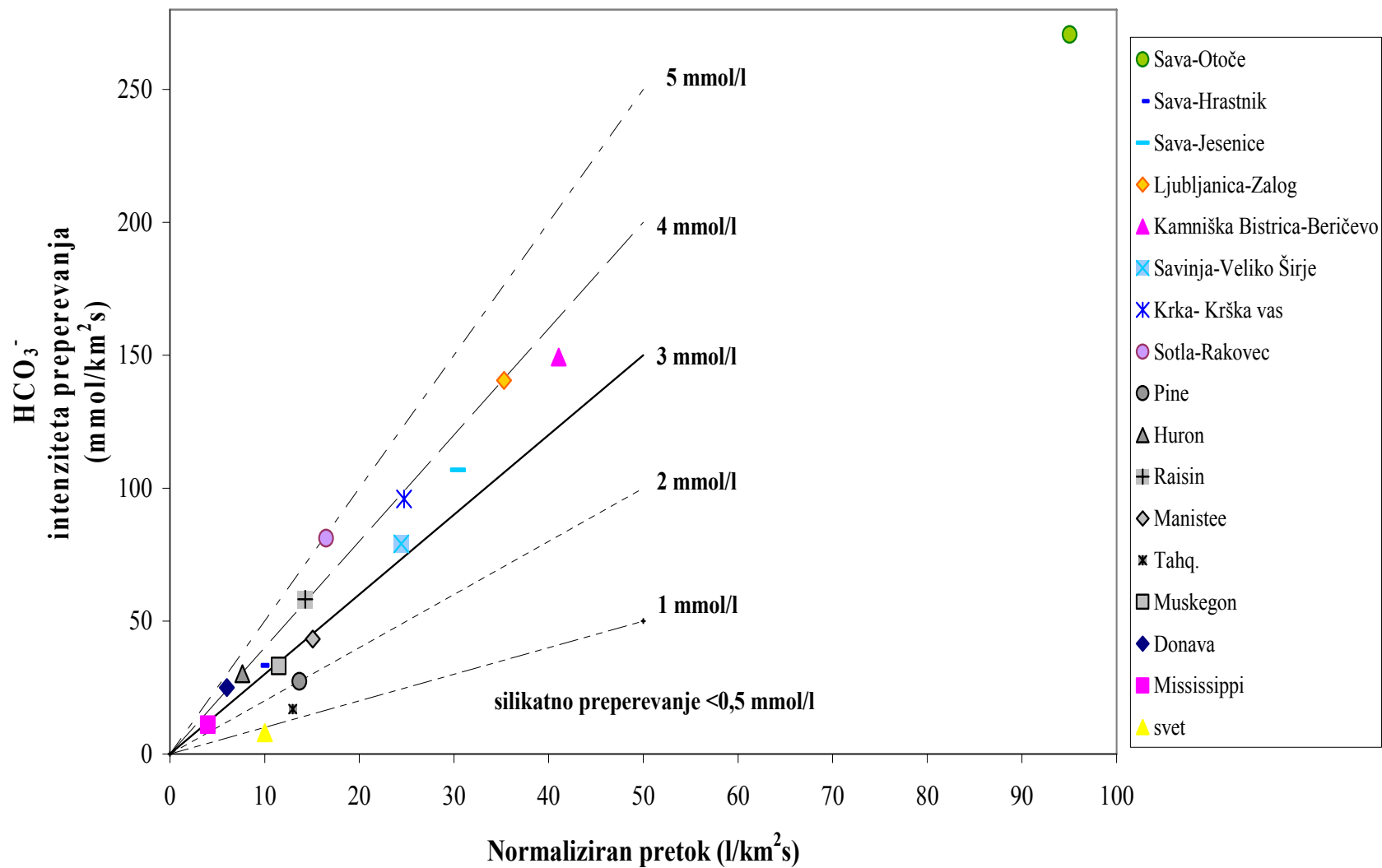
$$\delta^{13}\text{C}_{\text{carb}} = 1,4 \text{ ‰}$$

Relativni prispevki različnih procesov, ki vplivajo na rečni DIC v različnih vzorčnih sezonah:

Vzorčna sezona	$F_{\text{DIC pri}}$ [%]	$F_{\text{DIC org}}$ [%]	$F_{\text{DIC carb}}$ [%]	$F_{\text{DIC ex}}$ [%]
april 2004	70,1	11,4	19,4	-0,8
september 2004	62,2	16,7	25,9	-4,9
januar 2004	70,1	10,8	22,6	-3,6



Slika 12: Kroženje ogljika v rečnem sistemu reke Save na meji s Hrvaško (41)



Slika 13: Snovni tok DIC v odvisnosti od normaliziranega pretoka (upoštevani podatki alkalnosti in pretoka iz leta 1995-2005, EIONET 2003)



HVALA ZA POZORNOST!

1.12.2004 14:23:34

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

3. Kroženje snovi v porečjih

3.2. Razvoj erozijskega modela za transport živega srebra v porečju Idrije

David Kocman

Institutska mentorica: Milena Horvat

Fakultetna mentorica: Milena Horvat, Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana

Živemu srebru v okolju je v zadnjih desetih letih posvečena velika pozornost predvsem zaradi njegove velike kemijske aktivnosti, globalnega razširjanja, biogeokemijskega kroženja, njegovih pretvorb v okolju, kopičenja v prehrabnih verigah ter njegove toksičnosti. Med najpomembnejša svetovna rudišča s približno 150.000 tonami pridobljenega živega srebra spada rudnik Hg v Idriji. Ocenjeno je, da je bilo v 500-letni zgodovini rudarjenja zaradi neučinkovite topilniške tehnologije ter odlaganja rudniških ostankov v okolje izpuščeno več kot 37.000 ton Hg. Postopki pridobivanja in predelave rude so močno povišali koncentracije Hg v tleh, zraku, vodah, vegetaciji ter živalstvu in ljudeh na širšem območju Idrije. Območje Idrije in okoliških hribov je gosto posejano s številnimi odlagališči jalovine in žgalniških ostankov iz preteklosti. Poseben problem so ostanki številnih malih retortnih topilnic iz zgodnjega obdobja rudarjenja.

Z živim srebrom onesnažene deponije žgalniških ostankov in tudi naravno onesnažene zemljine na območju širše Idrije so torej še danes stalni in izdatni vir živega srebra v povodju Idrije, spodnjem toku reke Soče in Tržaškem zalivu. Živo srebro se po rečnem sistemu premešča v raztopljeni obliki ali vezano na delce plavin.

Glavni cilj reševanja okoljskih problemov, povezanih z živim srebrom na območju Idrije, je preprečitev dotoka in kasnejšega transporta Hg v vodnem okolju, predvsem najbolj toksične oblike - monometil živega srebra (MMHg). Eden izmed načinov za doseg tega cilja je uporaba matematičnih modelov, ki opisujejo transport in usodo živega srebra v porečju.

V prispevku bom predstavil različne pristope k modeliranju procesov erozije, odplavljanja zemljin ter površinskega odtoka vode s pomočjo geografskega informacijskega sistema (GIS) za potrebe določanja količine odplavljenega živega srebra v reko Idrijco ter načrtovanja sanacijskih/remediacijskih ukrepov. Predstavil bom tudi načine validacije in kalibracije takšnih modelov. Hkrati bom ovrednotil vhodne podatke o koncentracijah in oblikah živega srebra (celokupne vrednosti Hg, MMHg, vodotopne oblike Hg, Hg vezan na organsko snov...).

Ključne besede: erozija, živo srebro, odplavljanje zemljin, površinski tok, GIS

1st MR O-2, April 19, 2006

3. Mass cycling in river catchments

3.2. Development of an erosion model for transport of mercury in the Idrijca catchment – GIS based soil erosion model

David Kocman

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Milena Horvat

Supervisor at the university: Milena Horvat, Jožef Stefan International Postgraduate School

The Idrijca mercury mine in Slovenia was exploited for about 500 years. It has been estimated that during this time approximately 37,000 tons has been dissipated into the environment. In the last 20 years mercury concentrations in water, sediments, air and soil in the wider Idrijca region were monitored intensively, suggesting that the main sources of contamination are natural rocks containing mercury, deposits of residues from combustion and erosion/deposition of contaminated soils and sediments in the Idrijca River system.

The present research is mainly focused on surface runoff and erosion of mercury from contaminated soils and sediments in order to develop measures to prevent Hg emissions to the river system, reduce Hg concentrations in all environmental compartments and avoid its transport in the watershed with ultimate accumulation in the coastal sea. The priority objective of research in this mercury contaminated site is reduction of the formation and bioaccumulation of methylmercury. To reach this target the advantages of the geographical information system (GIS) were used. On basis of the Gavrilovic soil erosion equation and the spatial distribution of mercury in soils, it was possible to estimate the average annual mercury input to the River Idrijca. Maps of sediment production, sediment delivery ratios and the content of mercury in the soil were combined to produce a risk map. Validation and calibration of these models is also presented. Further optimization of the erosion model included differentiation of Hg compounds in soils into different behavioural classes (T-Hg, MMHg, water soluble, organo-chelated Hg...) by a sequential extraction scheme.

Key words: erosion, mercury, sediment delivery, surface runoff, GIS

Dan mladih raziskovalcev O-2

**Razvoj erozijskega modela za transport živega srebra
v porečju Idrijce**

David Kocman

Mentor: prof.dr. Milena Horvat

Vsebina:

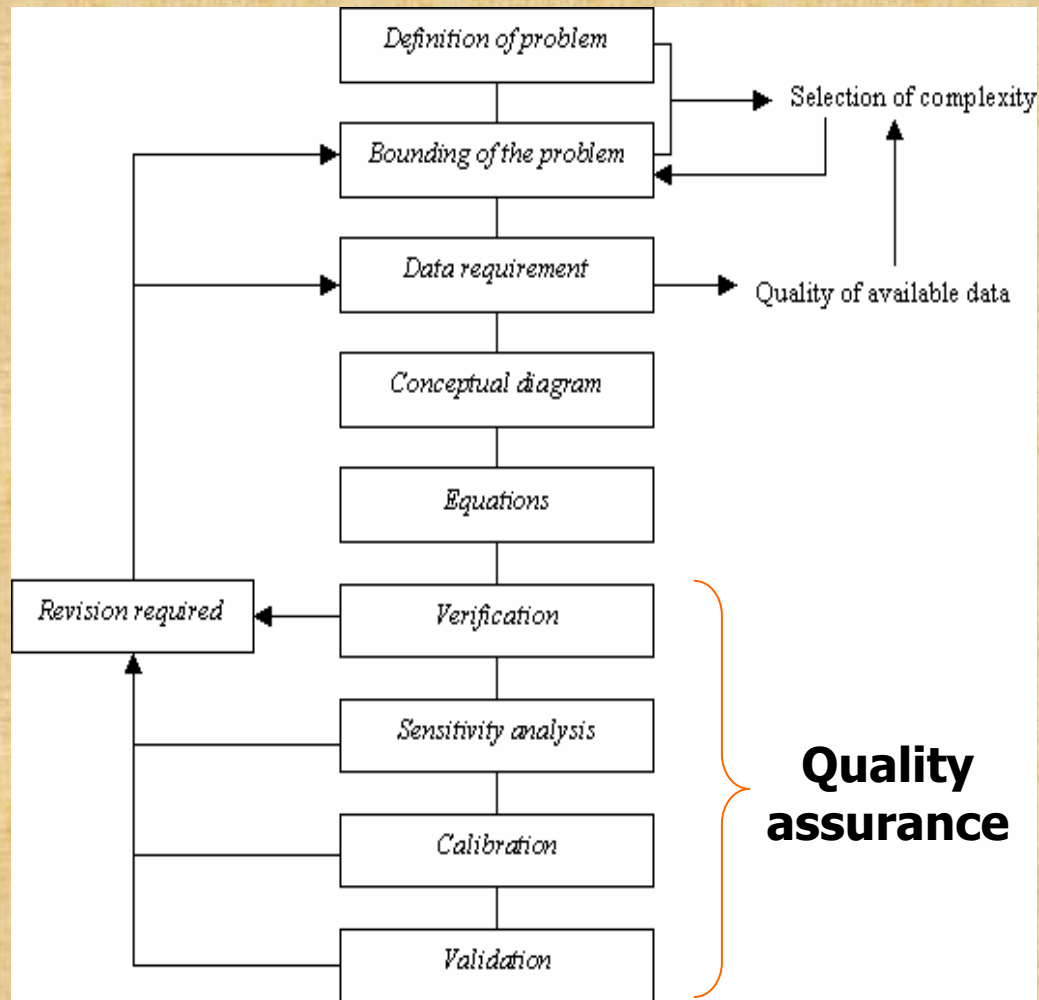
- **Modeliranje transporta in pretvorb živega srebra v porečju reke Idrijce**
- **Uporaba geografskega informacijskega sistema (GIS) pri modeliranju procesov erozije, odplavljanja zemljin in površinskega odtoka za potrebe določanja količine odplavljanja Hg v reko Idrijco ter načrtovanje sanacijskih/remediacijskih ukrepov**
- **Postopki pri modeliranju okoljskih procesov (validacija, kalibracija, vhodni podatki...)**

CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

- **CILJ: zmanjšanje vsebnosti živega srebra v vseh segmentih okolja na širšem območju rudnika živega srebra Idrija**
- **KAKO DO CILJA ?:**
 - **Modeliranje erozije in procesov povezanih z erozijo ter modeliranje transporta in pretvorb živega srebra v porečju reke Idrijce z namenom določitve ustreznih remediacijskih ukrepov za preprečitev dotoka živega srebra (še posebno MeHg) v vodno okolje**

MODELIRANJE OKOLJSKIH PROCESOV - definicije in postopki

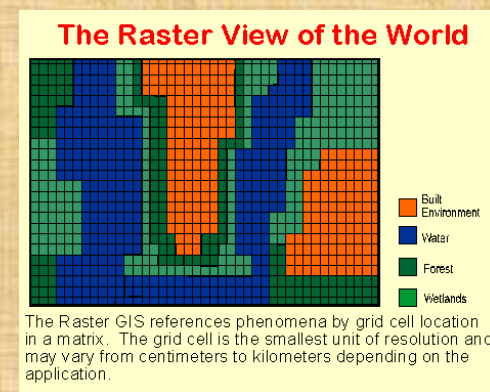
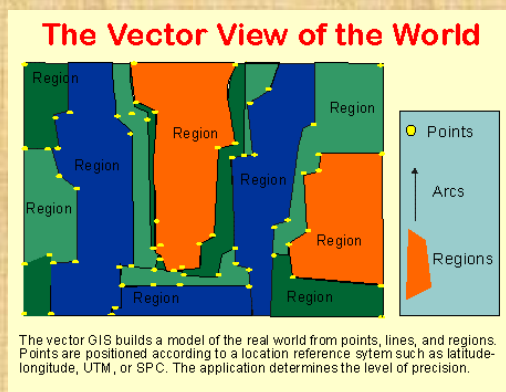
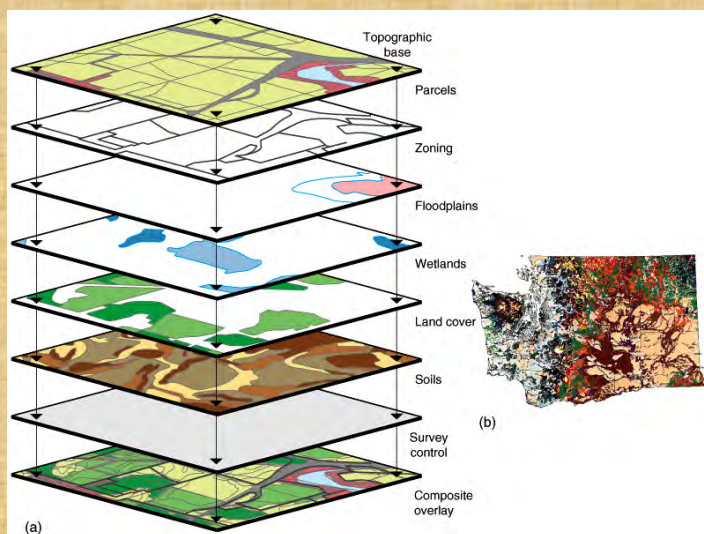
- **MODEL** - "poenostavljena" slika resničnega sveta.



- Kaj modeliramo in zakaj ?
- Določitev robnih pogojev sistema
- Kompleksnost sistema, kateri so najpomembnejši procesi
- Izdelava konceptualnega modela
- Odnose med parametri prevedemo v enačbe
- **Verifikacija** – primerjava z meritvami/opazovanji
- **Analiza občutljivosti** – določitev parametrov na katere je model občutljiv
- **Kalibracija** – prilagoditev parametrov/enačb na različne pogoje
- **Validacija** – zmožnost modela za napovedi

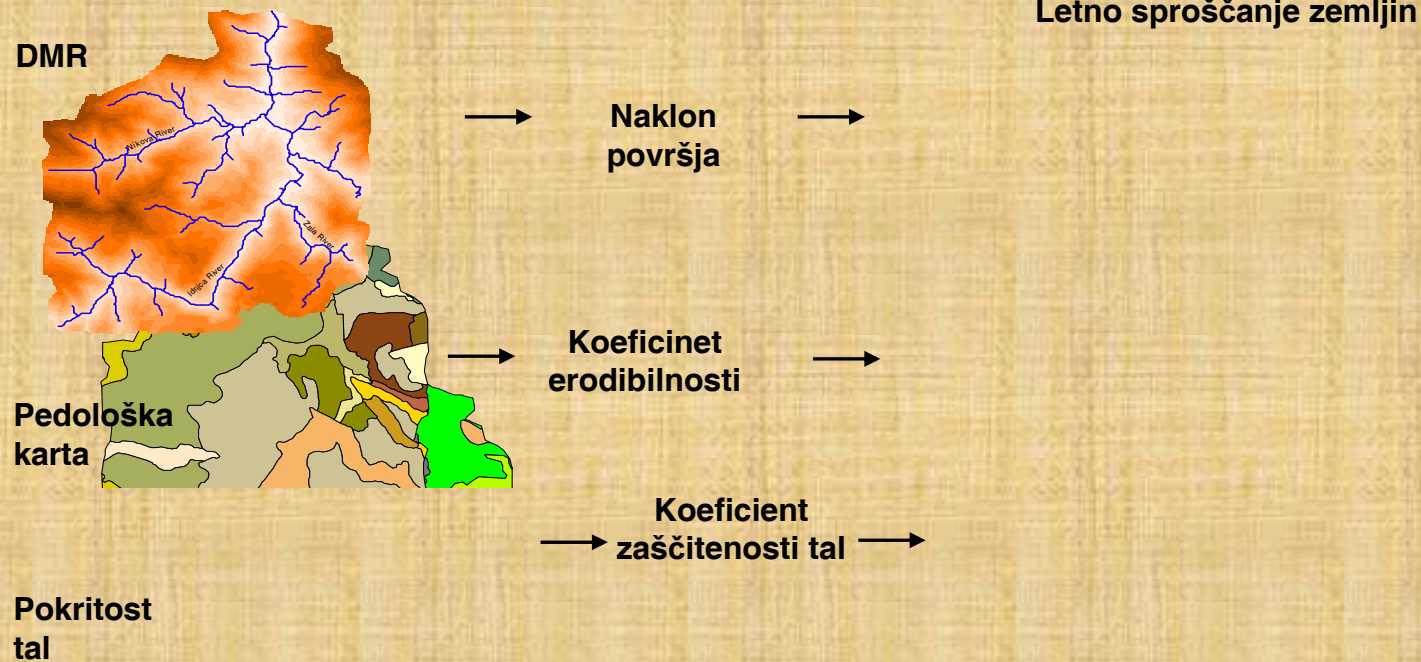
UPORABA GEOGRAFSKEGA INFORMACIJSKEGA SISTEMA

- **Geografski informacijski sistem (GIS)** je sistem za urejanje in upravljanje prostorskih podatkov, ki omogoča shranjevanje, urejanje in analizo ter prikaz geografsko orientiranih podatkov.
- **Osnovni tipi podatkov v GIS:**
 - **Rastrski podatki:** Pravokotna mreža celic ali slikovnih elementov (pixlov), kjer je vsaki celici prirejena ena vrednost (številka, lastnost ali opis) in njen geografski položaj.
 - **Vektorski podatki:** Linijski segmenti nekega podatka, kateremu je dodan spisek opisnih atributov.
 - **Database podatki:** Tabelarni podatki, ki vsebujejo referenčne atributivne informacije o grafičnih elementih v GIS-u.



EROZIJSKI MODEL

- **Gavrilovićeva enačba za izračun srednjega letnega sproščanja zemljin (m³/leto) zaradi vodne erozije:**
- **$S = 20 PM * E^{1.5} * A$**
- **S...srednje letno sproščanje zemljin, A...površina, PM...največje dnevne padavine in E...erozijski koeficient $E = G * VP * (V + SL^{0.5})$ pri čemer je G...koeficient erodibilnosti, VP...zaščitenost tal zaradi poraščenosti, S...nagib terena**

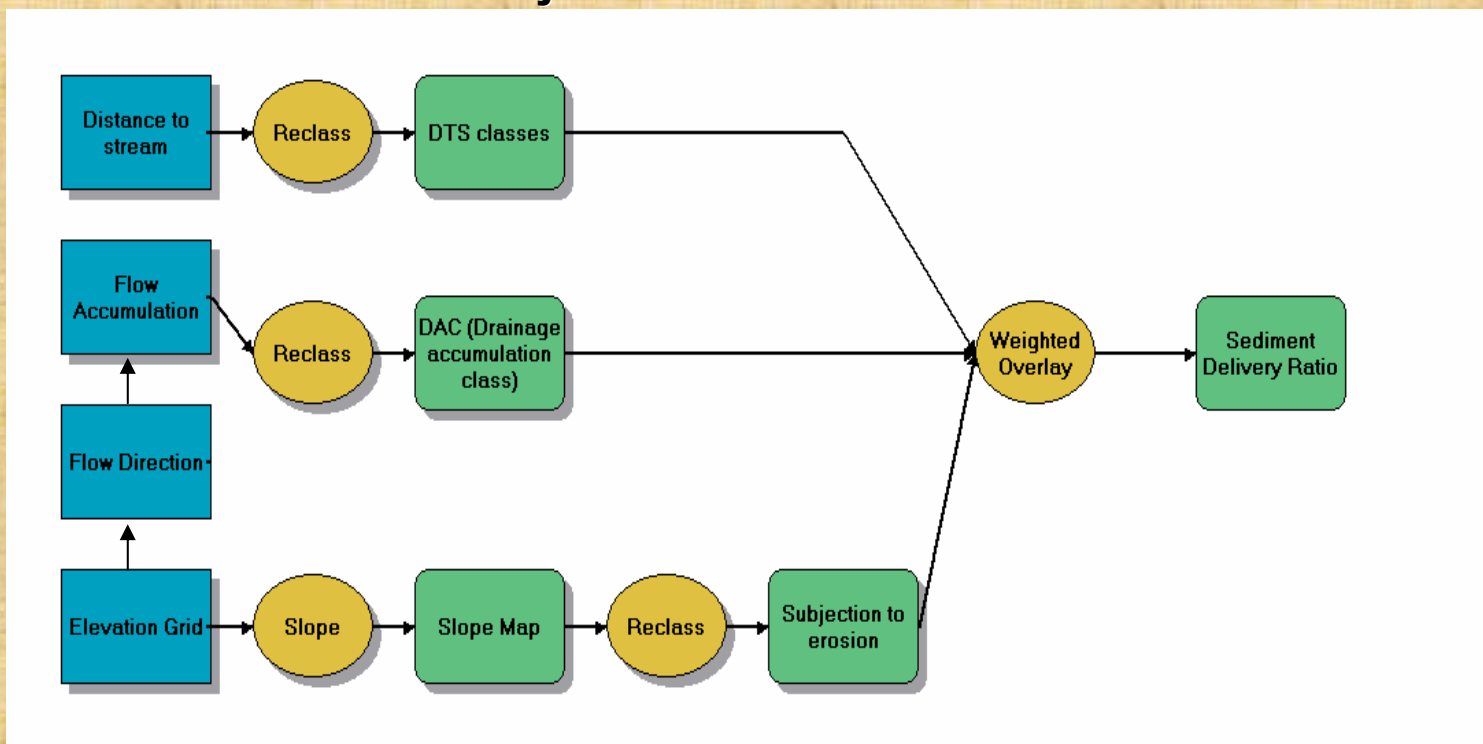


DOTOK PLAVIN V REČNI SISTEM

SDR (sediment delivery ratio) = SY / E

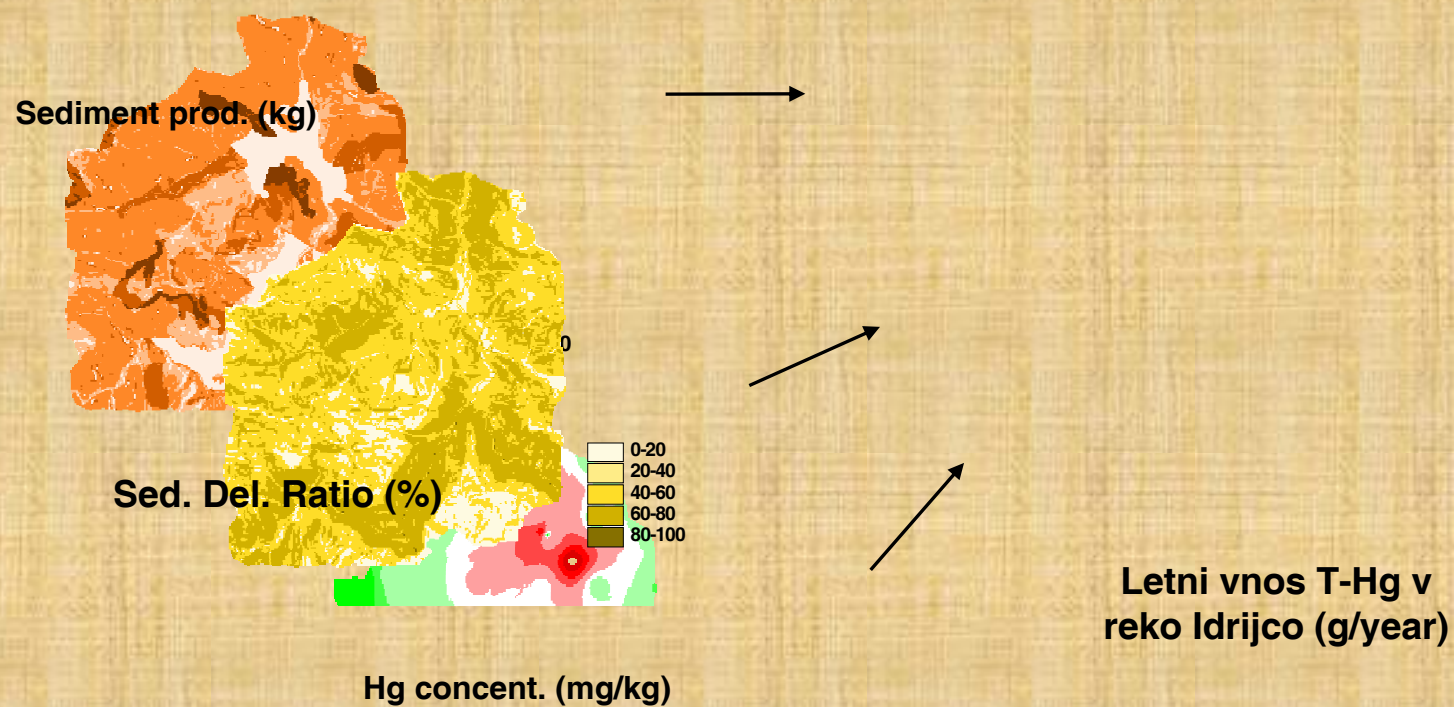
SY...odplavljene zemljine

E...erodirane zemljine



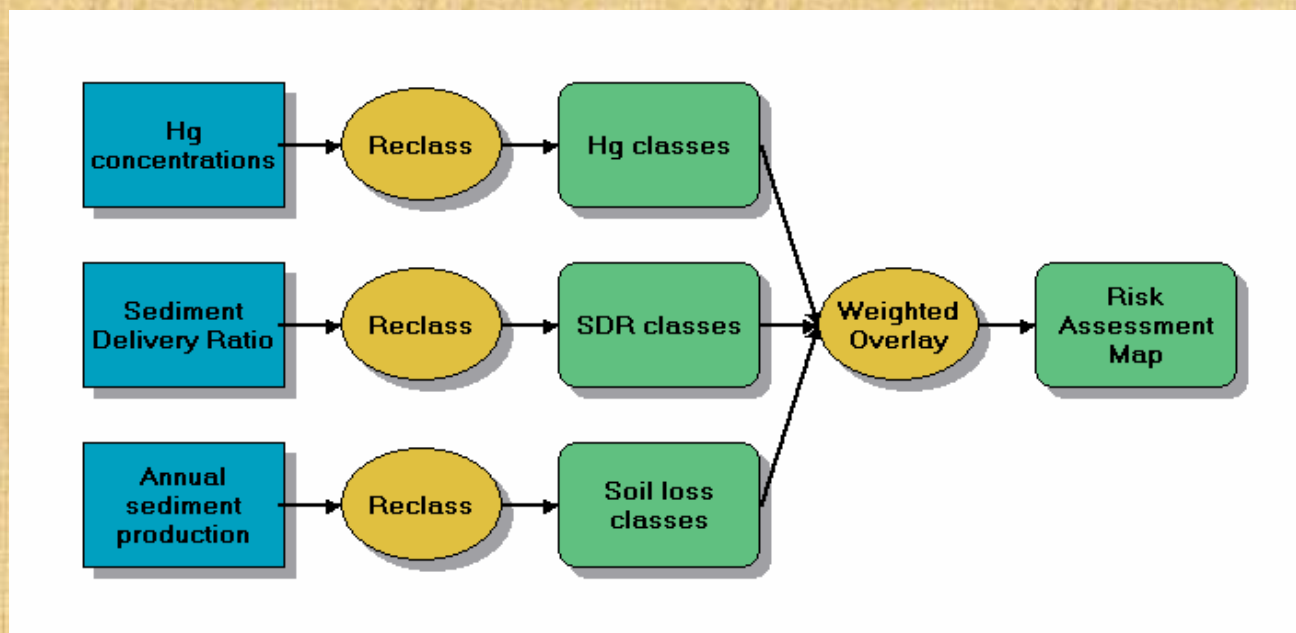
LETNI VNOS T-Hg V REKO IDRIJCO

Letni vnos T-Hg v reko Idrijco izračunan s pomočjo erozijske karte, karte dotoka plavin ter karte porazdelitve T-Hg v tleh na omočju Idrije znaša 840 kg/leto.



KARTA TVEGANJA VNOSA Hg V REČNI SISTEM ZARADI EROZIJE

Karta tveganja vnosa Hg v rečni sistem narejena s funkcijo "obteženega prekrivanja" treh kart: karte sproščanja zemljin, SDR in porazdelitve Hg v prsti preklasificiranih na štiri-stopenjsko skalo.

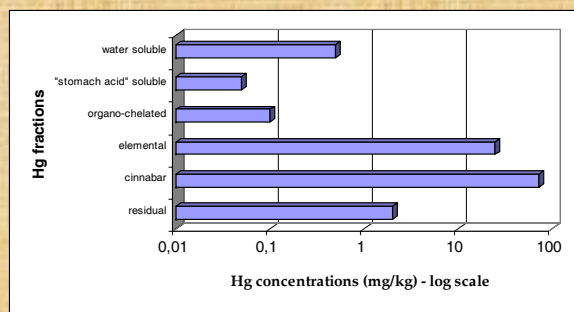


ZAPOREDNA EKSTRAKCIJA PRSTI

Rezultati sekvenčne ekstrakcije različnih prsti (gozdna tla, travniška tla, žgalniški ostanki, aluvijalni nanosi) vključeni v erozijski model glede na prostorsko porazdelitev posameznih prsti in vsebnosti T-Hg.

Zaporedna sekvenčna ekstrakcija: koraki, reagenti in opis frakcij

STEP	REAGENTS	FRACTION DESCRIPTION	TYPICAL Hg SPECIES
F1	milli-Q water	water soluble	HgCl ₂ , HgSO ₄
F2	pH 2 HCl/HOAc	stomach acid soluble	HgO
F3	1N KOH	organo-chelated	Hg in humic acids, Hg ₂ Cl ₂
F4	12 N HNO ₃	elemental	Hg ⁰ , Hg ₂ Cl ₂
F5	aqua regia	cinnabar	HgS, m-HgS, HgSe, HgAu
F6	HF/HCl/HNO ₃	residual	mineral lattice bound



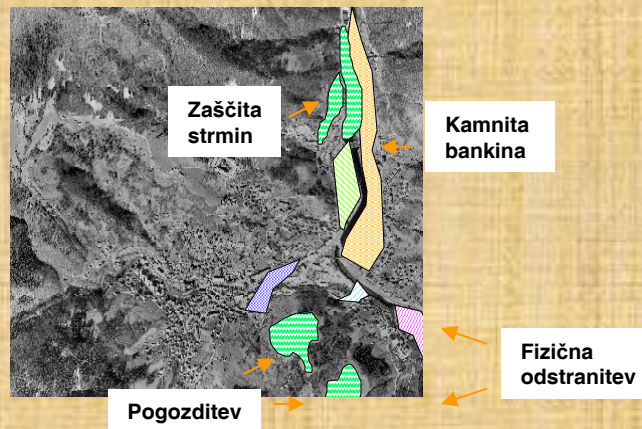
Primer rezultata sekvenčne ekstrakcije

Hg fraction	Hg reaching Idrijca (kg/year)
water soluble	4.2
stomach acid soluble	0.42
organo-chelated	0.84
elemental	210
cinnabar	607
residual	1.68
sum	840

REMEDIACIJA – SANACIJSKI UKREPI

- GIS orodja omogočajo načrtovanje prostorskih sanacijskih ukrepov
- Sanacijski ukrepi na območju Idrije zajemajo
 - Sprememba namembnosti tal (npr. pogozditev)
 - Zaščita strmin (zaščitne pregrade...)
 - Fizična odstranitev t.i. vročih točk

Porazdelitev rudniških ostankov in predlagani sanacijski ukrepi



MODELIRANJE POVRŠINSKEGA ODTOKA V OKOLJU GIS (SCS Curve Number Method)

- **Metoda za določanje površinskega odtoka**
- **Zmožnost odtoka izražena številčno (0-100) kot kombinacija hidrološke klasifikacije tal in pokritosti tal**

$$S = \frac{25400}{CN} - 254$$

$$Q = \frac{(P - 0.3S)^2}{(P + 0.7S)}$$

Q...površinski odtok (mm)

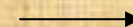
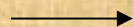
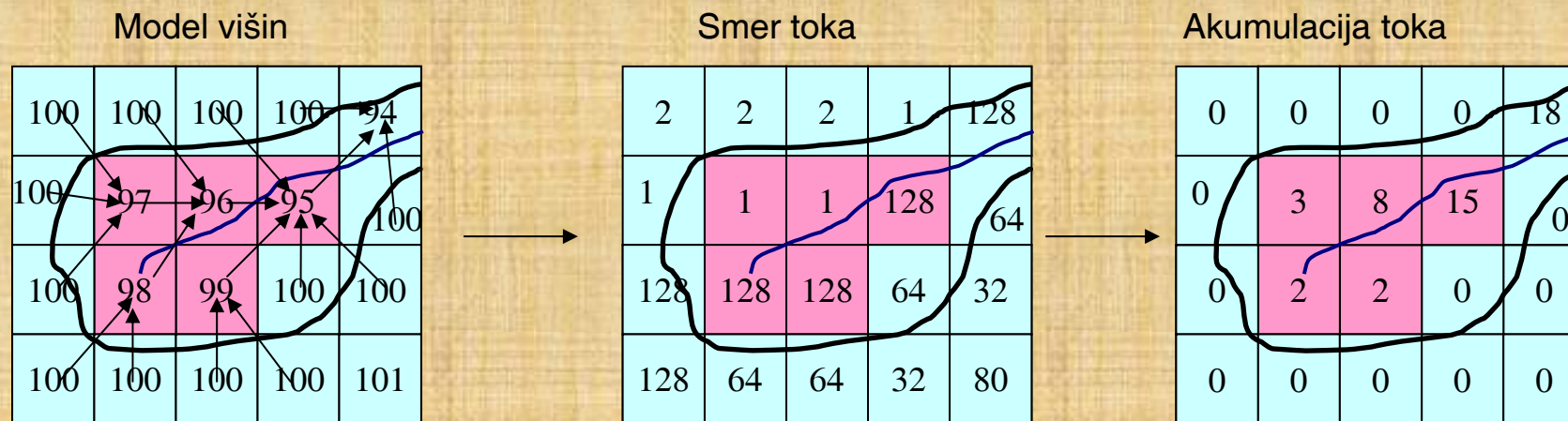
P...padavine (mm)

S...infiltracija

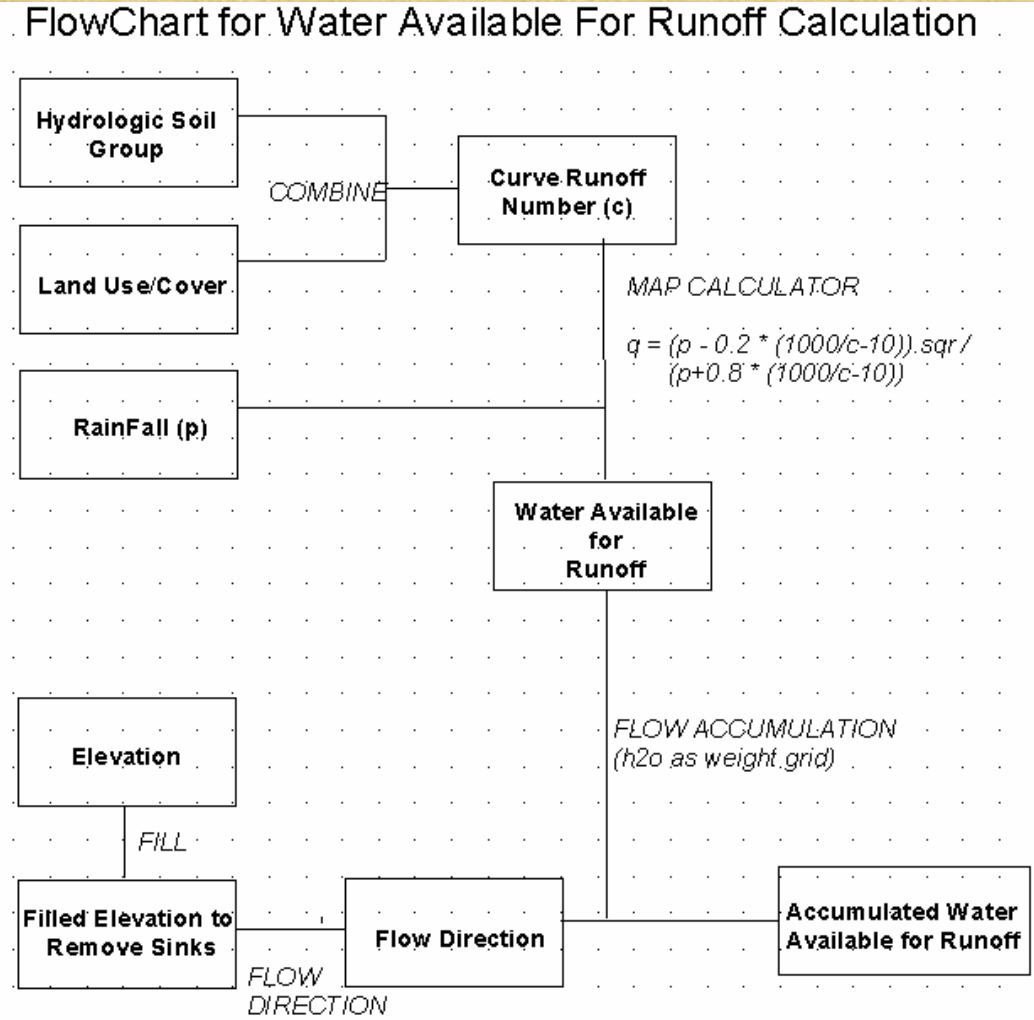
CN...curve number (tabelirano)

Land Use Description	Hydrologic Soil Group			
	A	B	C	D
Cultivated land:				
without conservation treatment	72	81	88	91
with conservation treatment	62	71	78	81
Feature or range land:				
poor condition	68	79	86	89
good condition	39	61	74	80
Meadow:				
good condition	30	58	71	78
Wood or forest land:				
thin stand, poor cover, no mulch	45	66	77	83
good cover	25	55	70	77
Open spaces, lawns, parks, golf courses, cemeteries, etc.:				
good condition: grass cover on 75% or more of area	39	61	74	80
fair condition: grass cover on 50% to 75% of area	49	69	79	84
Commercial and business areas (85% impervious)	89	92	94	95
Industrial districts (72% impervious)	81	88	91	93
Residential:				
Average lot size Average % of Impervious				
1/8 acre or less 65	77	85	90	92
1/4 acre 38	61	75	83	87
1/3 acre 30	57	72	81	86
1/2 acre 25	54	70	80	85
1 acre 20	51	68	79	84
Paved parking lots, roofs, driveways, etc.	98	98	98	98
Streets and roads:				
paved with curbs and storm sewers	98	98	98	98
gravel	76	85	89	81
dirt	72	82	87	89

MODELIRANJE POVRŠINSKEGA ODTOKA V OKOLJU GIS (Pridobivanje podatkov za hidrološki model)



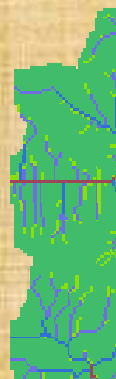
MODELIRANJE POVRŠINSKEGA ODTOKA V OKOLJU GIS (Shema hidrološkega modela)



MODELIRANJE POVRŠINSKEGA ODTOKA V OKOLJU GIS

(Rezultati hidrološkega modela v porečju Idrijce)

- **Rezultat hidrološkega modela je karta, katere celice (površine 25x25m) predstavljajo višino akumuliranega površinskega odtoka**
- **Metoda je enostavna in učinkovita: edini potreben vhodni podatek je količina padavin**
- **Omogoča napovedovanje odtoka vode v poljubni točki drenažnega sistema**
- **Možen je izračun količine odplavljenega Hg v primeru nevihte (t.i. storm event) pri podani količini padavin in koncentraciji Hg v poljubni točki sistema**



NAČRTI ZA NADALJNE DELO

- **Validacija erozijskega modela z meritvami Cs¹³⁷ v prsteh (območja erozije, transporta in depozicije)**
- **Validacija modela površinskega odtoka vode z rezultati meritev koncentracij različnih oblik Hg v lizimetrih**
- **Uporaba novejših procesno utemeljenih erozijskih modelov (npr. WEPP) in primerjava z obstoječimi modeli**
- **Izboljšanje geokemičnega dela obeh modelov**
 - **speciacija in frakcionacija Hg v prsti in vodni raztopini (THg, Hg⁰, MeHg, vodotopne oblike, Hg vezan na organsko snov...)**
 - **Primerjava rezultatov pridobljenih z eksperimenti v laboratoriju in na terenu**
 - **Hg vezan na različne teksturne razrede v prsti (glina, melj, pesek)**
 - **Hg v globinskem profilu (humusni sloj, mineralna podlaga)**
 - **Transport Hg po pobočju**
 - **Geokemijske pretvorbe Hg v povezavi s parametri, ki vplivajo na kemijo in transport živega srebra v tleh (% organske snovi, DOC, SO₄²⁻, Cl⁻, izotopska sestava O, C ter N)**

ZAKLJUČKI

- **GIS se je izkazal kot zelo primerno orodje pri modeliranju prostorsko pogojenih procesov kot sta erozija in hidrologija v porečju.**
- **Tako pridobljeni podatki se lahko vključijo v kompleksnejše hidrološke modele (npr. MIKE SHE, HEC-RAS, RIVMOD...). To je zlasti pomembno na območjih kot je porečje Idrijce, kjer ni zadostnega števila merskih postaj (pretokov, meteoroloških parametrov...)**
- **Kompleksni okoljski procesi kot sta erozija in hidrologija zahtevajo interdisciplinaren pristop. Pri modeliranju v okolju GIS se v Sloveniji pojavlja problem dostopnosti GIS podatkov, ki so v lasti različnih institucij.**
- **Modeliranje okoljskih procesov je primerno dopolnilo okoljskim meritvam, vendar eno brez drugega ni možno (zlasti v fazi validacije in kalibracije modelov).**
- **Pri modeliranju transporta Hg v porečju Idrijce je nujno potrebno izboljšati poznavanje kemije Hg v prsti in vodni raztopini ter nova znanja vključiti v obstoječe modele.**

1st MR O-2, April 19, 2006

3. Mass cycling in river catchments

3.3. Geochemical investigation of the Sava river basin: Stable isotope approach

Roland Markovics

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Nives Ogrinc

Supervisor at the university: Nives Ogrinc, Jožef Stefan International Postgraduate School

The goal of this research work was to get a broader and transparent overall picture of the hydrogeochemical dynamics, material transport processes and possible anthropogenic influences to the Sava river basin using major elemental, stable isotope, and hydrogeochemical tracers. The research is focused on the lower Sava river basin from the Croatian border (from Bregana) down to its confluence with the River Danube at Belgrade, Serbia. The sampling was and will be performed at a total of 25 locations, depending on various anthropogenic activities and the main tributaries of the river in October 2005 and April and September 2006. This presentation includes the evaluation of the first results from the sampling period in October 2005.

We can observe differences, changing trends in natural (climate, precipitation, bedrock, soils, vegetation) and direct anthropogenic (land-use, industry, population, water and waste water management, agriculture) influences moving along the lower Sava down to its confluence. The first results indicate that the lower Sava watershed is influenced not only by weathering processes, but also by other effects, mainly human activities, which are reflected in the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ratio and $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ values. Further, biological and biochemical processes are probably more dominant than in the upper course of the Sava, driven by transport and transformation processes. Higher concentrations of NO_3^- ions are observed in Croatia reaching up to 7.39 mg/l which could indicate the influence of agricultural activities, while the highest concentrations of SO_4^{2-} , Na^+ and Cl^- ions were determined in the river Bosna, the main tributary of the river Sava. The Bosna seems to be the most polluted tributary of the river Sava. Therefore, more analyses will be performed on this river, including $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ measurements in order to determine the possible source of sulfate pollution.

There are some results on the behaviour of riverbed sediment and rivershore soils to be evaluated to draw up the trends and observations. Later, all obtained data will be statistically evaluated in order to determine the influence of geological, biological and human factors in the Sava river basin.

Further directions of the investigation are:

- Detailed particulate attributes (physico-chemical properties of sediments)
- Investigations of interaction and material transport channels between water-sediment-river bank soil
- Environmental buffer capacity of soil-sediment interface (humus properties, quality)
- Trace metal and nutrient transport between Sava water-particulates-sediments-soils
- Organic and inorganic carbon content and mass balance between water, particulates and sediments
- Identification of anthropogenic influences (nitrate, sulphate, chloride levels and their relationship with human activities)
- Modelling (statistical methods, special modelling program)

A scenic view of a riverbank. On the left, a large, dark tree trunk stands prominently. To its right, a smaller tree with green leaves leans over the water. In the foreground, a wooden boat is docked at the shore. The background shows a wide river under a blue sky with light clouds. The text is overlaid on this scene.

Geochemical investigation of the lower Sava river basin: Stable isotope approach

Evaluation of results of sampling fall 2005

Roland Markovics, 2nd year student

Supervisor: Dr. Nives Ogrinc

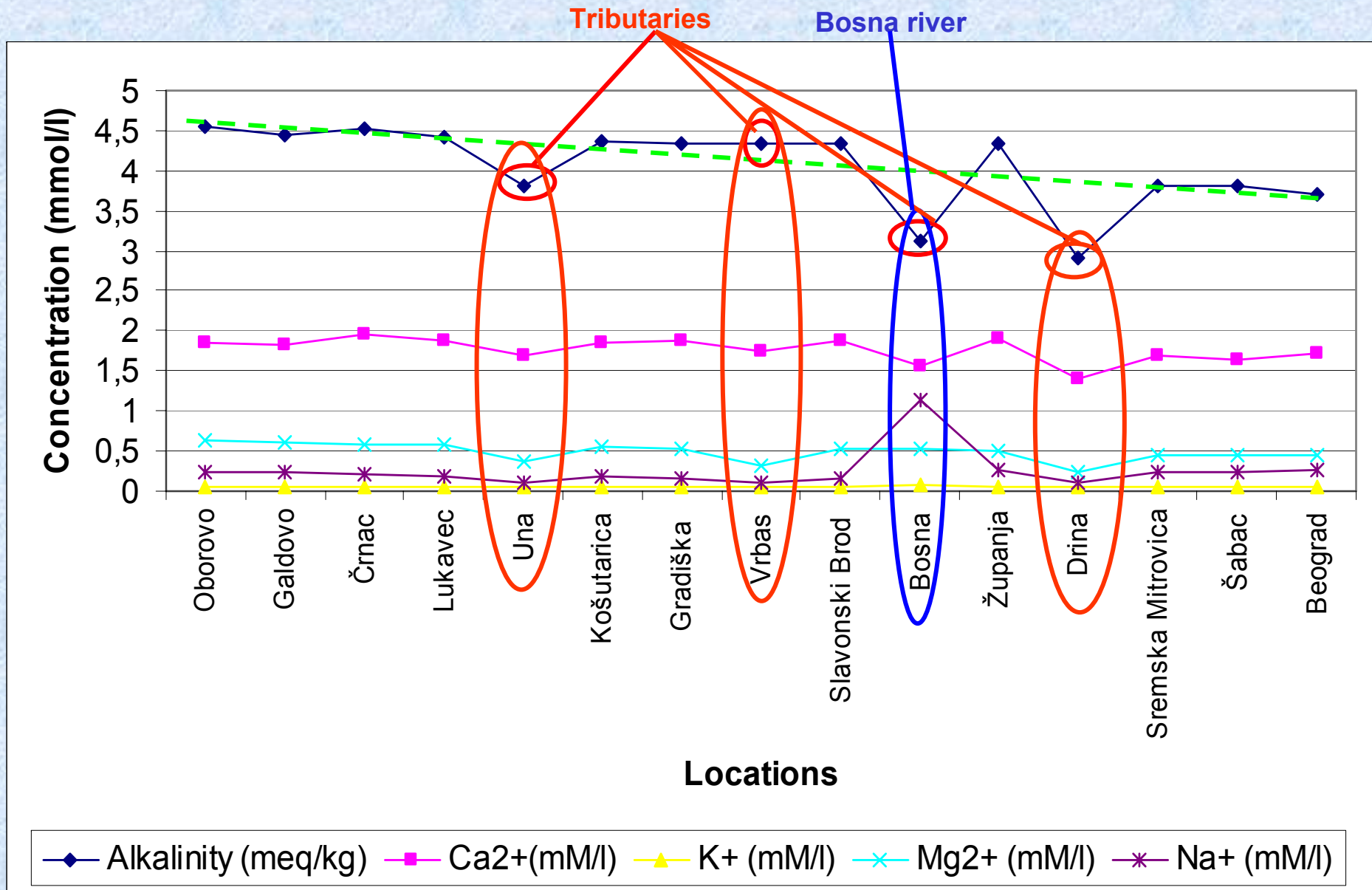
19. April 2006

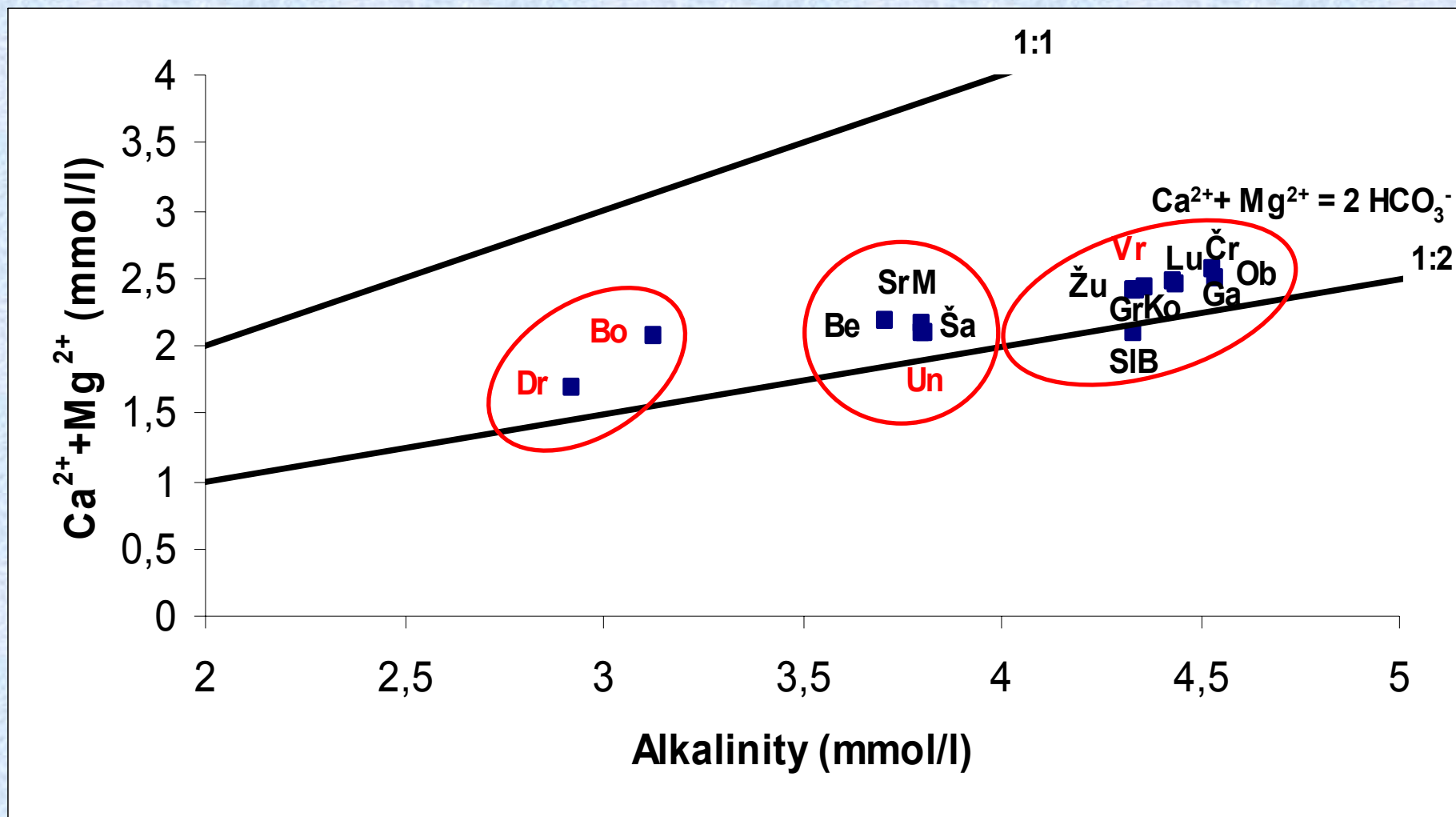
Short introduction of the examined area

- 15 allocated sampling locations from Croatian border till Belgrade confluence with Danube (Cro, Cro/BiH, BiH and SM), sampling was performed 18-19 Oct. 2005
- Pannonian (continental) climate, descending annual precipitation (Cro: 1000-600 mm, BiH: 900-700 mm, SM: 700 -600 mm)
- Flat regions, decreasing elevation (at SI/CRO border 130m, at CRO/BiH border 86,8 m, at BiH/SM border 83 m, at mouth 74,4 m) ->hydrogeochemical infl.
- Pannonic fluvial-alluvial sediment bedrock (Cro: alluvial terrain with fertile cover, BiH: sandy-gravel deposits, SM: sands and silty clays, sandy gravels & some igneous rocks) ->hydrogeochemical infl.
- Fertile fluvo- and mesosoils are dominating->hydrogeochemical infl.
- Agricultural land-use dominated areas (Cro: 40%, BiH: 30%, SM:100%) ->anthropogenic infl.
- Influence of industrial activity areas (metal, chemical, food, leather, paper, oil industry branches) ->anthropogenic infl.
- Variable population density (70-200 head/km²)-> anthropogenic infl.

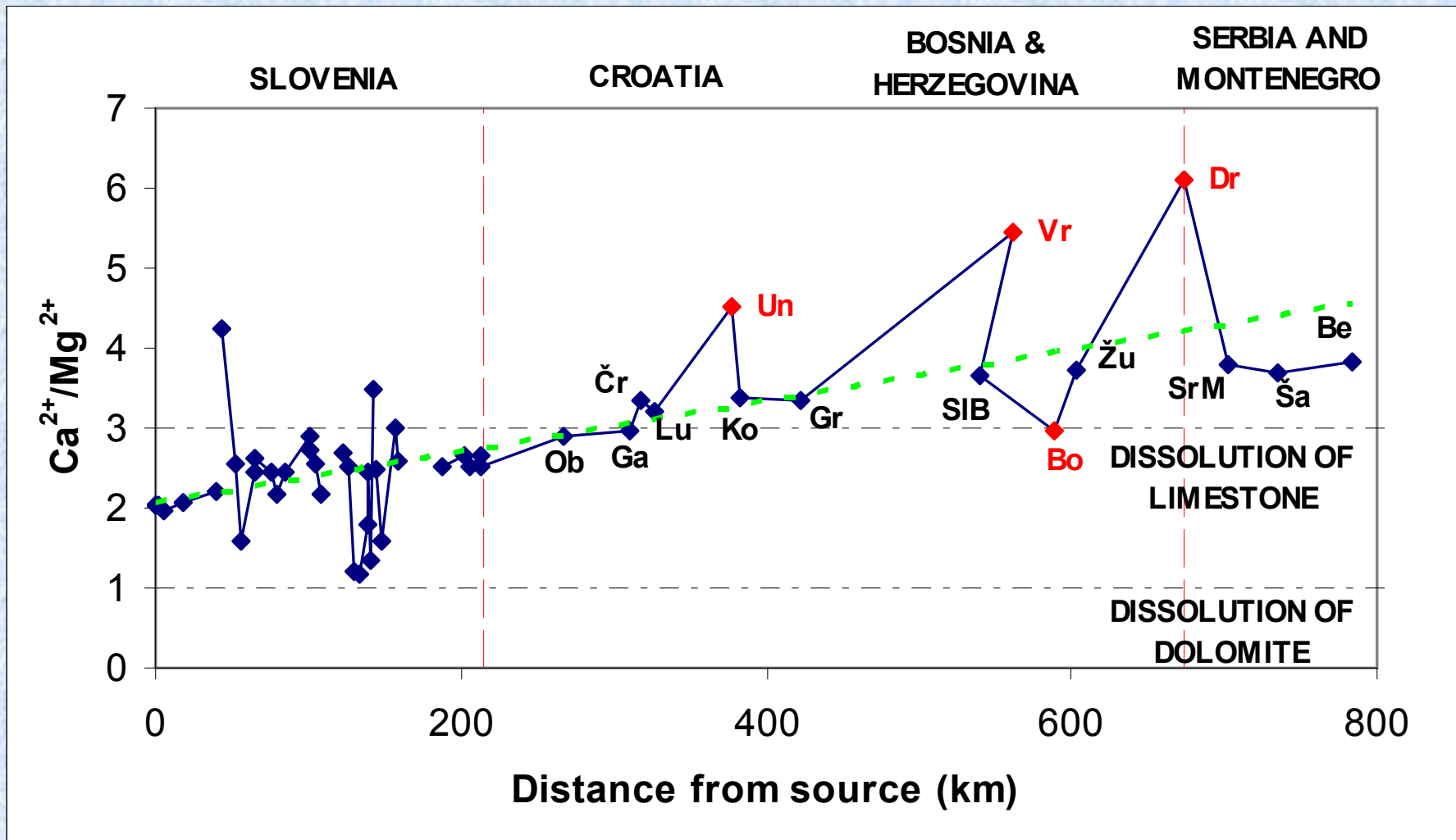


Geochemical conditions

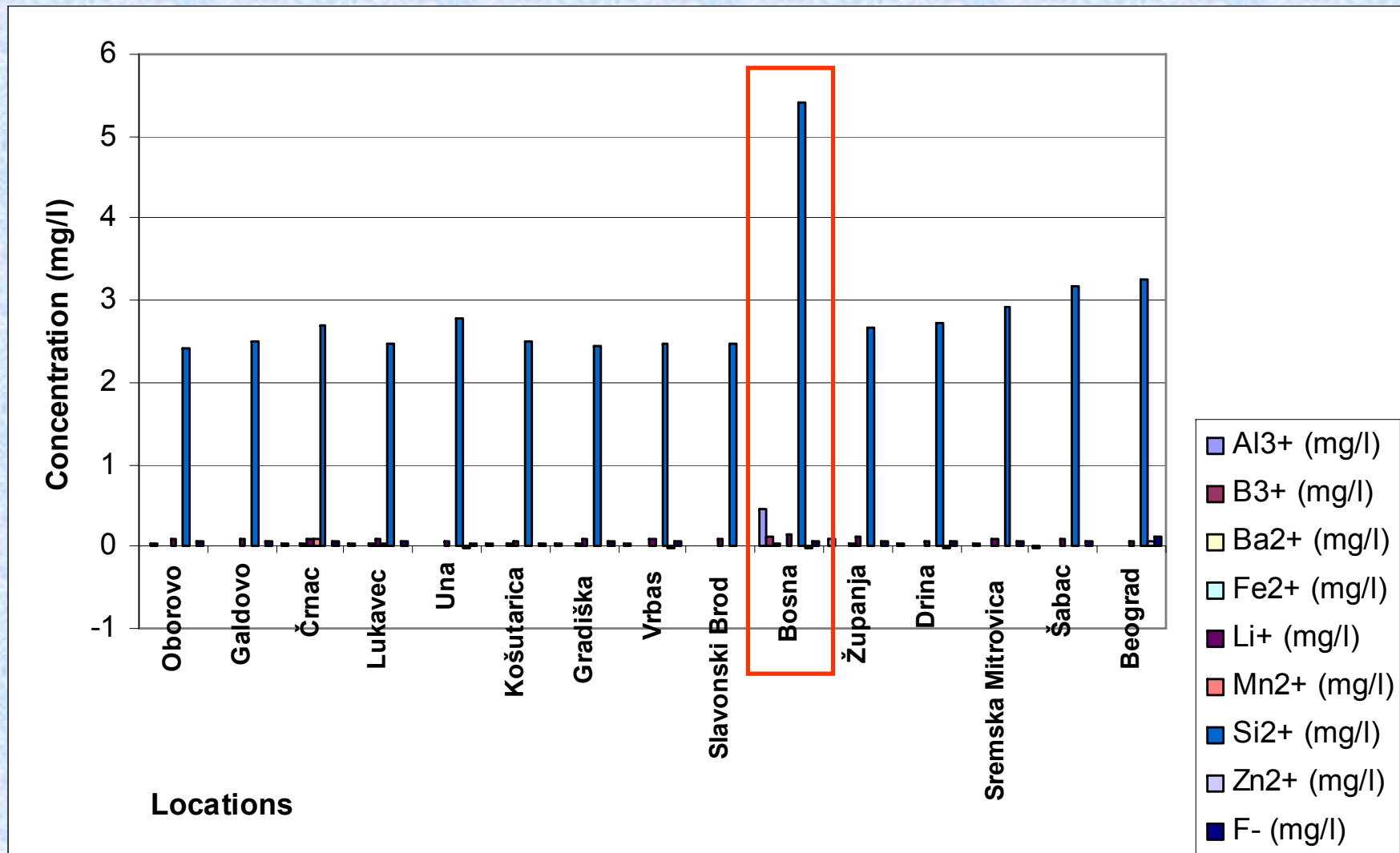




Ob.:Oborovo, Ga.:Galdovo, Čr.:Črnac, Lu.:Lukavec, Un.:Una, Ko.:Košutarica
 Vr.:Vrbas, SIB.:Slavonski Brod, Bo.:Bosna, Žu.:Županja, Dr.:Drina,
 SrM.:Sremska Mitrovica, Ša: Šabac, Be.:Beograd

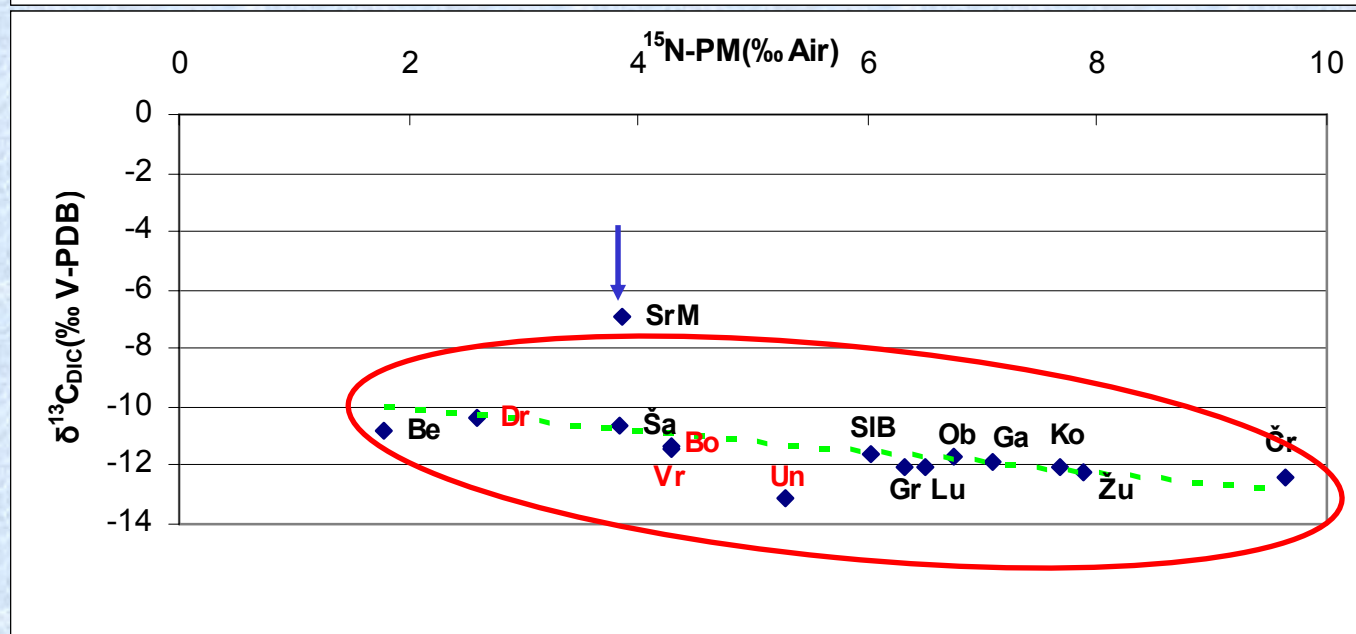
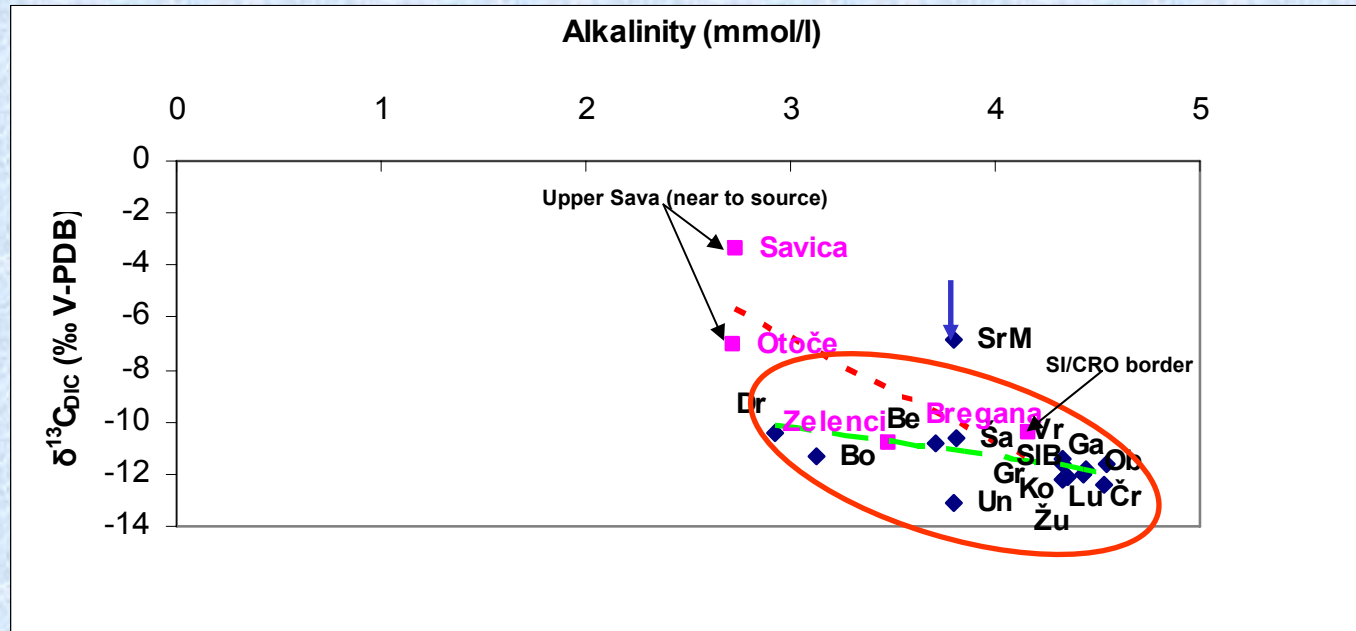


Ob.:Oborovo, Ga.:Galdovo, Čr.:Črnac, Lu.:Lukavec, Un.:Una, Ko.:Košutarica
 Vr.:Vrbas, SIB.:Slavonski Brod, Bo.:Bosna, Žu.:Županja, Dr.:Drina,
 SrM.:Sremska Mitrovica, Ša: Šabac, Be.:Beograd

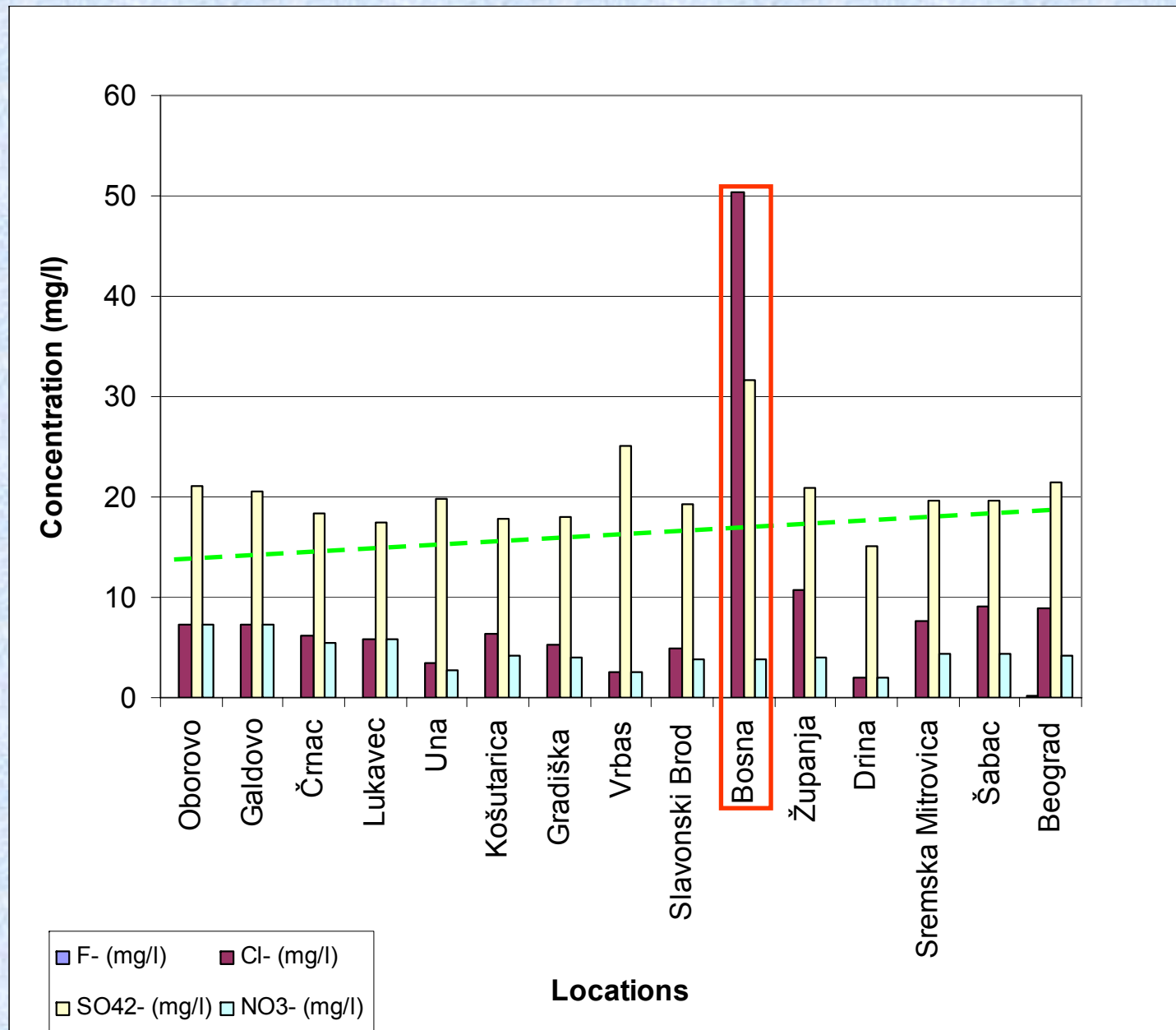


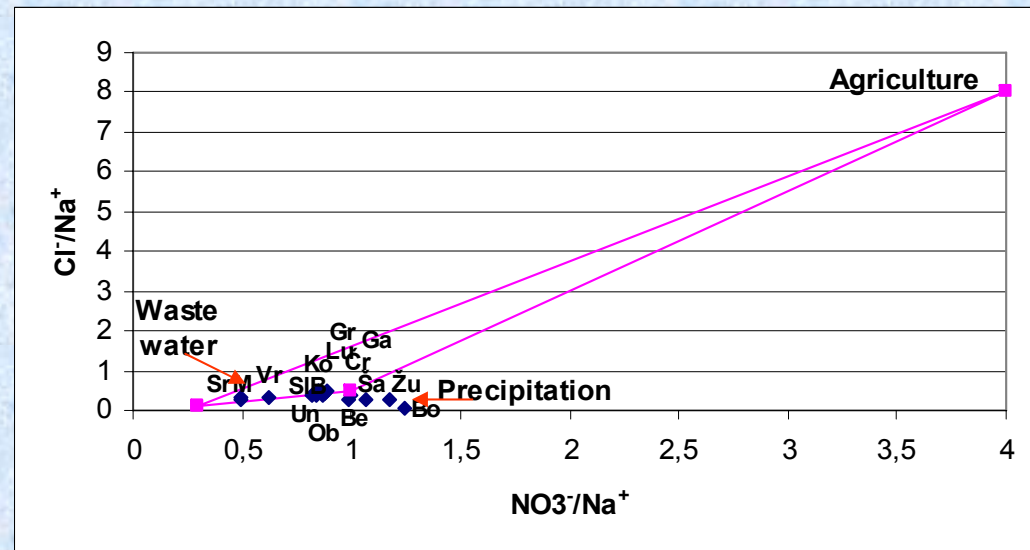
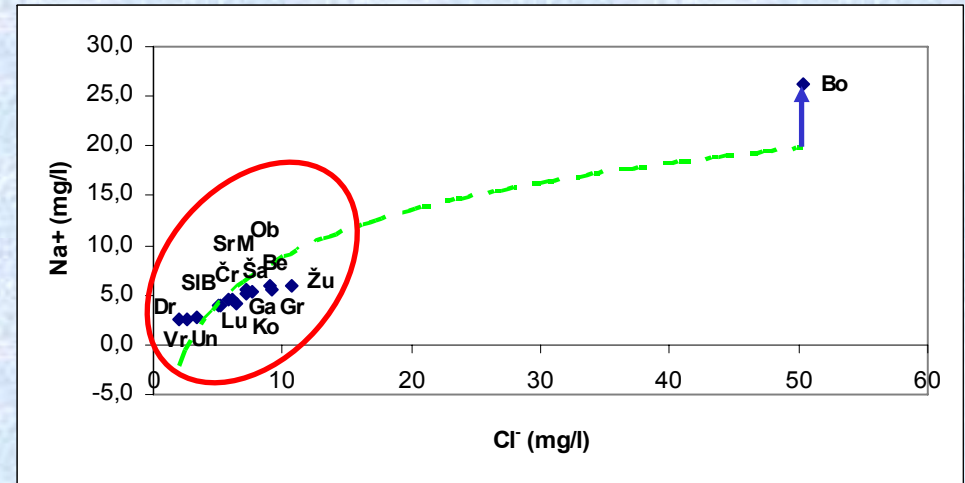
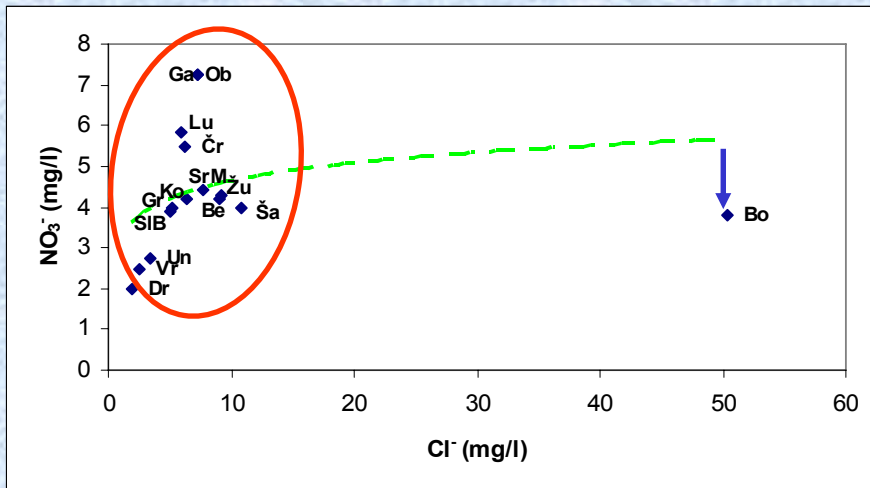
Tracing processes with stable isotopes

- Ob.: Oborovo
- Ga.: Galdovo
- Čr.: Črnac
- Lu.: Lukavec
- Un.: Una
- Ko.: Košutarica
- Vr.: Vrbas
- SIB.: Slavonski
Brod
- Bo.: Bosna
- Žu.: Županja
- Dr.: Drina
- SrM.: Sremska
Mitrovica
- Ša.: Šabac
- Be.: Beograd

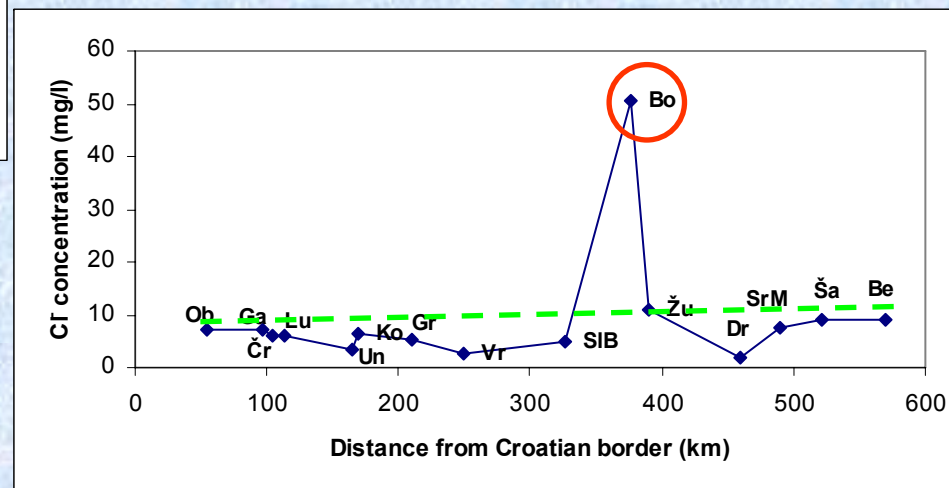
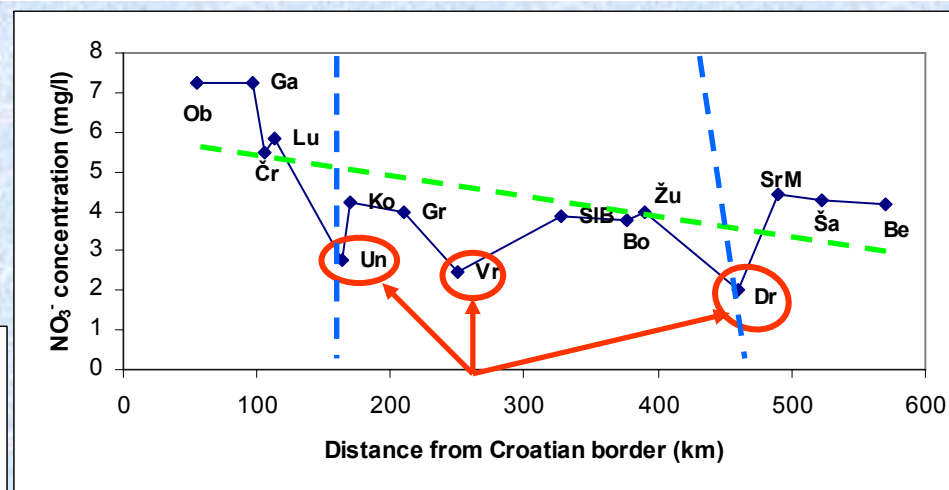
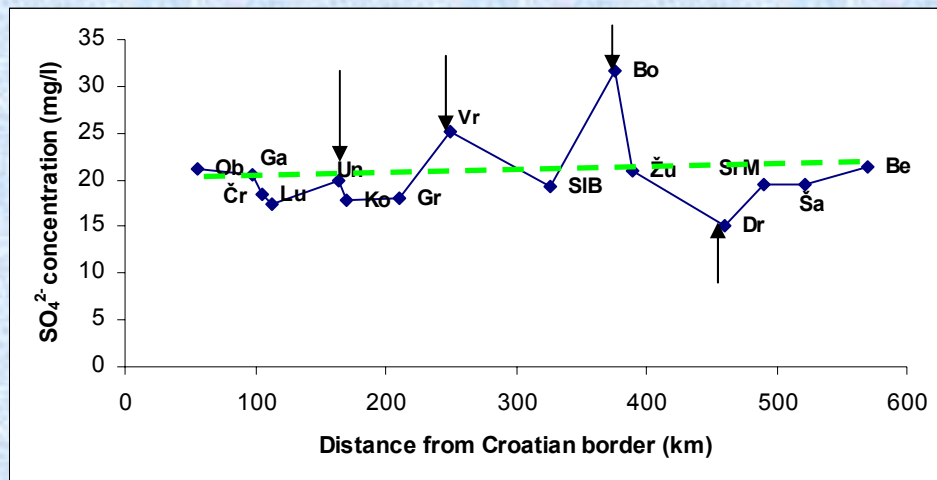


Anthropogenic influences on lower Sava





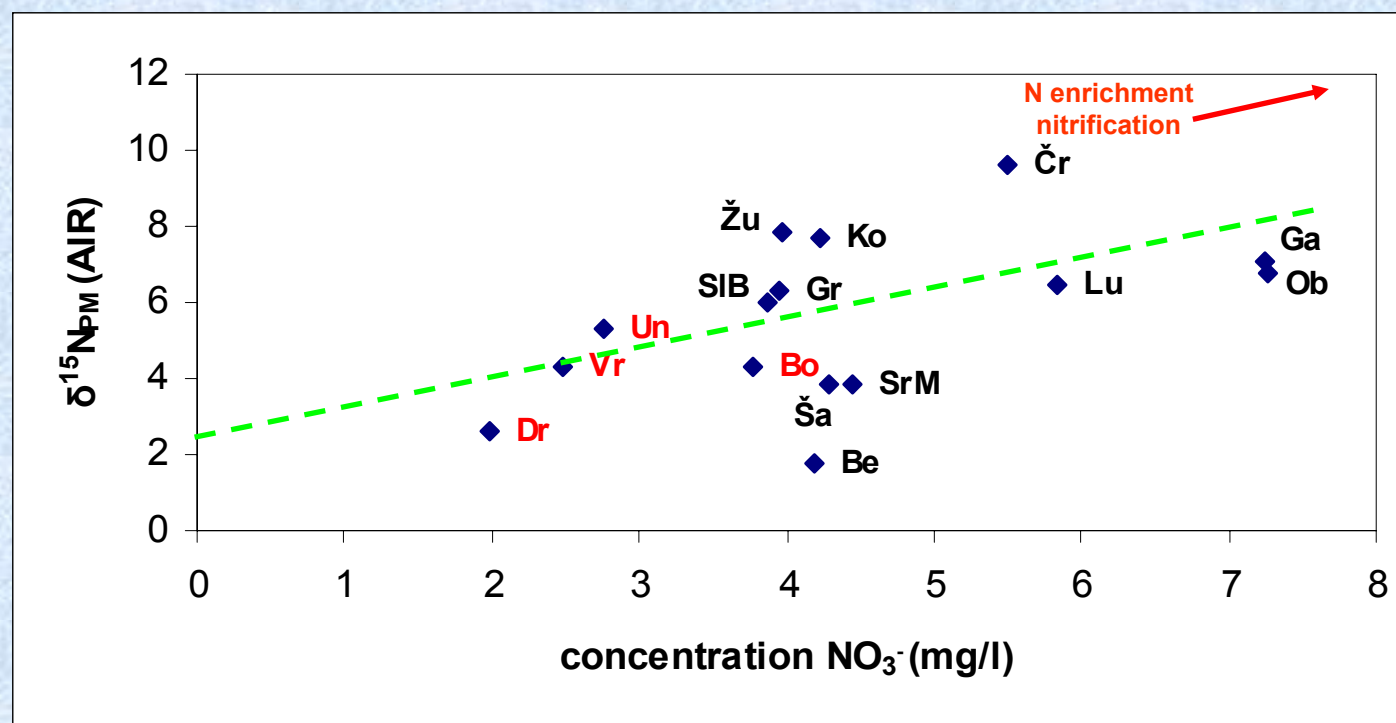
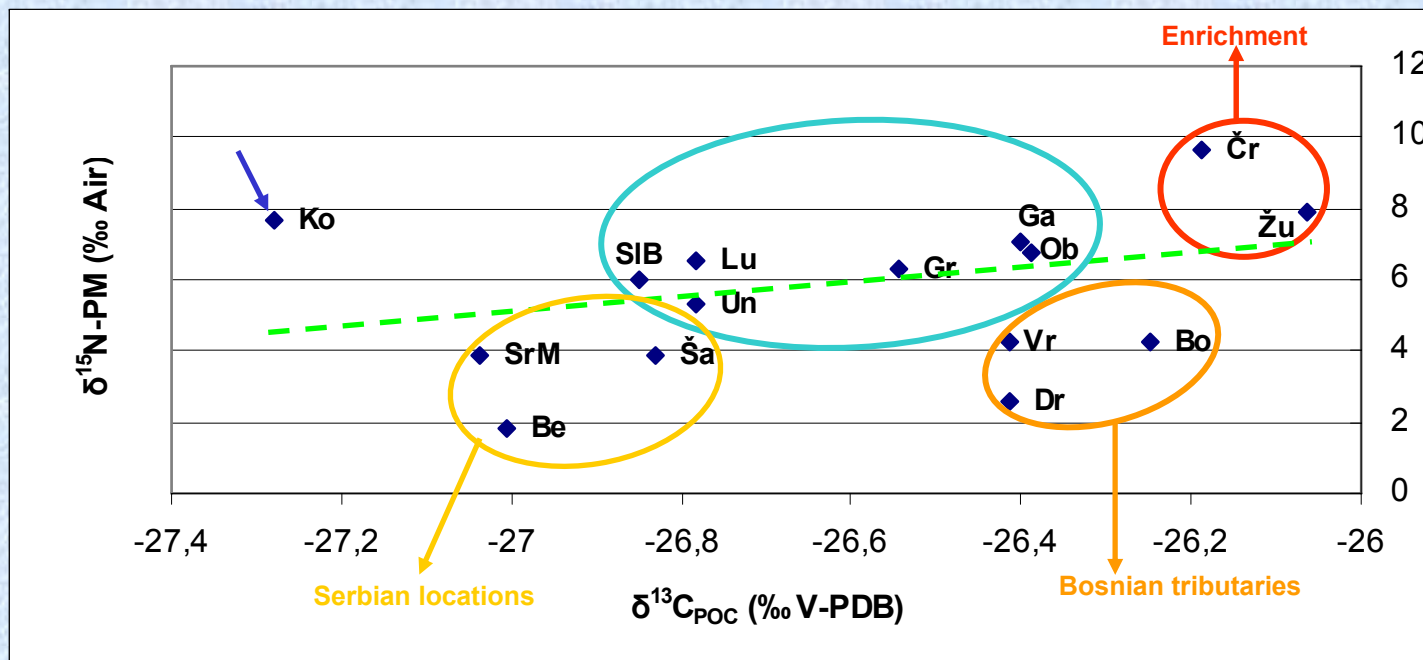
Ob.:Oborovo, Ga.:Galdovo, Čr.:Črnac, Lu.:Lukavec, Un.:Una, Ko.:Košutarica
 Vr.:Vrbas, SIB.:Slavonski Brod, Bo.:Bosna, Žu.:Županja, Dr.:Drina,
 SrM.:Sremska Mitrovica, Ša: Šabac, Be.:Beograd



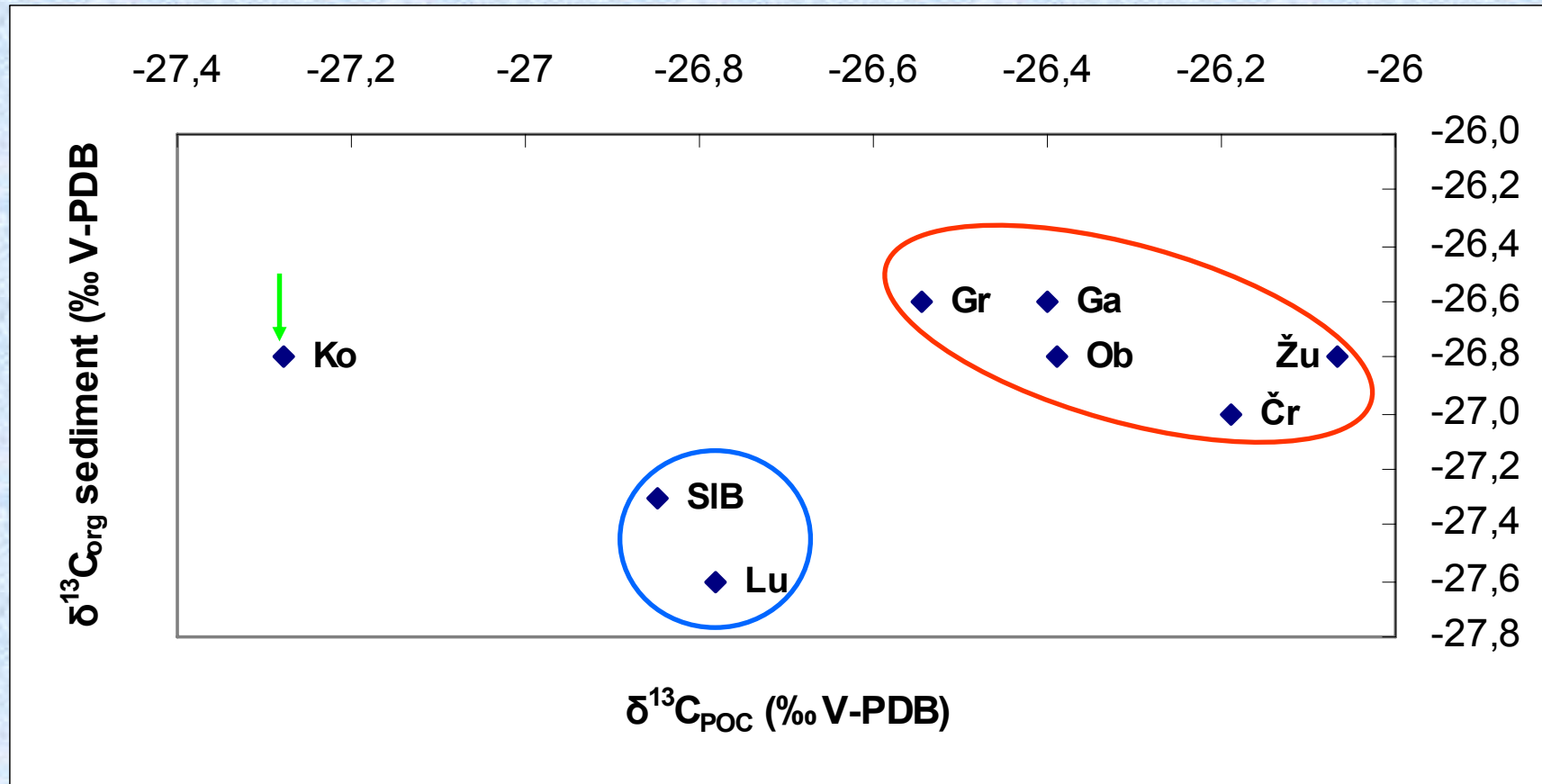
Ob.:Oborovo, Ga.:Galdovo, Čr.:Črnac, Lu.:Lukavec, Un.:Una, Ko.:Košutarica
 Vr.:Vrbas, SIB.:Slavonski Brod, Bo.:Bosna, Žu.:Županja, Dr.:Drina,
 SrM.:Sremska Mitrovica, Ša.:Šabac, Be.:Beograd

Suspended particles

Ob.: Oborovo
 Ga.: Galdovo
 Čr.: Črnac
 Lu.: Lukavec
 Un.: Una
 Ko.: Košutarica
 Vr.: Vrbas
 SIB.: Slavonski
 Brod
 Bo.: Bosna
 Žu.: Županja
 Dr.: Drina
 SrM.: Sremska
 Mitrovica
 Ša.: Šabac
 Be.: Beograd



Riverbed sediments



Conclusion

- The lower part of Sava watershed is less influenced by geochemical conditions than upper part
- Anthropogenic activities and land-use are the main influencing powers and source of pollution
- Tributaries are the main vectors of influence effect
- River Bosna basin probably is the most anthropogenically exposed tributary basin in the examined area

Future investigation plans

- Geological, geoecological point of view of the lower basin
- Detailed particulate attributes (physico-chemical properties of sediments)
- Investigate interaction and material transport channels between water-sediment-river bank soil
- Environmental buffer capacity of soil-sediment connection (humus properties, quality)
- Trace metal and nutrient transport between Sava water-particles-sediments-soils
- Organic and inorganic matter content and mass balance (DIC, DOC) between water, particles and sediments
- Identification of anthropogenic influences (nitrate, sulphate, chlorine levels and relationship of them with human activities)
-> *especially focusing on tributaries*
- Setting up model of seasonal variation of dissolved material content
- Modeling (using statistical methods to evaluate data)

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

4. Ocena vplivov na okolje

4.1. Industrijsko tveganje in upravljenje z okoljem

Davor Kontić

Institutska mentorica: Nives Ogrinc

Fakultetni mentor: Mladen Franko, Fakulteta za podiplomski študij, Univerza v Novi Gorici

Namen tega prispevka je opozoriti na nastajajoče konflikte v postopkih upravljanja okolja za dejavnosti, ki so opredeljene kot potencialni vir nevarnosti (tveganja). Prispevek se osredotoča na upravljanje okolja kot orodja za doseganje skladnosti v okolju s poudarkom na težavah in problemih, ki ob tem nastajajo.

Prostorsko planiranje oziroma upravljanje z okoljem je usklajevanje nasprotujočih si interesov v prostoru in kot tako dodobra zasidrano v slovenski praksi. Pri tem je poudarek usmerjen k maksimiranju dobička in obenem minimiziranju negativnih vplivov na okolje rednega obratovanja dejavnosti (npr. kontinuirane emisije snovi, hrupa, ipd.). Z eksplozijo potrošništva družbe, in s tem povezanim povečanjem proizvodnih in distribucijskih dejavnosti, je v zadnjem času vzknil nov vir vplivov na okolje – izredni dogodki, predvsem v industrijskem sektorju, z nezaželenimi posledicami na okolje – industrijske nesreče. Vplivi oziroma posledice, katerih viri so izredni dogodki v procesni industriji so postali, poleg vplivov rednega obratovanja dejavnosti (npr. kontinuirane emisije snovi), pomemben dejavnik pri varstvu in upravljanju okolja. Ta v preteklosti ni bil vključen v analize vplivov na okolje, zato je optimizacijski del planerskega procesa (tehnološki, predvsem pa prostorski) obšel tovrstne postopke. Posledice slednjega se kažejo v več tisoč žrtvah izida večjih nesreč v svetu v zadnjih desetletjih. To podpira dejstvo, da se v svetovni industriji pripeti letno v povprečju kar 4900 primerov smrtnih žrtev (ena smrtna žrtev vsake dve uri) ter 7,6 milijonov poškodb. Materialna škoda oziroma stroški incidentov znašajo med 2,8 in 3,6 % BDP.

Glavni vzrok za nastalo situacijo je ne-vključevanje ocenjevanja tveganja v postopek prostorskega planiranja – okoljevarstvene presoje v postopku so bile osredotočene primarno na vplive rednega obratovanja. Postopna tovrstna praksa je pripeljala do konfliktnih rab prostora v bližini nevarnih obratov. Razlog za slednje je predvsem v neustrezni metodologiji ocenjevanja tveganja in pristopu prostorskega planiranja (rezultati obstoječih metod za ocenjevanje tveganja niso uporabni v kontekstu prostorskega planiranja).

Ustrezno integracijo je moč doseči z razvojem metodologije za ocenjevanje tveganja, ki podaja rezultate uporabne za prostorsko planiranje – v kartografski obliki kazalnika ogroženosti na eni strani ter z modifikacijo obstoječih postopkov prostorskega planiranja na drugi strani. Na ta način je dosežena optimizacija, pomembno orodje v upravljanju z okoljem.

1st MR O-2, April 19, 2006

4. Assessment of environmental impact

4.1. Hazardous industrial installations and environmental management

Davor Kontić

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Nives Ogrinc


University supervisor: Mladen Franko, Graduate School, University of Nova Gorica

The focus of this research is existing conflicts in spatial/land-use planning for hazardous installations. These encompass the risks encountered by subjects and objects located in the vicinity of hazardous installations, as well as the aversion towards such installations, which stems from the fact that impact zones of incident scenarios often greatly exceed the installation's premises. The consequent outcomes (mortality, injuries, structural damage), therefore cover a much vaster area than the close vicinity of an installation.

Environmental management is negotiation of conflicting interests in space and is well established in Slovene planning practise. Hereby the main idea is to maximise the income from a certain activity while minimising potential negative effects of continuous point-source pollution to the environment (emissions, noise, etc.). However, recently a new category of environmental nuisance has evolved – accidents involving hazardous substances. The consequences of the latter events have become, beside normal operation-associated nuisances, an important issue in environmental protection and management. These factors have not been implemented in environmental impact assessment, therefore the optimisation aspect of allocating such establishment was absent from administrative procedures. The consequences of such events are several thousand casualties in the last decades. This is supported by the fact that in world industry there annually occur on average 4900 casualties (one casualty every two hours) and approximately 7.6 million injuries. Material damage averages between 2.8 and 3.6 % of gross production annually.

The main cause for the occurrence of conflicts is the absence of integration between risk assessment and spatial planning. In the past, the impact zones of incident scenarios have not been taken into consideration as one of the important factors in spatial planning, as opposed to the nuisance associated with normal operation of the installations (for ex. continuous point-source pollution). This resulted in development of conflict land-uses in the immediate vicinity of hazard sources, i.e. into the incident impact zones. The main reason for this was the lack of integration potential in risk assessment methodology and spatial planning methodologies (results of risk assessment not being useful in spatial planning).

The approach required for successful integration of risk assessment and spatial planning is to present the risk assessment results in a spatially comprehensive form (threat index map) and modification of the spatial/land-use planning procedure, with the goal of intermediate control in the phase of determining the most suitable location for the proposed project; in this manner spatial optimisation is achieved.



Industrijsko tveganje in upravljanje z okoljem



Davor Kontić

Dan MR, Institut Jožef Stefan



Problem

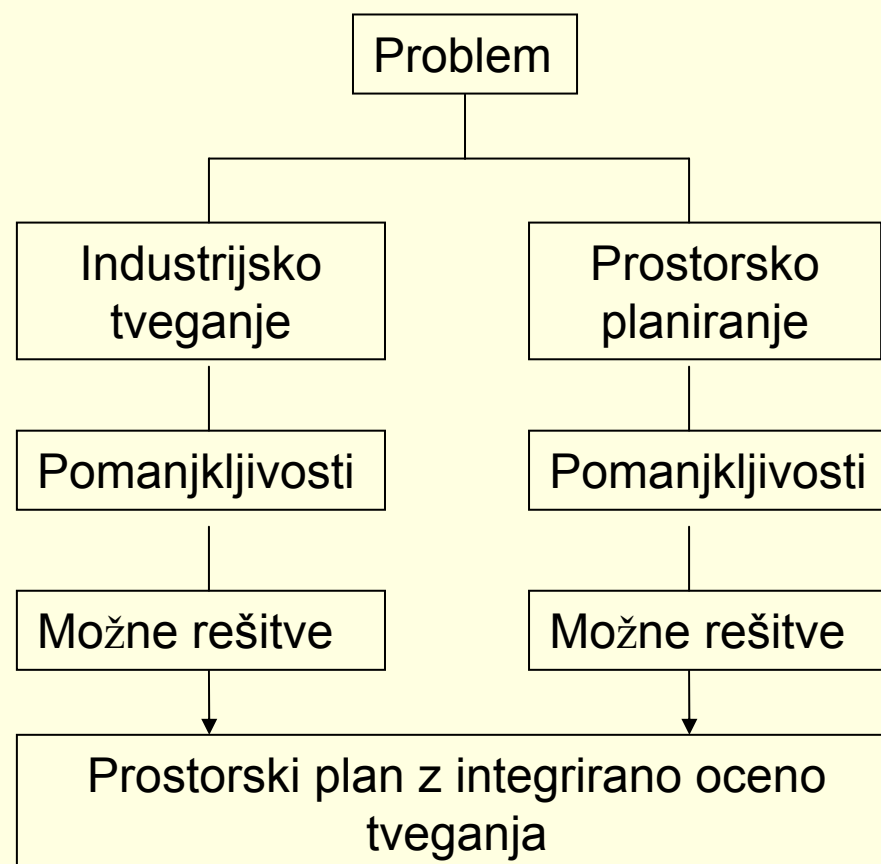
- Pretekle nesreče – vzrok je neustrezna prostorska razmestitev nevarnih dejavnosti – pomanjkljivosti v prostorskem planiranju (industrijsko tveganje je novo področje v upravljanju z okoljem)
- Neučinkovito povezovanje ocenjevanja tveganja in prostorskega planiranja (ni meril, izhodišč)
- Značilnosti nevarnih dejavnosti in izguba kontrole nad njimi

Hipoteza

Uspešna integracija ocenjevanja industrijskega tveganja in prostorskega planiranja temelji na:

- Rezultatih analize tveganja, ki so uporabni v postopku načrtovanja namenske rabe prostora
- Modifikaciji obstoječih pristopov načrtovanja namenske rabe prostora – prostorskega planiranja

Pristop



Industrijsko tveganje

Tveganje = f (nevarnost, izpostavljenost → posledice)

Tveganje = f (inteziteta izrednega dogodka, ranljivost)

Postopek ocenjevanja tveganja za nevarne industrijske obrate za potrebe prostorskega planiranja:

a) določanje velikosti vplivnega območja

b) ugotavljanje ranljivosti okoljskih sestavin v vplivnem območju

(c) dogovor o varstvenem režimu v vplivnem območju

(d) optimizacija in odločanje o sprejemljivosti posledic potencialnih nesreč – sprejem prostorskega plana

Industrijsko tveganje

PROBLEM / POMANJKLJIVOSTI

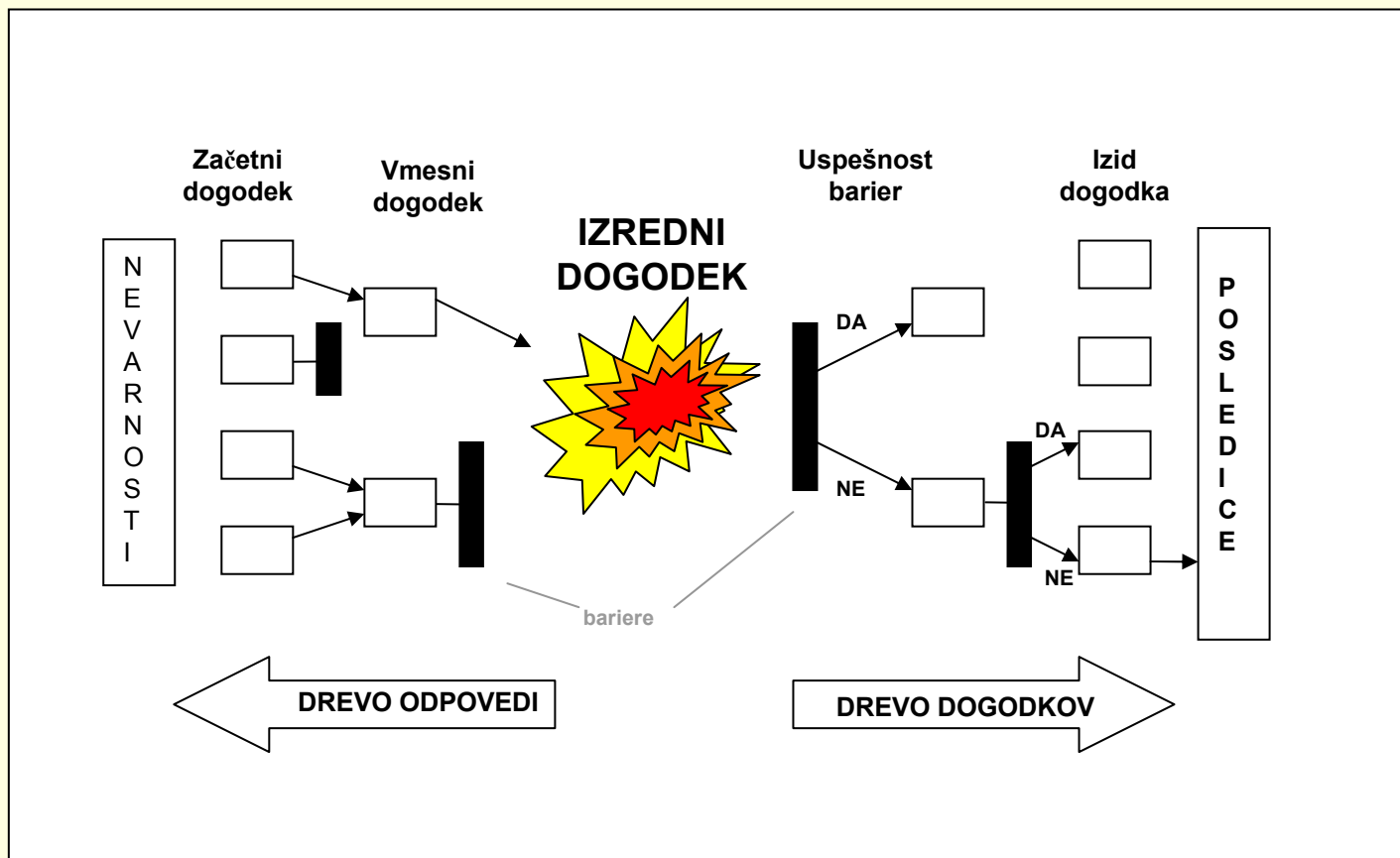
- Pridobivanje znanja o možnih vplivih (izrednih dogodkih)
- Prilagoditev rezultatov in metode ocenjevanja tveganja za potrebe prostorskega planiranja – indeks ogroženosti
- Ni meril, kriterijev, izhodišč, ki bi opisovali tveganje za potrebe prostorskega planiranja

Industrijsko tveganje

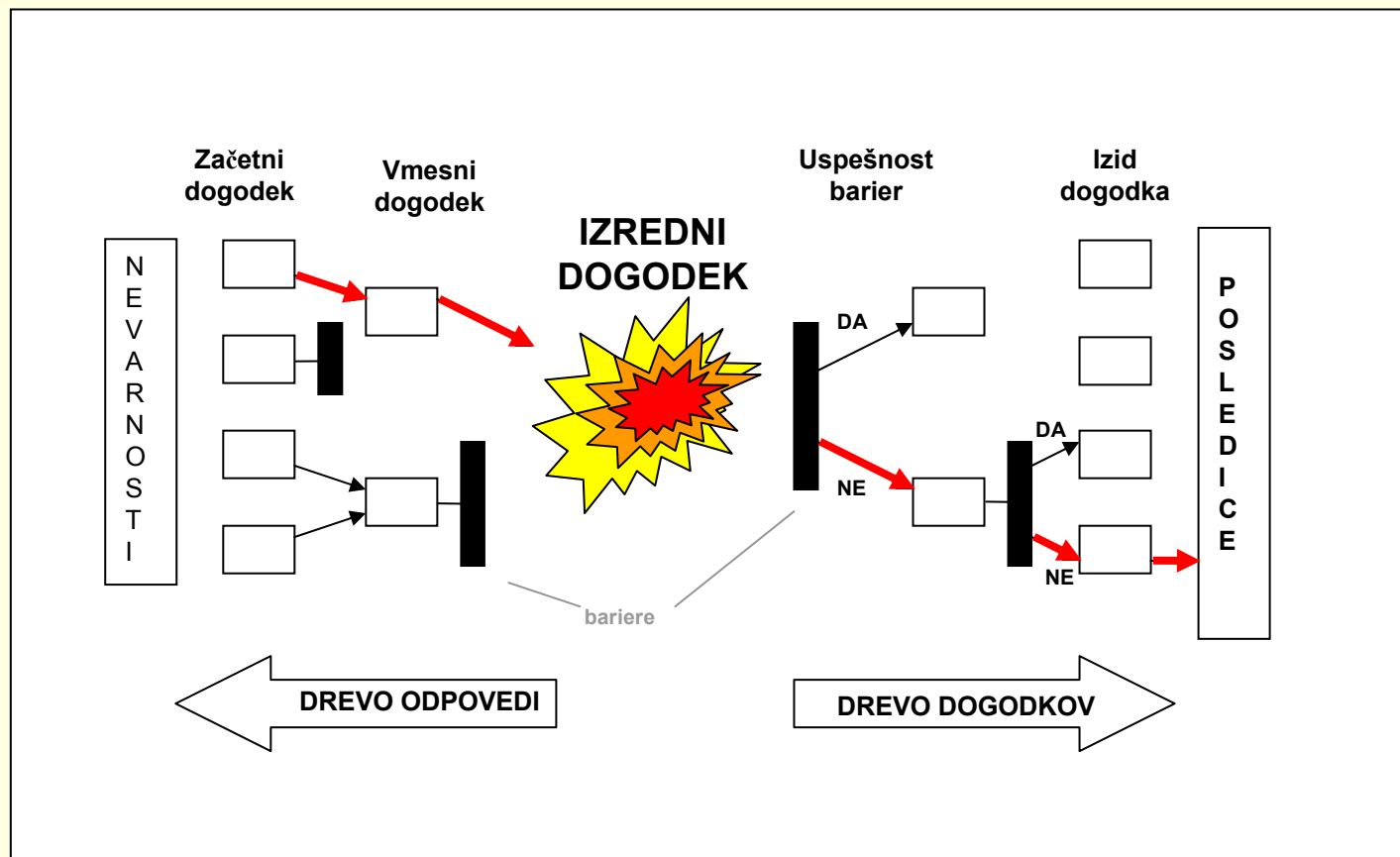
PRIDOBIVANJE ZNANJA O MOŽNIH VPLIVIH - DOLOČANJE VPLIVNEGA OBMOČJA

- V splošnem se obravnavajo eksplozije, požari in izpusti nevarnih snovi.
- Za vsak takšen dogodek se oceni (izračuna) vplivno območje posledic, upoštevajoč vrsto in količino snovi ter pogoje, pri katerih pride do izpusta (v zrak, vode), požara eksplozije.
- Verjetnost – psihološki vidik; zmanjševanje tveganja
- Analiza scenarijev, analiza občutljivosti

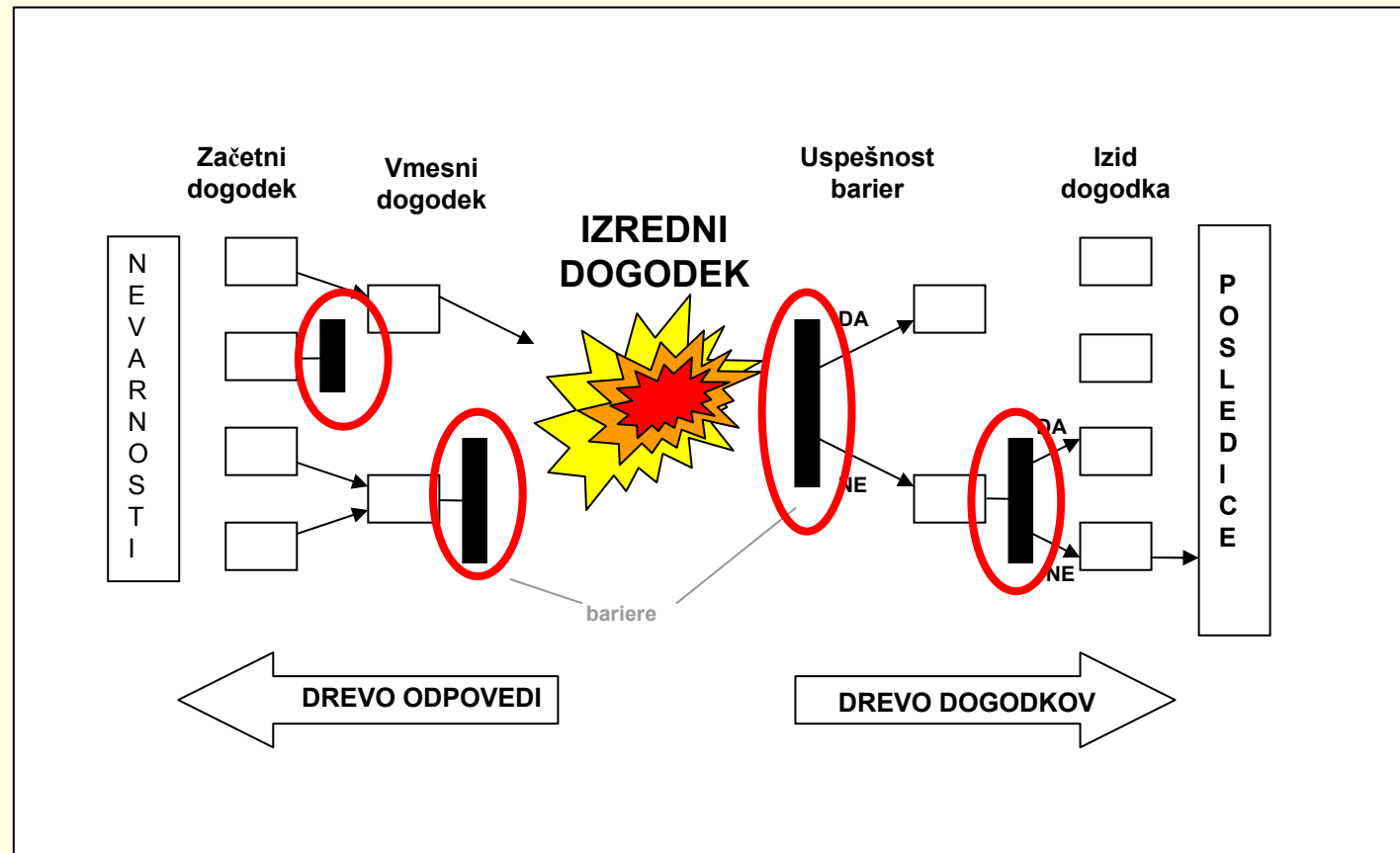
Industrijsko tveganje



Industrijsko tveganje



Industrijsko tveganje



Industrijsko tveganje

ANALIZA RANLJIVOSTI OKOLJA

Potencial za nastanek negativnega vpliva na okolje, če bi se določena dejavnost / izredni dogodek realiziral.

Ranljivost se oceni za:

- populacijo (zaposleni v obratu, okoliški prebivalci)
- Okolje
- Materialne vrednote





DELAMARIS d.d., Izola

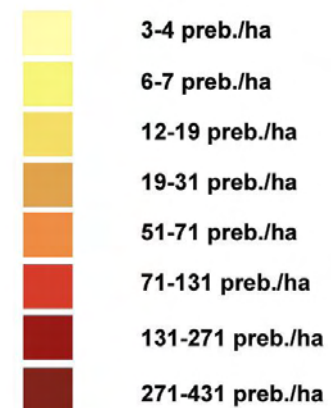
Karta vplivnega območja

M=1:17500

LEGENDA:

 Vplivno območje (r=200 m) za izpust amoniaka (100 g/s, trajanje 10 min); posledice so poškodbe dihalne sluznice, dihal, oči, kože, oteženo dihanje

 Vplivno območje (r=350 m) za izpust amoniaka (500 g/s, trajanje 1 min; 100 g/s, trajanje 5 min); posledice so poškodbe dihalne sluznice, dihal, oči, kože, oteženo dihanje, smrt


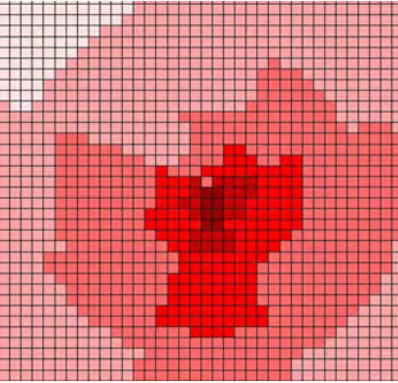


Industrijsko tveganje

OBLIKA REZULTATOV OCENE TVEGANJA

Analiza obstoječih metod za ocenjevanje tveganja:

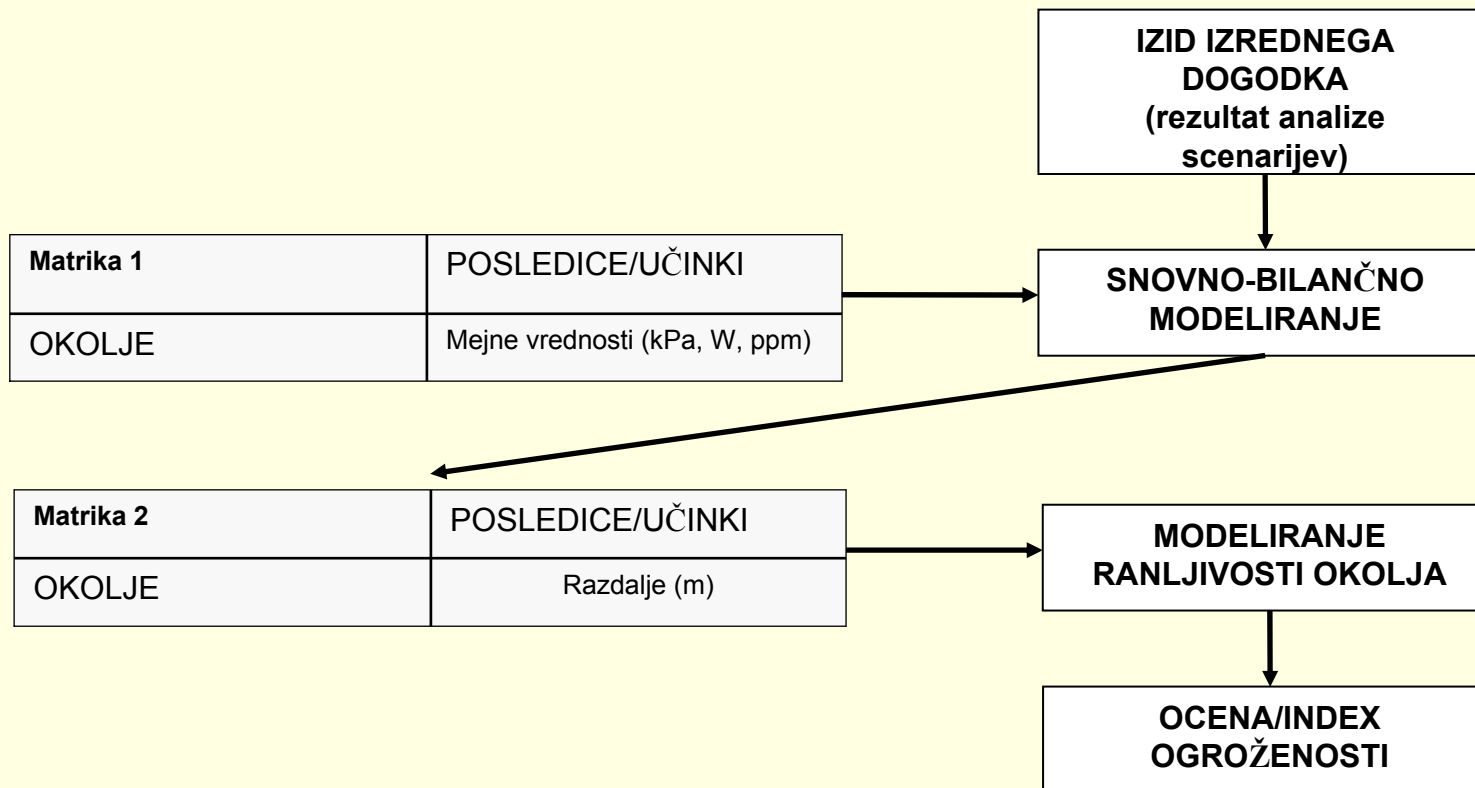
- Rapid Risk Assessment (RRA)
- Quantitative Risk Assessment (QRA)
- Accidental Risk Assessment methodology in the Context of Seveso II Directive (ARAMIS)

METODA	Prednosti	Pomanjkljivosti	Oblika rezultata	Uporabnost v prostorskem planiranju
Rapid Risk Assessment (RRA)	<p>Hitra in enostavna.</p> <p>Uporabna za določanje prioritet ukrepanja.</p>	<p>Robustna, podaja presežene rezultate (število žrtev)</p>	<p>Ocena števila žrtev.</p> <p>Verjetnosti za smrtne izide nesreče.</p>	<p>Ni uporabna</p>
Quantitative Risk Assessment (QRA)	<p>QRA je zanesljiva metoda za ocenjevanje tveganja. Omogoča sistematično ocenjevanje nevarnosti in posledic.</p> <p>Podaja rezultate uporabne za izdelavo varnostne politike, NZR in prostorsko planiranje.</p>	<p>Kompleksna, časovno zahtevna izvedba, potreben velik nabor informacij</p>	<p>Verjetnost izrednega dogodka.</p> <p>Vplivno območje podano v obliki razdalje (radij vpliva).</p>	
Accidental Risk Assessment Methodology in the Context of Seveso II Directive (ARAMIS)	<p>ARAMIS metoda je jasna in zanesljiva.</p> <p>Podaja rezultate uporabne za dovoljevanje in prostorsko planiranje.</p> <p>Namenjena je različnim uporabnikom.</p>	<p>Zahteva poznavanje različnih orodij za analizo tveganja.</p> <p>Robustna analiza ranljivosti.</p>	<p>Verjetnost izrednega dogodka.</p> <p>Vplivno območje podano v obliki Severity indeksa in Vulnerability indeksa – izraženega v rastrskem prikazu.</p>	

Industrijsko tveganje

OBLIKA REZULTATOV OCENE TVEGANJA

Indeks ogroženosti – vpeljava



Industrijsko tveganje

- Indeks ogroženosti - osnovno izhodišče (podlaga) za izdelavo prostorskih planov ter določanje odmika med nevarnimi obrati in ranljivo okolico



DELAMARIS d.d., Izola

Indeks ogroženosti

M=1:17500



Prostorsko planiranje

Kje v prostoru je mesto, ki bi skladno z različnimi cilji ustrezalo določeni dejavnosti?

Prostorsko planiranje

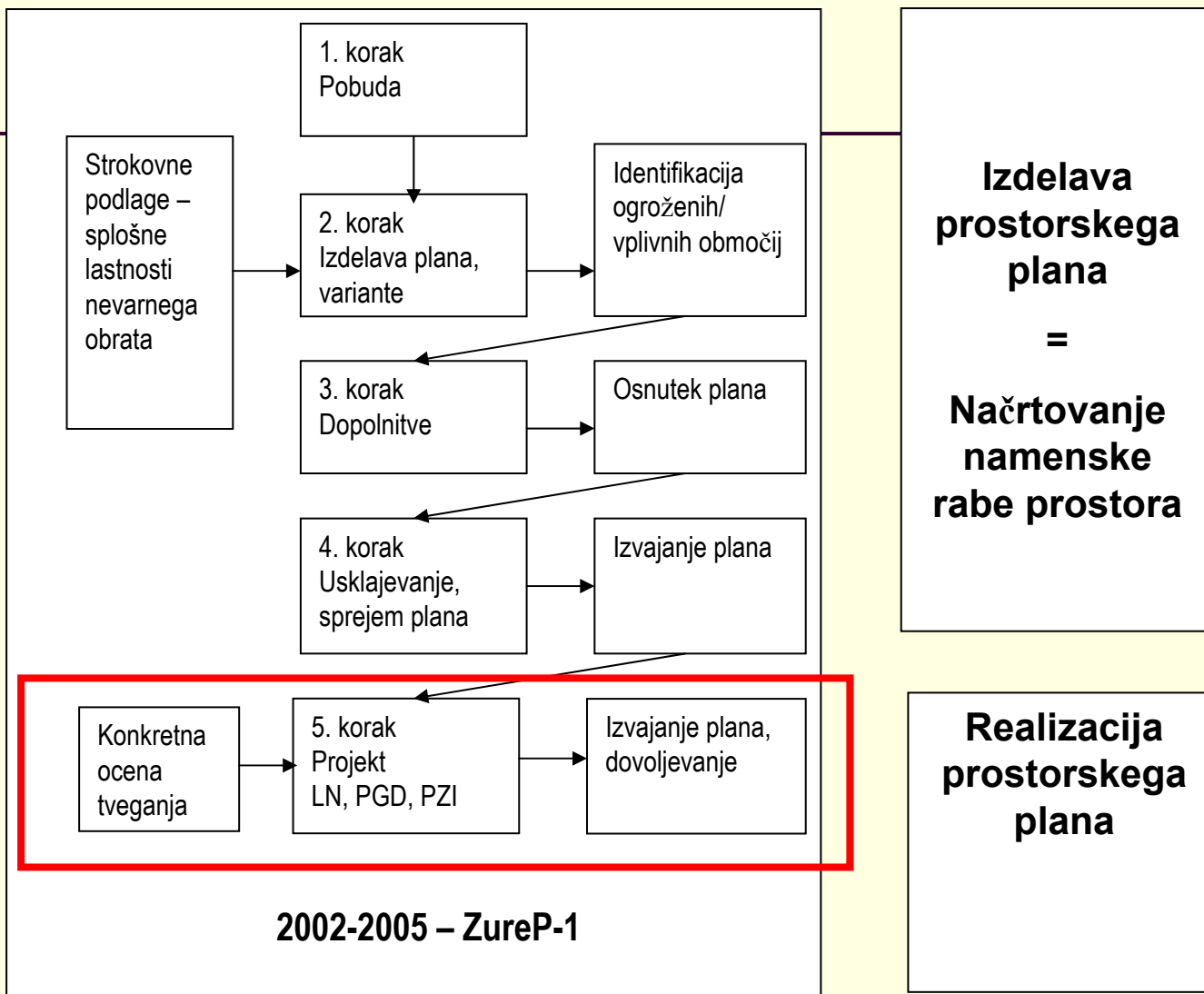
PROBLEM / POMANJKLJIVOSTI

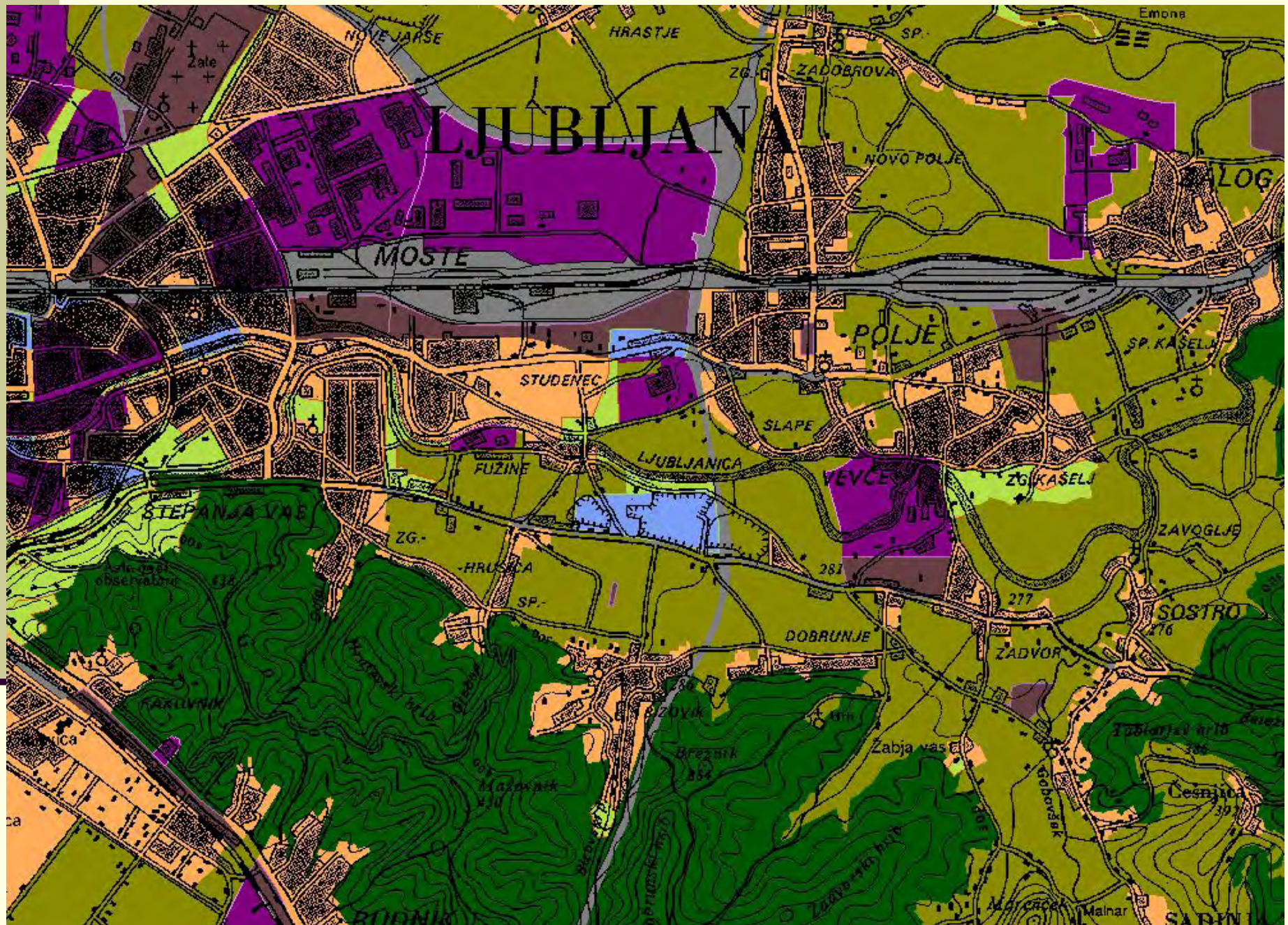
- Praznina/neupoštevanje tveganja v PP, napaka pri izvajanju PP – dovoljevanje
- Postopek priprave prostorskih planov in dovoljevanja posegov v prostor (okolje) – problem negotovosti pri pripravi strokovnih podlag za izdelavo prostorskega plana

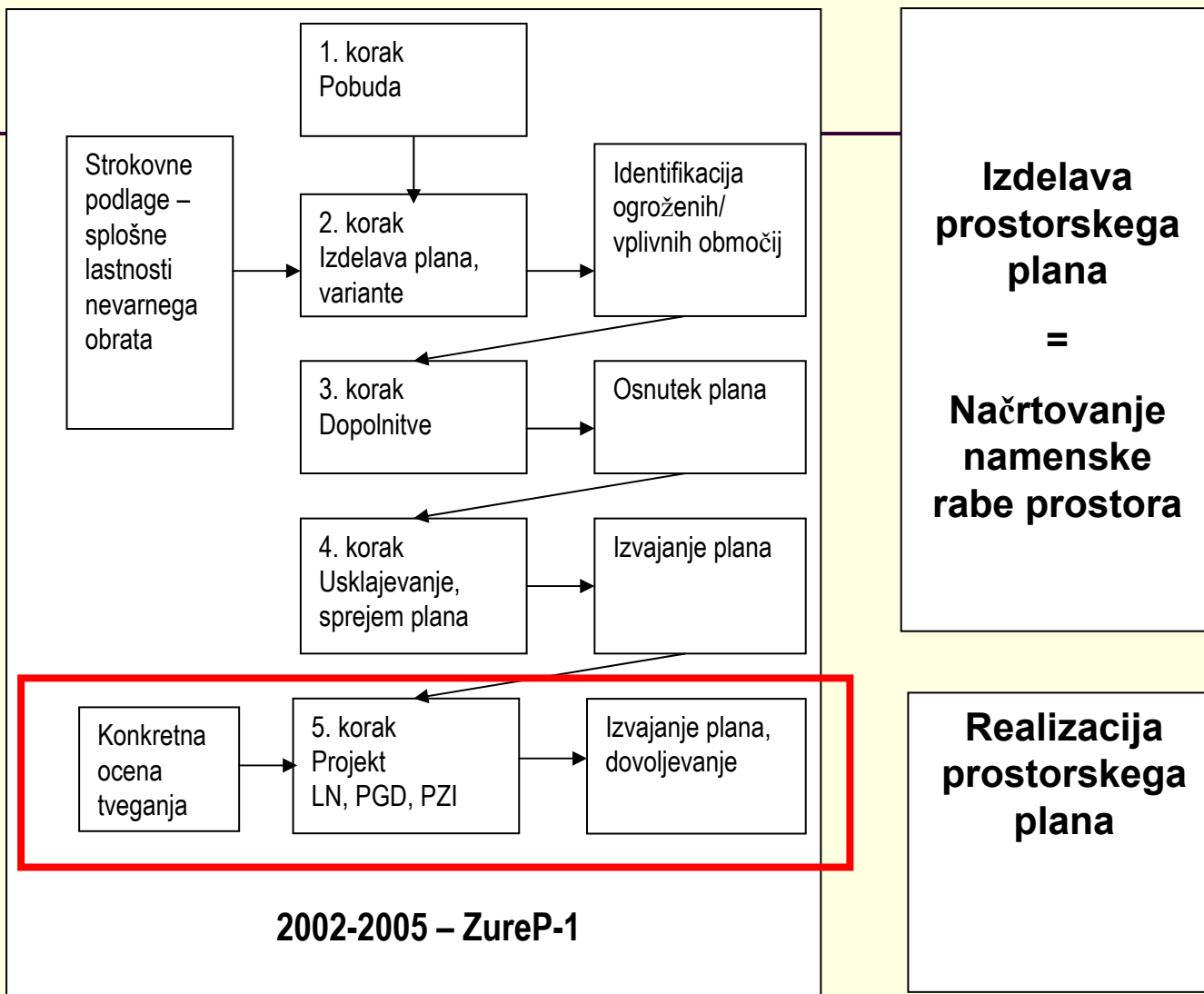
Prostorsko planiranje

PROBLEM

- Novi obrati – ocene tveganja so prepozno vključene v planerski postopek (ni podlage za rezervacijo prostora za novo nevarno dejavnost, ki je dovolj daleč od območij, ki jih želimo varovati).
- Obstoječi obrati – problem odmika od obstoječih ranljivih območij – približevanje nevarnih in ogroženih območij (odstranitev dejavnosti).







Prostorsko planiranje

Prostorsko planiranje lahko prispeva naslednje za omilitev problema:

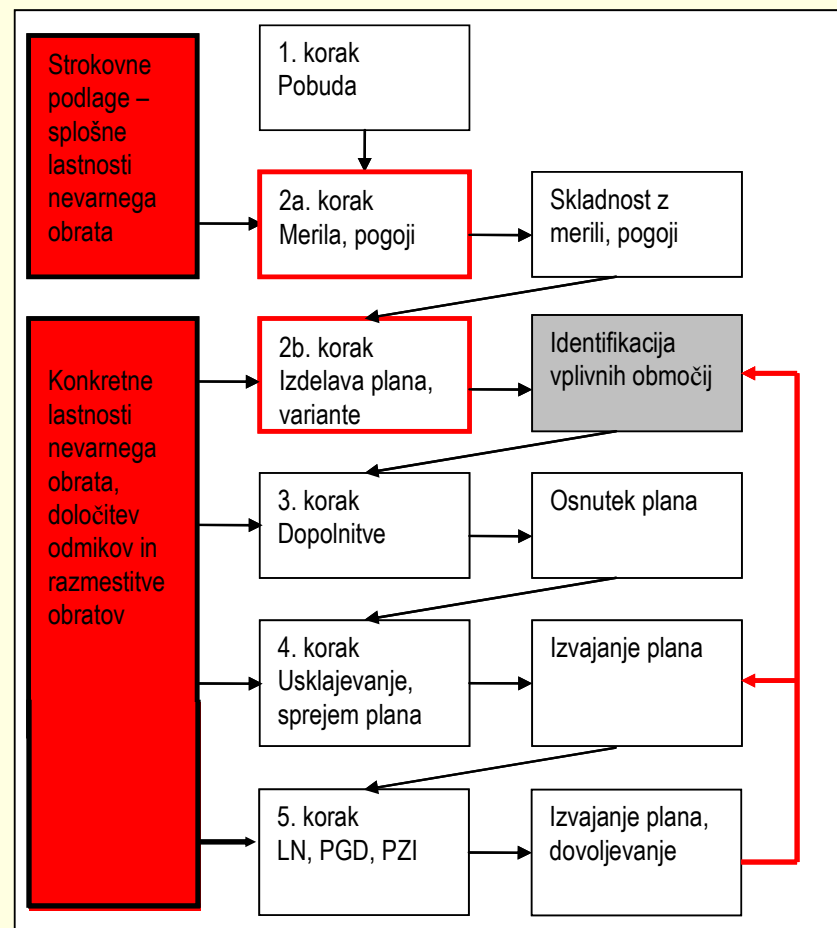
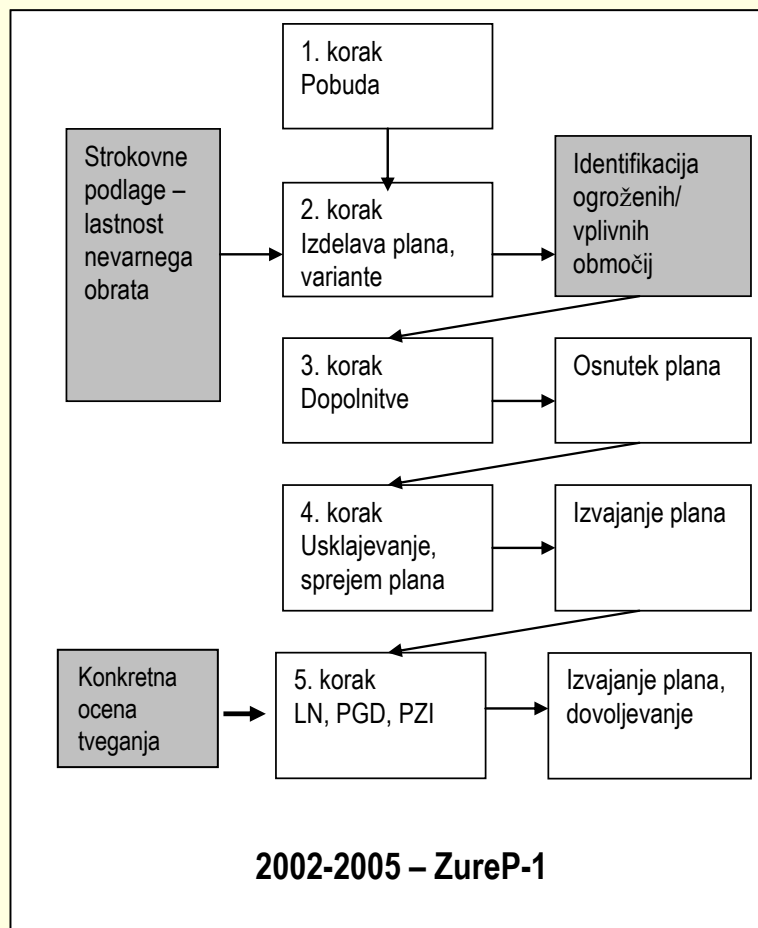
- zagotovimo zadosten odmik med nevarnim industrijskim obratom in ranljivo okolico
- načrtujemo in oblikujemo območja na način, da zmanjšamo posledice

Prostorsko planiranje

NAČINI VKLJUČEVANJA OCENJEVANJA TVEGANJA V PROSTORSKO PLANIRANJE:

- Industrijsko območje + pogojna gradnja obratov
- Analiza ranljivosti na podlagi izkušenj za posamezne industrijske branže + kontinuiran monitoring prostorskega razvoja ob izvajanju plana
- CPVO – projekt na ravni pobude, politik, izdelave strategije
- Nevarne dejavnosti – posebna planska kategorija

Prostorsko planiranje



Zaključek

- Integracija prostorskega in snovno bilančnega modeliranja se tako izkaže kot znanstveno podprto orodje, neposredno uporabno tudi v upravljanju z okoljem.
- Rezultati so tako lahko neposredna opora za izdelavo in morebitno spreminjanje prostorskih planov.
- V prihodnje je načrtovano testiranje metode na prostorskih planih (Mestna občina Koper) – tudi v kontekstu interdisciplinarnega dela med strokovnjaki, ki izdelujejo ocene tveganja in načrte namenske rabe prostora

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

4. Ocena vplivov na okolje

4.2. Vloga površinskih kriterijev pri usmerjanju postopka iskanja lokacij posega v podzemlje

Špela Uršej

Institutski mentor: Brank Kontić

Fakultetni mentor: Mladen Franko, Fakulteta podiplomski študij Univerze v Novi Gorici

Raba podzemnega prostora se v svetu in tudi pri nas povečuje zaradi vzrokov, kot so: pomanjkanje prostora na površju (zlasti v urbanih središčih), zmanjševanje vplivov posegov na prostor in konfliktov novih dejavnosti z obstoječimi, ter razvoj gradbeno-tehničnih metod podzemne gradnje, ki zagotavljajo večjo varnost, trajnost in rentabilnost podzemnih objektov. Kljub temu ostajajo metode načrtovanja posegov v prostor, pri katerih obstaja realna možnost umestitve v podzemlje, heterogene, nedorečene in pogosto ne dajejo rezultatov – preverljivo najboljših in družbeno sprejemljivih lokacij ter tehničnih rešitev posegov.

Predpostavljamo, da so podzemne alternative načrtovanih posegov tehnične rešitve s cilji zmanjševanja vplivov na prostor in konfliktov z obstoječimi rabami na površju ali pa sploh predstavljajo edino tehnično izvedljivo alternativo. Zato mora postopek načrtovanja posegov v podzemlje izhajati iz vrednotenja primernosti površja; tudi zato, ker je znanje o podzemlju pomanjkljivo in negotovo. Torej so površinski kriteriji ključni pri odločanju o usmeritvi postopka iskanja lokacij posega v podzemlje, metoda pa sestoji iz treh zaporednih faz: vrednotenje primernosti prostora za poseg, analiza prostorskih kriterijev neprimernosti površja in njihove potencialne vloge pri usmerjanju postopka načrtovanja v podzemlje ter vrednotenje primernosti podzemlja za poseg. Metoda je bila preizkušena na dveh aktualnih slovenskih načrtovalskih problemih, in sicer načrtovanje in prostorsko umeščanje železniške proge za visoke hitrosti v Sloveniji in načrtovanje in prostorsko umeščanje odlagališča NSRAO.

1st MR O-2, April 19, 2006

4. Assessment of environmental impact

4.2. The role of surface characteristics in directing underground spatial planning process

Špela Uršej

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Branko Kontić

University supervisor: Mladen Franko, Graduate School, University of Nova Gorica

The use of underground space has been intensifying recently. Reasons could be found in the lack of surface space (mainly in urban centres), attempts to decrease environmental impacts and conflicts between different land-uses, and development of technical and constructional methods assuring the safety, sustainability and profitability of underground projects. As yet, planning methods of projects with possible underground solutions remain undefined, heterogeneous and often do not result in optimal and socially acceptable spatial alternatives and technical solutions for such projects.

We presuppose that the underground project alternatives are technical solutions intended to avoid great negative environmental impacts at the surface, conflicts with existing land-uses on the surface or are the only technically and operationally feasible project alternatives. That is why the planning process has to proceed from initial surface suitability analyses, also because a knowledge about the underground is deficient and uncertain. For this reasons we hypothesize that surface criteria of surface unsuitability have a crucial role in decision-making about re-directing a planning process towards an underground solution. This method itself, however, consists of three sequential phases: surface suitability analysis for planned project, analysis of surface unsuitability criteria and their potential role for re-directing the project planning process towards the underground, and analysis of subsurface suitability for the planned project. The proposed method was tested on two recent Slovene planned projects: planning and spatial alignment of a high-speed railway, and planning and spatial alignment of a LILW repository.

Vloga površinskih kriterijev pri usmerjanju postopka iskanja lokacij posega v podzemlje

Špela Uršej, univ.dipl.ing.kraj.arh.

Institutski mentor: doc.dr. Branko Kontić

Fakultetni mentor: prof.dr. Mladen Franko, Politehnika Nova Gorica

Povzetek

Raba podzemnega prostora se v svetu in tudi pri nas povečuje zaradi vzrokov, kot so: pomanjkanje prostora na površju (zlasti v urbanih središčih), zmanjševanje vplivov posegov na prostor in konfliktov novih dejavnosti z obstoječimi, ter razvoj gradbeno-tehničnih metod podzemne gradnje, ki zagotavljajo večjo varnost, trajnost in rentabilnost podzemnih objektov. Kljub temu ostajajo metode načrtovanja posegov v prostor, pri katerih obstaja realna možnost umestitve v podzemlje, heterogene, nedorečene in pogosto ne dajejo rezultatov – preverljivo najboljših in družbeno sprejemljivih lokacij ter tehničnih rešitev posegov.

Predpostavljamo, da so podzemne alternative načrtovanih posegov tehnične rešitve s cilji zmanjševanja vplivov na prostor in konfliktov z obstoječimi rabami na površju ali pa sploh predstavljajo edino tehnično izvedljivo alternativo. Zato mora postopek načrtovanja posegov v podzemlje izhajati iz vrednotenja primernosti površja; tudi zato, ker je znanje o podzemlju pomanjkljivo in negotovo. Torej so površinski kriteriji ključni pri odločanju o usmeritvi postopka iskanja lokacij posega v podzemlje, metoda pa sestoji iz treh zaporednih faz: vrednotenje primernosti prostora za poseg, analiza prostorskih kriterijev neprimernosti površja in njihove potencialne vloge pri usmerjanju postopka načrtovanja v podzemlje ter vrednotenje primernosti podzemlja za poseg. Metoda je bila preizkušena na dveh aktualnih slovenskih načrtovalskih problemih, in sicer načrtovanje in prostorsko umeščanje železniške proge za visoke hitrosti v Sloveniji in načrtovanje in prostorsko umeščanje odlagališča NSRAO.

Abstract

The use of subsurface space has been intensifying recently. Reasons could be found in lack of surface space (mainly in urban centres), attempts to decrease the environmental impacts and conflicts between different land-uses, and development of technical and constructional methods, assuring safety, sustainability and profitability of subsurface projects. But yet, the planning methods of projects with possible subsurface alignments remain undefined, heterogenic and often not result in authentically optimal and socially acceptable spatial alternatives and technical solutions of projects.

We presume that the subsurface project alternatives are technical solutions of great negative environmental impacts on surface, conflicts with existing land-uses on the surface or are at all the only technically and operationally feasible project alternatives. That is why a planning process has to be proceeded from surface suitability analyses, also because a knowledge about subsurface is deficient and uncertain. From that reasons we hypothesise, that surface criteria of surface unsuitability have crucial role in decision-makings about re-directing a planning process of project alignment towards subsurface, a method itself however consists of three sequential phases: surface suitability analysis for planned project, analysis of surface unsuitability criteria and their potential role for re-directing a planning process of project alignment towards subsurface, and analysis of subsurface suitability for planned project. Proposed method has been tested on two recent Slovene planned projects: planning and spatial alignment of high-speed railway and planning and spatial alignment of LILW repository.

1. Izhodišča načrtovanja

Izhodišče načrtovanja je bila identifikacija neuspešnosti načrtovalskih postopkov posegov v prostor, zlasti dveh analiziranih načrtovalskih problemov v Sloveniji:

1. Železniška proga za visoke hitrosti (ŽPVH) [1]:

- več kot 10-letno načrtovanje ni dalo preverljivo najboljših prostorskih alternativ
- Opuščanje še ne do konca preverjenih alternativnih tras iz nadaljnega postopka
- Prevlada enostranskih stališč
- Spreminjanje načrtovanih hitrosti ŽPVH in njene namembnosti (potniški ali mešani transport), kar ima za posledico spreminjanje gradbeno-tehničnih parametrov proge in zato možne drugačne prostorske rešitve.
- Nedosledna metoda ocenjevanja vplivov na okolje (zanemarjanje podzemnega značaja odsekov ŽPVH – netočno ocenjevanje vplivov, netočno in nekompletno ocenjevanje ter nedosledno določanje najboljše trase)
- Neupoštevanje prostorskih kakovosti in vrednot pri določanju alternativnih tras ŽPVH
- Neustrezen časovni okvir strateške presoje vplivov na okolje in poudarki (namesto izhodišča načrtovalskega postopka je bil poudarek na primerjalni študiji)

2. Odlagališče nizko in srednje-radioaktivnih odpadkov v Sloveniji (odlagališče NSRAO):

- V več kot 20- letnem postopku načrtovanja so bile uporabljene in ovržene različne metode načrtovanja odlagališča NSRAO [2]
- Rezultati prostorskega načrtovanja niso dali rešitve –družbeno sprejemljive lokacije:
 - Poudarek na upoštevanju gradbeno-tehničnih in varnostnih prostorskih zahtev odlagališča NSRAO
 - Prepozna vključitev javnosti v postopek načrtovanja odlagališča NSRAO
- SEDAJ [2, 3]:
 - Sedanji postopek načrtovanja odlagališča NSRAO ne omogoča izbora najboljše lokacije odlagališča NSRAO na območju možnih alternativ (slovensko ozemlje)
 - Z lokalnimi partnerstvi in denarnimi odškodninami skuša zagotoviti družbeno sprejemljivo lokacijo
 - Prostorskim značilnostim (neugodnim lastnostim) predlaganih lokacij se prilagaja s tehničnimi rešitvami (NI PROSTORSKE OPTIMIZACIJE)
 - Problemi z neprimernimi dimenzijami predlaganih lokacij
 - Možnost izstopa občin iz postopka načrtovanja (izguba potencialnih lokacij)

2. Opredelitev problema

Problem načrtovanja posegov v podzemlje je večplasten. V prvi vrsti je težavno in negotovo iskanje ustreznih lokacij v podzemlju zaradi visoke stopnje negotovosti in pomanjkljivega znanja o podzemlju ter nejasnosti časovnega okvirja identifikacije podzemnih alternativ posega v načrtovalskem postopku. V drugi vrsti je zaradi tipološko različnih izhodišč nedosledno primerjanje površinskih in podzemnih lokacijskih alternativ posega. Nejasnosti nastopajo pri primerjanju tipološko različnih parametrov ter vplivov na prostor podzemnih in površinskih lokacijskih alternativ posegov. Tudi prostorski kriteriji, ki naj usmerjajo in utemeljujejo odločitve o podzemni ali površinski umestitvi posega, so strokovno nejasni. In nenazadnje imamo v načrtovalskem postopku opraviti tudi z vprašanjem, kakšna je vloga tehničnih, ekonomskih, družbenih in drugih kriterijev pri umeščanju zahtevnih posegov v prostor.

Torej je nejasnosti pri umeščanju zahtevnih posegov v prostor, pri katerih se kaže tudi potencialna možnost umeščanja v podzemlje več. Poleg nejasnih strokovnih in znanstvenih izhodišč na področju

prostorskega načrtovanja posegov v podzemlje in uporabe prostorskih parametrov so to tudi metodološka vprašanja glede postopka takšnega načrtovanja s končnim ciljem opredelitve najprimernejše umestitve posega v prostor. Nenazadnje gre tudi za družbeni odnos do velikih in zahtevnih posegov v prostor, pri katerih v javnosti pogosto naletimo na nerazumevanje širšega načrtovalskega problema in koncepta ter zato nestrinjanje z negativnimi vplivi na prostor, ki jih tak poseg utegne povzročiti. Po drugi strani pa so podzemne umestitve posegov v prostor večinoma odraz družbenega nestrinjanja s škodami, ki bi jih tak poseg utegnil povzročiti na zatečene razmere in rabe površja.

3. Cilji raziskave

Cilj raziskave je konceptualno opredeliti in praktično preskusiti postopek načrtovanja in umeščanja podzemnih posegov v prostor. Namen raziskave je identificirati cilje, kriterije in vidike, ki potencialno usmerjajo postopke načrtovanja posega v podzemlje, analizirati njihovo relevantnost za obravnavan načrtovalski problem in jih pomensko razvrstiti.

Končni cilj magistrskega dela je osvetlitev in razlaga postopka (metode) načrtovanja posegov v podzemlje, ki je potekal na osnovi znanja o lastnostih površja. S tega vidika je namen izluščiti kriterije za prostorsko načrtovanje – umeščanje podzemnih posegov v prostor s poudarkom na uporabnosti znanja o površju. Končni namen magistrskega dela je analizirati rezultate eksperimenta v smislu razlik z rezultati drugačnih postopkov in oceniti metodo in kriterije v smislu širše uporabnosti za podzemne posege z različnimi prostorskimi pojavnostmi in zahtevami.

4. Delovna hipoteza

Kot rešitev opisanih načrtovalskih problemov je treba opredeliti poenoten in ponovljiv postopek načrtovanja posegov v prostor, ki bo v končni fazi omogočal identifikacijo najugodnejše lokacije v prostoru. V postopku je treba identificirati in uporabiti prostorske kriterije, ki so opisljivi z obstoječimi podatki in imajo vlogo pri potencialni usmeritvi posega v podzemlje. Ker so parametri podzemlja negotovi in le delno opisljivi z obstoječimi podatki, gre takšne kriterije iskati med površinskimi sestavinami prostora; tudi zato, ker je večinoma cilj umeščanja posegov v podzemlje zmanjševanje interakcij družbe s posegom in varovanje zatečenih rab prostora na površju. Predpostavljamo torej, da gre ključne prostorske parametre odločanja o umestitvi posega v podzemlju iskati v lastnostih površja. V skladu s tem so podzemne alternative tehnične rešitve negativnih vplivov površinskih alternativ na prostor in niso neodvisne alternative posega.

5. Metoda iskanja ustrezne lokacije posega

Metoda iskanja ustrezne lokacije posegov, pri katerih obstaja tudi možnost umeščanja v podzemlje, obsega naslednje faze:

- Analiza primernosti površja za načrtovani poseg v prostor
- Analiza primernosti prostora za površinsko oziroma podzemno izvedbo načrtovanega posega v prostor
- Analiza rezultatov in njihova primerjava z rezultati drugačnih postopkov prostorskega načrtovanja

V nadaljevanju načrtovalskega postopka bi metoda obsegala še naslednji dve fazi:

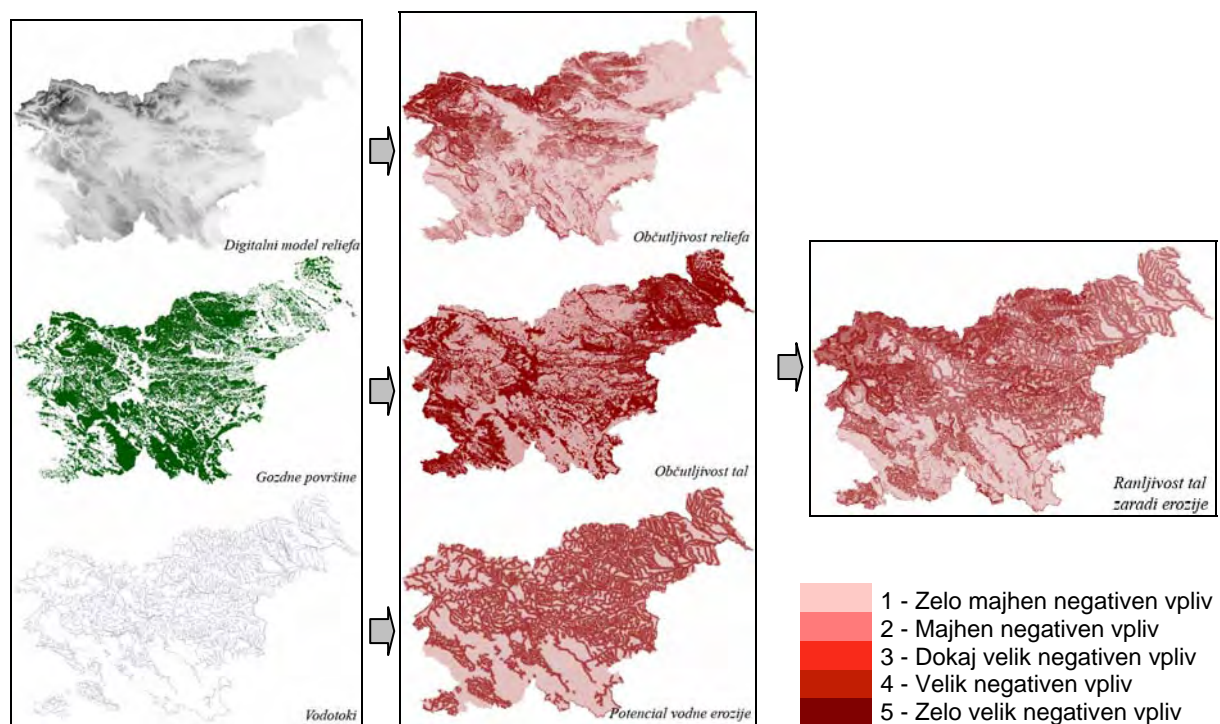
- Detajlna analiza primernosti podzemlja za načrtovani poseg z vključitvijo podatkov in kriterijev podzemlja v prostorski model.
- Terenske raziskave in dodatne tehnične študije

6. Postopek prostorskega načrtovanja in vloga prostorskega modeliranja

Prostorsko načrtovanje je postopek analize in vrednotenja prostora z namenom umestitve načrtovanega posega s čim manjšimi negativnimi vplivi na prostor ter čim manjšimi stroški realizacije posega. Poleg tega je treba poseg v prostor umestiti v skladu z gradbeno-tehničnimi in obratovalnimi zahtevami. Prostorsko načrtovanje obsega več faz, ki si hierarhično sledijo od generalnega strateškega načrtovanja do bolj detajlnega načrtovanja. Končni cilj prostorskega načrtovanja posega v prostor je izvedbeni načrt, v katerem je opredeljena točna lokacija posega v prostor ter njegova gradbeno-tehnična rešitev, ki je neposredna osnova za začetek izvajalskih del.

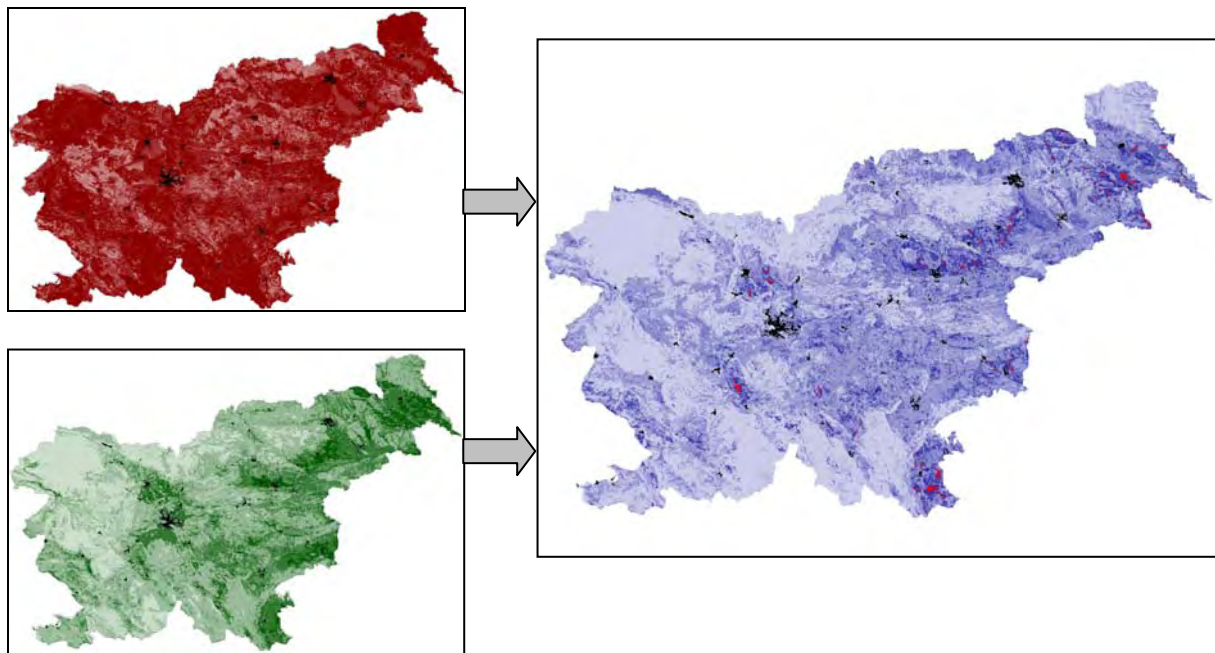
Prostorsko modeliranje je orodje, ki se uporablja v začetnih fazah načrtovalskega postopka, ko se analizira celotno območje možnih alternativ z namenom opredelitve alternativnih lokacij posega, ki so v nadaljevanju načrtovalskega postopka strokovna osnova za sprejemanje odločitve in izbor najprimernejše lokacije načrtovanega posega. Cilj prostorskega modeliranja je torej lokacijska optimizacija načrtovanega posega v prostor.

Prva faza prostorskega modeliranja je analiza potencialnih negativnih vplivov faz posega na sestavine prostora. V ta namen se prostor in poseg členita na posamezne sestavine, katerih medsebojni vplivi so analizirani v matriki interakcij. Glede na rezultate interakcijske matrike izločimo sestavine prostora, za katere je pričakovano, da jih bo realizacija posega spremenila – prizadela. Ranljivost posamezne sestavine prostora vrednotimo v konceptu modela ranljivosti, ki je neposredna osnova za pripravo modela.. Karte ranljivosti posameznih lastnosti združimo v skupno karto ranljivosti posamezne sestavine prostora (slika **Error! Reference source not found.**).



Slika 1: Opis ranljivih lastnosti prostora s prostorskimi podatki, vrednotenje pričakovane jakosti vpliva načrtovanega posega s pet-stopenjsko vrednotno lestvico ter končno združevanje kart ranljivosti lastnosti prostora v karto ranljivosti posamezne sestavine prostora.

Vse karte ranljivosti posameznih sestavin prostora združimo v skupno karto ranljivosti prostora. Podobno analiziramo tudi privlačnost prostora za načrtovan poseg. Obe karti združimo v karto primernosti prostora, ki je končni rezultat prostorskega modeliranja ter služi za identifikacijo primernih alternativnih lokacij načrtovanega posega – slika 2.



Slika 2: Končni karti modelov ranljivosti in privlačnosti (levo), združeni v karto primernosti prostora za načrtovani poseg (desno) – primerne lokacije posega so na karti primernosti prostora označene z rdečo barvo.

7. Prikaz uporabe metode na primeru načrtovanja odlagališča nizko in srednje radioaktivnih odpadkov

Opređeljeno metodo načrtovanja posegov v prostor, za katere obstaja tudi možnost umestitve v podzemlje, smo preskusili na primeru načrtovanja in prostorskega umeščanja odlagališča NSRAO.

Analiza primernosti površja za načrtovani poseg v prostor

V prvi fazi načrtovanja smo analizirali primernost površja za odlagališče NSRAO. Glede na interakcijsko matriko pričakovanih vplivov posega na sestavine prostora smo izvedli naslednje delne modele ranljivosti:

Modeli ranljivosti naravnih sestavin okolja

- *Model ranljivosti naravnih pojavov*
- *Model ranljivosti naravnih procesov*
- *Model ranljivosti izrednih naravnih dogodkov*

Modeli ranljivosti bivalnih kakovosti

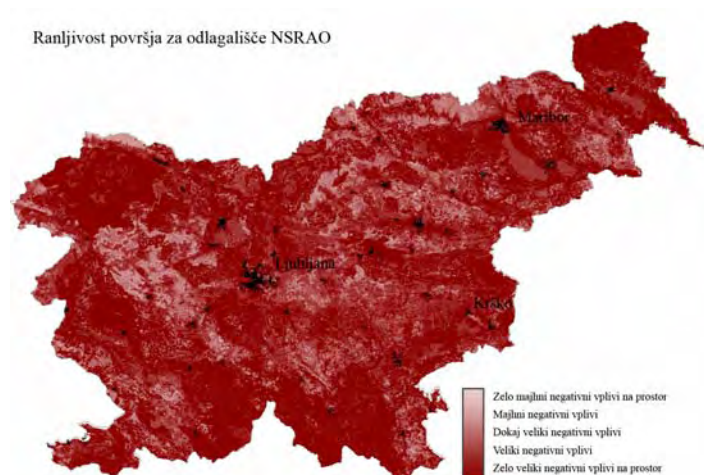
- *Model ranljivosti mirnosti v prostoru*
- *Model ranljivosti vizualnih kakovosti v prostoru*
- *Model ranljivosti kulturnih kakovosti v prostoru*

Modeli ranljivosti rab prostora

- *Model ranljivosti potencialov prostora za rabo in razvojnega potenciala*
- *Model ranljivosti športno rekreacijskega potenciala v prostoru*
- *Model ranljivosti potenciala prostora za poselitve*

- *Model ranljivosti potenciala prostora za kmetijstvo*
- *Model ranljivosti potenciala prostora za gozdarstvo*
- *Model ranljivosti vodnih virov*

Delne modele smo združili v skupni model ranljivosti površja za odlagališče NSRAO, katerega rezultat prikazuje slika 3.

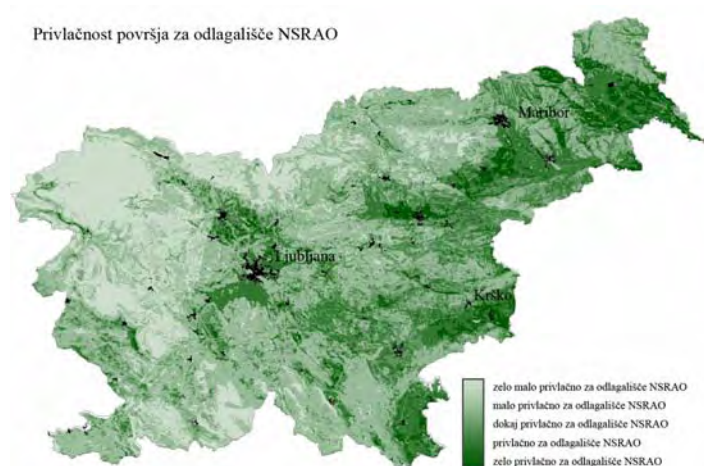


Slika 3: Rezultat skupnega modela ranljivosti površja za odlagališče NSRAO.

Privlačnost lastnosti prostora za odlagališče NSRAO smo opisali z naslednjimi delnimi modeli:

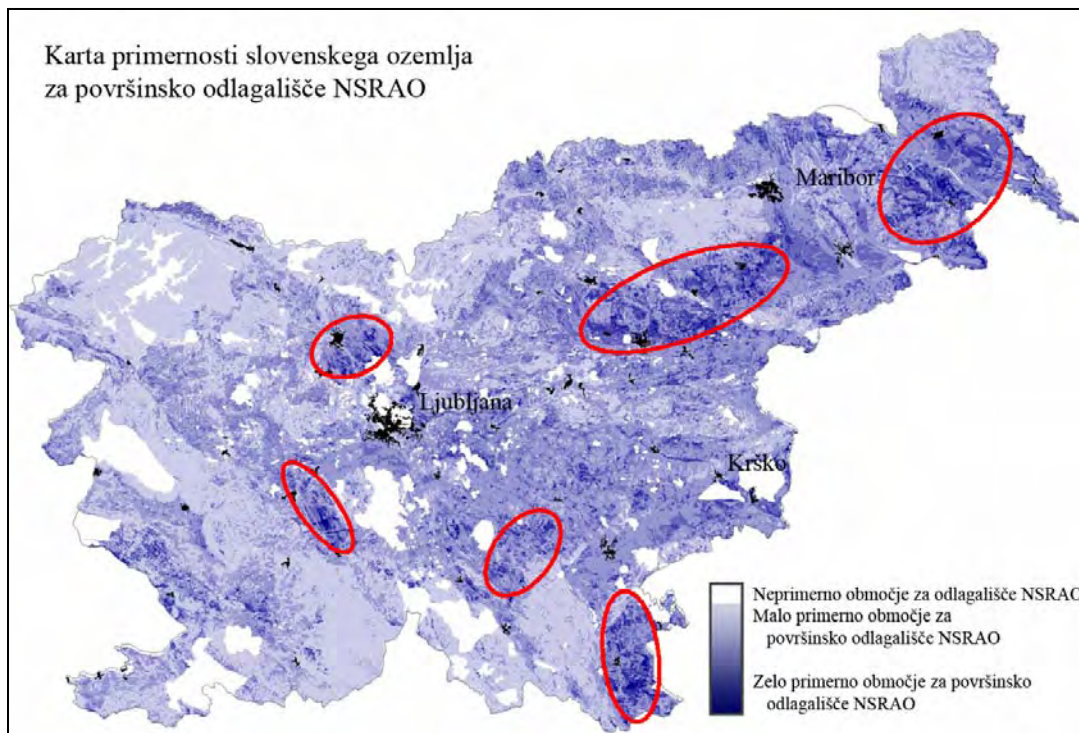
- *Model privlačnosti prostora z vidika čim manjših transportnih stroškov*
- *Model privlačnosti z vidika čim manjših gradbenih stroškov*
- *Model privlačnosti prostora z vidika čim manjših stroškov odkupa zemljišč*

Rezultat skupnega modela privlačnosti prostora prikazuje slika 4.



Slika 4: rezultat skupnega modela privlačnosti prostora za odlagališče NSRAO.

Oba modela smo združili v model primernosti površja za površinsko odlagališče NSRAO. Rezultat modela je prikazan na sliki 5.



Slika 5: Primernost površja za površinsko odlagališče NSRAO.

Iz gornjih prikazov je razvidno, da je slovensko ozemlje večinoma zelo ranljivo za površinsko odlagališče NSRAO. Kjer je ranljivost manjša, pa rezultat modela privlačnosti prostora kaže, da obstoječe lastnosti prostora ne omogočajo relativno stroškovno ugodne izgradnje odlagališča ter ugodnih obstoječih transportnih poti od vira radioaktivnih odpadkov (nuklearna elektrarna Krško) do potencialne lokacije odlagališča NSRAO. Zato sklepamo, da je smiselno analizirati tudi podzemlje kot potencialno območje umestitve odlagališča NSRAO.

Analiza prostorskih kriterijev neprimernosti površja v smislu njihovega pomena za usmeritev postopka iskanja lokacij posega v podzemlje

Opravljenе modele ranljivosti površja smo analizirali z vidika mejnih vrednosti lastnosti prostora, nad katerimi so pričakovani negativni vplivi na površje zelo veliki in bi bila zato primernejša umestitev odlagališča NSRAO v podzemlje. Te vrednosti neprimernosti površja za umestitev odlagališča NSRAO zato dobijo pomen kriterijev za usmeritev postopka iskanja lokacij posega v podzemlje. Lastnosti prostora in kriteriji površja so našteti v preglednici 1.

Preglednica 1: Nabor kriterijev, ki usmerjajo postopek iskanja lokacije odlagališča NSRAO v podzemlje. Pri navedenih vrednostih kriterijev pričakujemo, da je podzemna umestitev odlagališča NSRAO boljša od površinske glede na izhodišča prostorske analize – vidike primernosti lokacije za odlagališče NSRAO.

Sestavina ali lastnost prostora	Lastnost prostora	Kriterij za usmeritev lokacije odlagališča v podzemlje	Vidiki primernosti lokacije za odlagališče NSRAO				
			Družbena uresničljivost	Varnost	Funkcionalno-tehnični	Ekonomski	Prostorski
Morfologija terena	Nakloni	> 30°					
	Izpostavljene reliefne oblike	Grebeni, vrhovi grape, soteske					
	Dolžina pobočij	> 200 metrov					
	Nadmorske višine	> 1800 metrov nad morjem					
	Velikost lokacije	200 x 300 metrov					
Hidrologija	Stoječe in tekoče vode	Prisotnost					
	Območja poplav	Prisotnost					
	Erozijska območja	Kombinacija padavinskega režima in lastnosti terena					
Meteorologija	Povprečne letne količine padavin	> 2000 mm padavin/leto					
	Količina padavin v padavinskih viških	Nad 18 mm/dan; v povezavi z lastnostmi terena					
	Trajanje snežne odeje	> 150 dni/leto					
Biosfera	Kopenski ekosistemi	Ekološki kriteriji					
	Vodni ekosistemi	Ekološki kriteriji					
	Varstvena območja Natura 2000	Varstveni režimi ekološko pomembnih območij					
	Zavarovane naravne vrednote	Varstveni režimi naravnih vrednot Zavarovani parki					
Poselitev	Strnjena naselja	Pas oddaljenosti 500 m					
	Gostota poselitve	Nad 100 prebivalcev/ km ²					
Kmetijstvo	Potencial prostora za kmetijstvo	Najboljša kmetijska zemljišča					
Gozdarstvo	Gozdne površine	Globina koreninskega sistema					
Vodni viri	Viri pitne vode	Najstrožji in strog režim varovanja podzemnih virov pitne vode					
Rekreacijske površine	Javni parki	Raba prostora v bližini					
	Športni objekti	Velikost in lega objektov (podzemno-nadzemno)					
Infrastruktura	Prometna infrastruktura (avtoceste in železnice)	Gradbeno-tehnični kriteriji za trasiranje cest in železnic					
	Energetska infrastruktura (daljno-, plino- in naftovodi)	Varstveni pasovi energetske infrastrukture					
	Komunalna in vodo-oskrbna infrastruktura	Varstveni pasovi komunalne in vodo-oskrbne infrastrukture					
	Energetski objekti (elektrarne in distribucijske postaje)	Meje lokacije					
Kakovosti bivanjskega prostora	Vizualne kakovosti prostora	Vizualna izpostavljenost lokacije odlagališča					
	Kulturne kakovosti prostora	Objekti in območja kulturne dediščine					

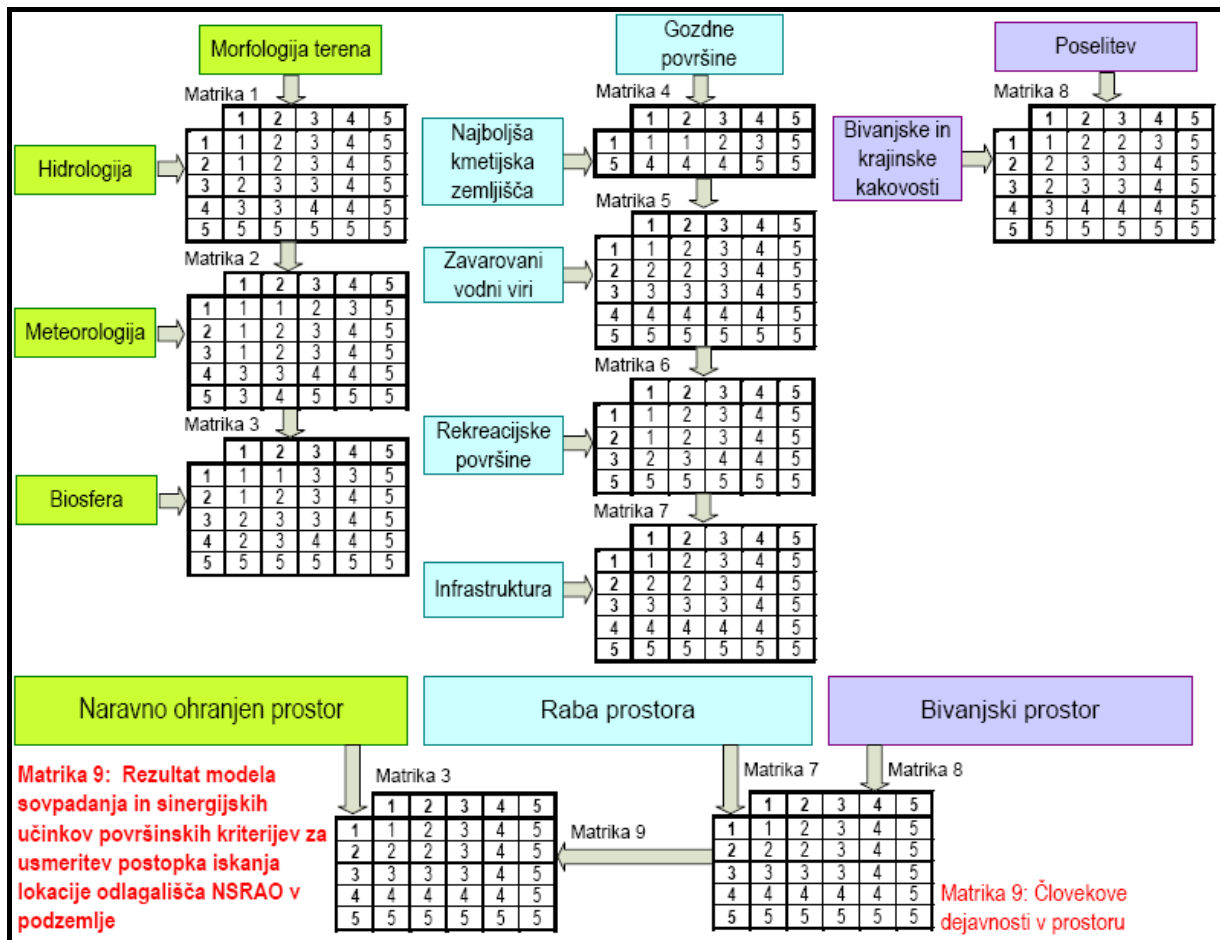
Legenda:

	Izločilni kriterij ¹
	Usmeritev v podzemni umestitev odlagališča
	Ni neposredne zveze med kriterijem in izborom podzemne lokacije

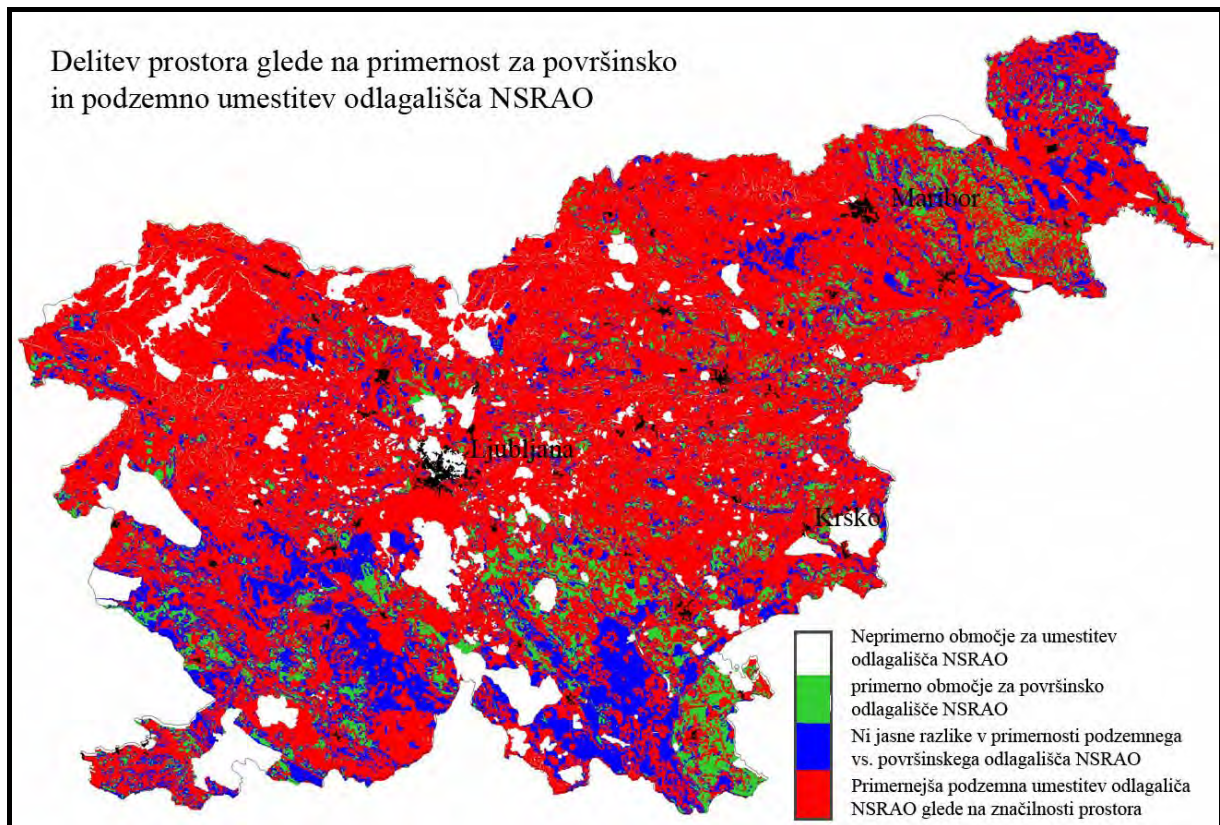
¹ Izločilni kriteriji veljajo tako za površinsko kot podzemno umestitev odlagališča NSRAO. Namreč, na območju varovanih vodnih virov, na grebenih in vrhovih ter nad nadmorskimi višinami 1800 metrov odlagališča NSRAO ni možno, bodisi zaradi družbene nesprejemljivosti, gradbeno-tehničnih razlogov ali pa zahtev po ustreznih transportnih povezavah (blagi nakloni in horizontalne krivine).

Analiza primernosti prostora za površinsko oziroma podzemno izvedbo načrtovanega posega v prostor

V naslednji fazi so bile vrednosti prostorskih lastnosti ali pojavov analizirane v modelu primernosti prostora za podzemno in površinsko umestitev odlagališča NSRAO. Namen je bil ugotoviti, kje v prostoru so območja, ki so primernejša za podzemno umestitev odlagališča NSRAO in, ali razširitev območja možnih alternativ v podzemlje prispeva k razširitvi nabora potencialnih lokacij za odlagališče NSRAO. Postopek priprave je shematsko prikazan na sliki 6, slikovni rezultat prostorskega modela pa na sliki 7.

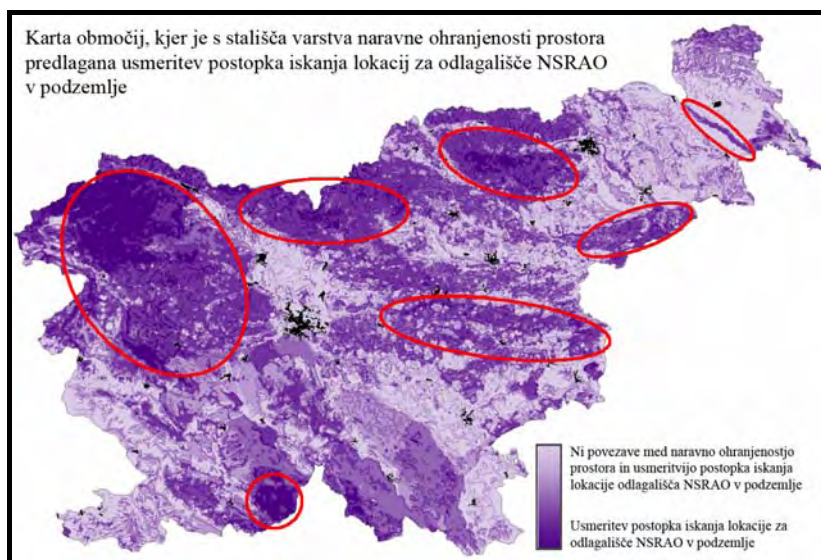
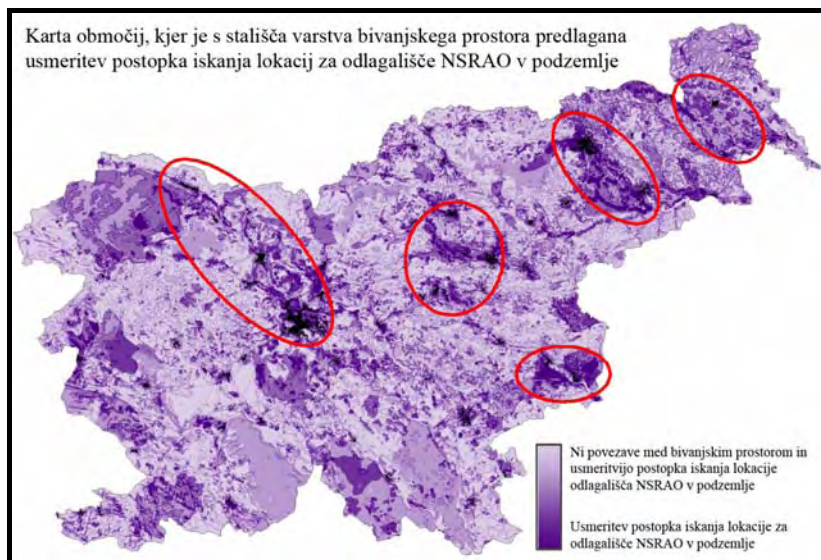


Slika 6: Shema postopka priprave prostorskega modela primernosti prostora za podzemno in površinsko umestitev odlagališča NSRAO.



Slika 7: Rezultat modela primernosti površja in podzemlja za odlagališče NSRAO glede na kriterije neprimernosti površja.

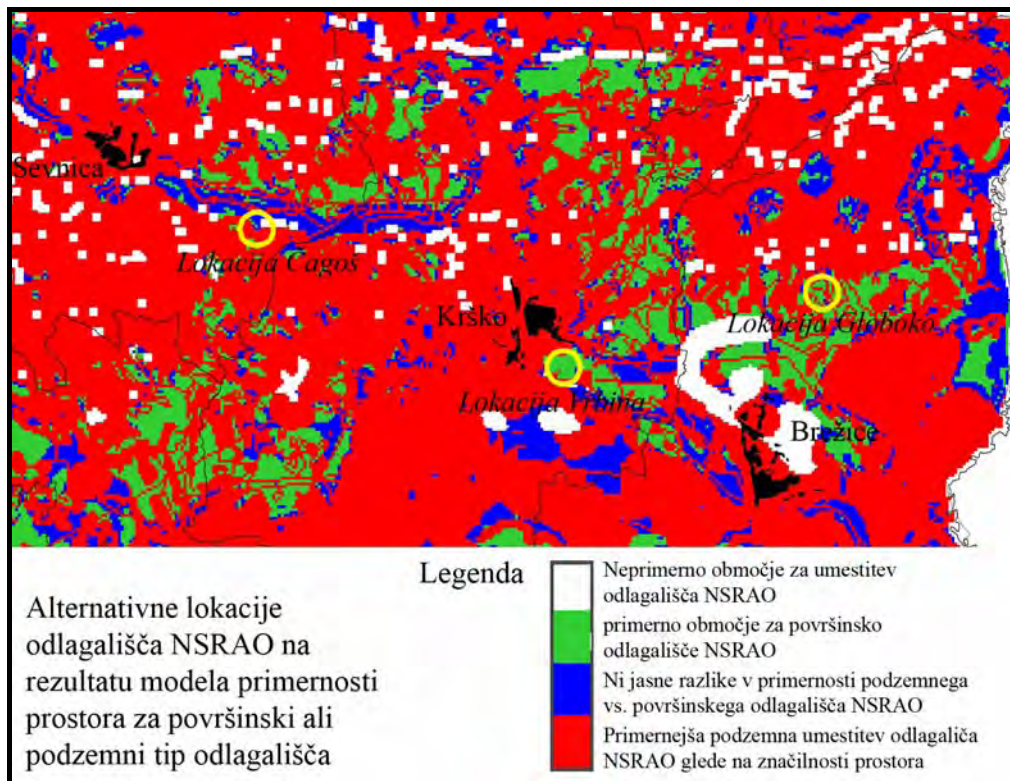
Iz prikaza rezultata modela je razvidno, da je večina slovenskega ozemlja zaradi zatečenih lastnosti na površju bolj primerna za podzemno umestitev odlagališča NSRAO. V nadaljevanju raziskave smo tudi preverili pomen dveh filozofsko različnih varnostnih zahtev za prostorsko pojavnost večje primernosti podzemlja za odlagališče NSRAO. Prva varstvena zahteva poudarja varstvo človekovega prostora in dejavnosti v prostoru (antropocentrični vidik), druga pa varstvo narave (naturocentrični vidik). Skladno s to opredelitvijo smo izvedli ločena prostorska modela z vključitvijo le tistih kriterijev površja, ki so skladni z opisanimi varnostnima zahtevama. Rezultata modelov sta razvidna iz slike 8. Očitno je, da se območja varstva bivanjskega prostora ter varstva narave prostorsko ne ujemajo. Takšna analiza lahko prispeva h kasnejšim diskusijam v postopku sprejemanja odločitev o izboru najprimernejše trase o pomenu na eni strani človekovega bivanjskega prostora in njegovem varstvu ter na drugi strani varstvu narave in njenem varstvu.



Slika 8: Primerjava območij, kjer je predlagana usmeritev postopka iskanja lokacij za odlagališče NSRAO v podzemlje zaradi varstva bivanjskega prostora (zgoraj) in varstva narave (spodaj).

Analiza rezultatov in njihova primerjava z rezultati drugačnih postopkov prostorskega načrtovanja

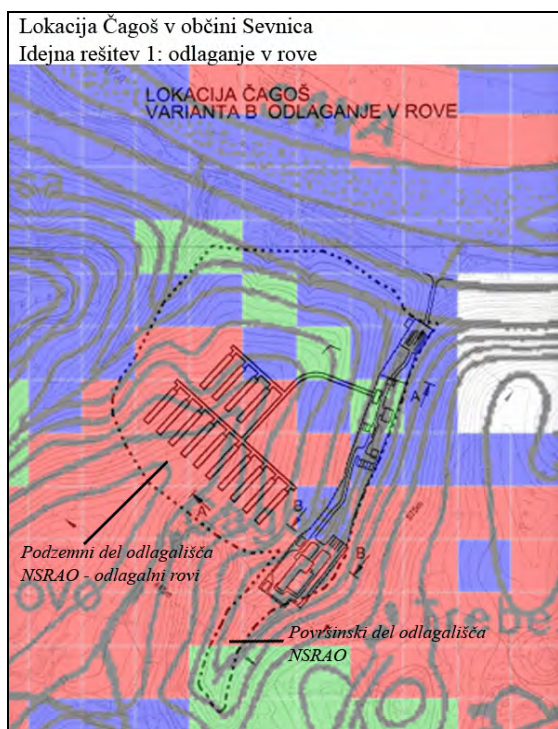
V zadnji fazi raziskovanja smo končni rezultat – karto primernosti površja in podzemlja za odlagališče NSRAO glede na kriterije neprimernosti površja – primerjalno analizirali z rezultati drugačnih postopkov. ARAO je namreč pripravila idejne rešitve odlagališča NSRAO za tri potencialne lokacije, pridobljene na podlagi občinskih prijav za sodelovanje v postopku umeščanja odlagališča NSRAO v prostor v letu 2005: Čagoš v občini Sevnica, Vrbina v občini Krško in Globoko v občini Brežice [3], in jih prikazuje slika 9.



Slika 9: Prikaz alternativnih lokacij za odlagališče NSRAO na rezultatu modela primernosti prostora za površinski in podzemni tip odlagališča.

Občina Sevnica – Lokacija Čagoš/KS Studenec

Idejno zasnovo odlagališča NSRAO na lokaciji Čagoš v občini Sevnica prikazuje slika 10.



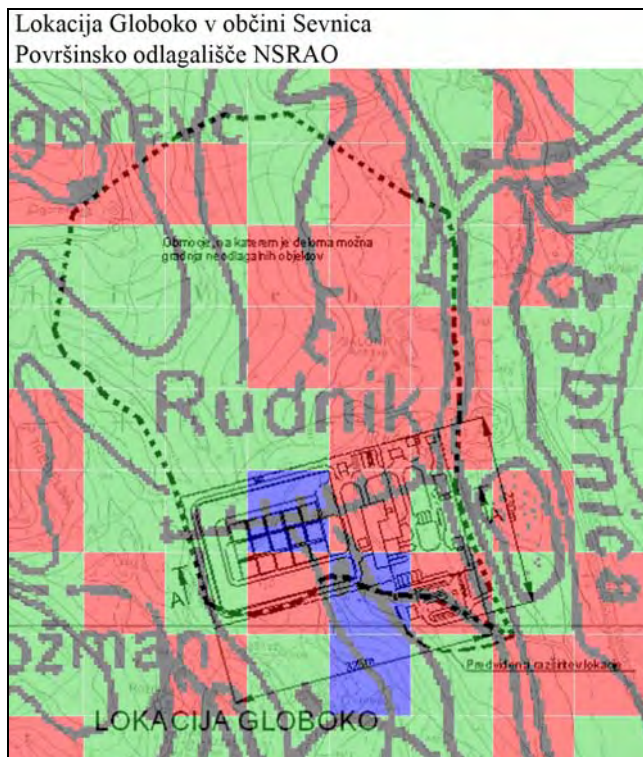
Slika 10: Idejna rešitev 1 odlagališča NSRAO na lokaciji Čagoš v občini Sevnica in rezultati modela primernosti prostora za površinski in podzemni tip odlagališča.

Čeprav je občina Sevnica izstopila iz postopka umeščanja odlagališča NSRAO v prostor s pisnim obvestilom Agencije ARAO z dne 21.3.2006, smo lokacijo in idejno zasnovo podzemnega odlagališča vseeno uporabili za preveritev rezultatov modeliranja.

Odlagališče NSRAO je zasnovano v dveh delih (slika 10): v ozki soteski naj bi se nahajali površinski tehnični in servisni objekti, namenjeni sprejemu in manipulaciji NSRAO. Iz tega dela je dostop podzemni odlagalni del, za katerega sta bili predvideni dve alternativni tehnični rešitvi: odlagalni rovi ali silosi. Rezultat modela primernosti prostora za površinski in podzemni tip odlagališča NSRAO v generalnem potrjujejo pravilnost idejnih rešitev. Dostop do tehničnega, površinskega dela odlagališča je v modelu ocenjen kot zelo in deloma kot srednje primeren za površinsko odlagališče (zeleno in modra barva). Odlagalni – podzemni del odlagališča leži na območju, ki je tudi v modelu ocenjen kot bolj primeren za podzemno odlagališče NSRAO.

Občina Brežice - Lokacija Globoko/KS Globoko

Idejno zasnovo odlagališča NSRAO na lokaciji Globoko v občini Brežice prikazuje slika 11.

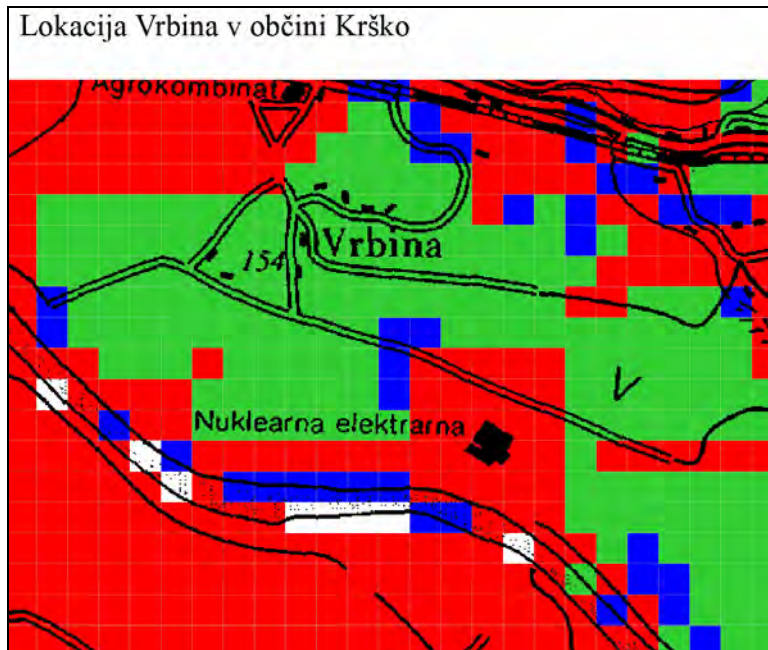


Slika 11: Idejna rešitev odlagališča NSRAO na lokaciji Globoko v občini Brežice in rezultati modela primernosti prostora za površinski in podzemni tip odlagališča.

Na lokaciji Globoko je predlagana površinska izgradnja odlagališča NSRAO. Iz rezultatov modela je razvidno, da je prostor na območju odlagališča deloma primeren za površinsko izgradnjo odlagališča NSRAO, deloma pa narekuje izgradnjo podzemnega odlagališča. Zato bi bilo v nadaljevanju načrtovalskega postopka odlagališča NSRAO na tej lokaciji ustrezno vključiti ter primerjati tudi podzemno alternativo odlagalnega dela odlagališča.

Občina Krško - Lokacija Vrbina/KS Vrbina

Lokacijo Vrbina v občini Krško prikazuje slika 12.



Slika 12: Lokacija Vrbina v občini Krško in rezultati modela primernosti prostora za površinski in podzemni tip odlagališča.

Na lokaciji Vrbina v neposredni bližini Nuklearne elektrarne Krško je predlaganih 5 alternativnih rešitev odlagališča NSRAO (Dolenjski list). Območje teh alternativ je v modelu ocenjeno kot primerno za površinsko odlagališče NSRAO.

8. Ugotovitve

Metodološke ugotovitve so:

- Metoda je uporabna v zgodnjih fazah načrtovalskega procesa za identifikacijo primernosti površja za poseg in smernic za nadaljnje načrtovanje v smislu tehničnih rešitev posega
- Metoda omogoča identifikacijo in analizo medsebojnih konfliktov med značilnostmi prostora in posegom
- Metoda omogoča strokovno utemeljeno umeščanje posegov v podzemlje, zlasti glede na prostorske kriterije
- Metoda zmanjšuje negotovosti načrtovalskega procesa in potrebe po vračanju načrtovalskega postopka v zgodnejše faze
- Metoda rešuje problem pomanjkljivih in negotovih podatkov o podzemlju v zgodnjih fazah načrtovanja
- Metoda omogoča analizo negativnih vplivov podzemnih alternativ posega že v zgodnjih načrtovalskih fazah
- Metoda omogoča analizo rezultatov v smislu različnih odločevalskih kriterijev (varnost, vplivi na prostor, itd.)

9. Diskusija

- 1 ODLOČANJE IN IZBOR NAJPRIMERNEJŠE TEHNIČNE IN LOKACIJSKE ALTERNATIVE
POSEGA: Kako v nadaljnjih načrtovalskih korakih primerjati primernost površinskih in podzemnih alternativ posega s ciljem izbora najboljše rešitve predlaganega posega v prostor?
- 2 GENERALIZACIJA PROSTORSKIH KRITERIJEV IN SMERNIC NAČRTOVANJA: Kljub splošnim in ponovljivim glavnim korakom metode načrtovalskega postopka, je treba prostorske kriterije analizirati individualno za vsak poseg v prostor glede na njegov tip, tehnične lastnosti in prostorske zahteve. Predlagano je nadaljevanje te študije z analizo prostorskih kriterijev in smernic za posamezne tipe posegov v prostor.
- 3 POMEN POSAMEZNIH PROSTORSKIH KRITERIJEV: pomen posameznih prostorskih kriterijev v prostorskih analizah za posamezne tipe posegov v prostor ni jasen. Ali se pomenske vrednosti prostorskih kriterijev lahko določijo vnaprej za posamezne tipe posegov v prostor ali je treba za vsak načrtovalski postopek voditi razpravo do izvedbe posega v prostor?

Viri

- 1 Kontić B., Marušič J., Ogrin D., Golobič M., Uršej Š., Jankovič L., Hudoklin J., Simič S., Kontić D., Rakovec J., Polič M., Kos D.: *Celovito presojanje vplivov na okolje: Rezultati CRP »konkurenčnost Slovenije 2001-2006: Študija ranljivosti prostora in celovita presoja vplivov na okolje za hitro železnico v Sloveniji in regionalni razvojni program statistične regije Goriška 2002-2006«*. Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2005
- 2 Veselič M., Železnik N., Stanojevič L., Viršek S.: *Priprava DLN za odlagališče NSRAO: Predprimerjalna študija za izbor treh potencialnih lokacij za odlagališče NSRAO, Zaključno poročilo – mapa 1, Revizija 1*, Ljubljana: Agencija ARAO, 2005
- 3 Spletna stran Agencije za radioaktivne odpadke (ARAO), Kaj delamo, Lokalna partnerstva (http://www.gov.si/arao/index.php?menu_id=612&lang=sl#) 4.5.2006

1. Dan MR O-2, 19. april 2006

5. Okoljske tehnologije

5.1. Odstranjevanje ostankov zdravilnih učinkovin na pilotnih čistilnih napravah

Tina Kosjek

Institutska mentorica: Ester Heath

Fakultetni mentor: Boris Kompare, Institut za zdravstveno hidrotehniko, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo Univerze v Ljubljani

V zadnjem desetletju narašča število raziskav na področju določanja prisotnosti in učinkov ostankov zdravilnih učinkovin v okolju. Prisotnost ostankov zdravilnih učinkovin v okolju je posledica njihove obstojnosti v okolju, velike proizvodnje in razširjene uporabe. Podatki iz svetovne literature prikazujejo prisotnost zdravilnih učinkovin v površinskih in odpadnih vodah. Vstop zdravilnih učinkovin v okolje lahko zmanjšamo s pravilnim ravnanjem z zdravili. To vključuje tako pravilno obdelavo industrijskih, bolnišničnih in komunalnih odpadnih vod, kakor tudi pravilno ravnanje posameznikov z neuporabljenimi zdravili oziroma zdravili s pretečenim rokom uporabe. Po podatkih iz literature s klasičnimi načini čiščenja odpadnih vod zdravilnih učinkovin ne odstranimo v zadovoljivi meri. Zato je potrebno postopke čiščenja izboljšati oziroma uporabiti dodatne metode odstranjevanja zdravilnih učinkovin na čistilnih napravah.

Za preučevanje obnašanja ostankov zdravilnih učinkovin na čistilnih napravah sem v sodelovanju z Inštitutom za zdravstveno hidrotehniko na Fakulteti za gradbeništvo Univerze v Ljubljani izdelala pilotno čistilno napravo (PČN), ki posnema delovanje klasične komunalne čistilne naprave s poživiljenim blatom. Na PČN preučujem eliminacijo izbranih nesteroidnih protivnetnih učinkovin (NSAID). Predstavnik NSAID (ibuprofen, naproksen, diklofenak in ketoprofen) sem izbrala na osnovi njihove obstojnosti in razširjenosti v Sloveniji in po svetu. Za njihovo kvalitativno in kvantitativno določitev sem razvila analizni postopek, ki vključuje predpripravo vzorca (nakisanje in filtriranje), ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE), derivatizacijo in analizo s plinsko kromatografijo z masno spektrometrično detekcijo (GC-MSD).

Po šestmesečnem neprekinjenem delovanju PČN sem dobila visoko in stabilno odstranitev ibuprofena, ketoprofena in naproksena (> 90 %) iz umetno pripravljene odpadne vode (primerjava koncentracij NSAID na vtoku in iztoku iz PČN). Delež odstranitve diklofenaka je nižji in nestabilen (\approx 60 %). V nadaljevanju raziskav bom preučevala mehanizem odstranitve izbranih NSAIDs na PČN (biorazgradnja, kemijska, toplotna, fotorazgradnja ali adsorpcija na biomaso) ter v primeru razgradnje določila njihove razgradne produkte. V študijo bom vključila tudi druge zdravilne učinkovine (karbamazepin, klofibrinska kislina, protitumorne učinkovine...), preučevala vpliv svetlobe (fotorazgradnja) in vpeljala dodatne postopke čiščenja (pritjena biomasa, ozonizacija / H_2O_2 , uporaba nanomembran, vključitev anaerobnega prekata...). Končni cilj mojih raziskav je aplikacija novorazvite tehnologije čiščenja na pilotni čistilni napravi v večjem obsegu ter na »realnih« (komunalnih, bolnišničnih in/ali industrijskih) čistilnih napravah.

1st MR O-2, April 19, 2006

5. Environment-friendly technologies

5.1. Removal of Pharmaceutical Residues from Pilot Waste Water Treatment Plants

Tina Kosjek

Supervisor at the Jožef Stefan Institute: Ester Heath

Supervisor at the university: Boris Kompare, Institute of Sanitary Engineering, Faculty of Civil and Geodetic Engineering, University of Ljubljana

In the last decade there has been increasing interest in determination of pharmaceutical residues in the environment. Their presence there may be a consequence of their environmental persistence, and/or high production and consumption. Literature data show the presence of pharmaceutical residues in surface and waste waters. Their entry into the environment can be reduced by adequate pharmaceutical waste management, which includes effective treatment of industrial, hospital and municipal wastewaters, as well as appropriate handling of unused or expired drugs. According to the literature, conventional wastewater treatment does not efficiently remove pharmaceutical residues. Therefore, improved or additional removal methods should be applied in wastewater treatment.

To study the fate of pharmaceutical residues in a wastewater treatment plant (WWTP), we designed a small pilot-scale wastewater treatment plant (PWWTP) that mimics the municipal wastewater treatment and uses active sludge obtained from a Slovenian municipal WWTP. The model compounds involved in our study were selected according to their widespread consumption in Slovenia and central Europe. The selected compounds are common representatives of the nonsteroidal antiinflammatory drug: ibuprofen, naproxen, diclofenac and ketoprofen. For their qualitative and quantitative determination, a novel analytical procedure that included sample preparation and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometric detection (GC-MSD) was developed. In the first stage the samples were acidified, filtered and concentrated using solid phase extraction (SPE). In order to achieve a satisfactory chromatographic separation, the compounds were derivatised into more volatile and thermally stable trimethylsilyl esters and analyzed by GC-MSD.

Comparison of influent and effluent PWWTP samples after six months of continuous operation showed a high ($\geq 90\%$) and constant elimination of ibuprofen, naproxen and ketoprofen. In contrast, only limited removal of diclofenac ($\approx 60\%$) was observed under laboratory conditions at both operating concentrations of NSAIDs (0.05 and 0.005 mg/L) in the artificial wastewater.

In the future more attention will be directed to the study of the removal mechanism of NSAIDs in PWWTP (biodegradation, chemical, thermal, photodegradation or adsorption on the biomass), and in the case of biotic or abiotic degradation, the degradation products formed will be identified. To improve elimination in the PWWTP, additional treatment methods will be integrated into the process (attached biomass, ozonization / H_2O_2 , application of nanomembranes, anaerobic conditions,...). Furthermore, the study will be extended to a broader spectrum of pharmaceuticals, e.g. carbamazepine, clofibric acid, antitumour agents, e.t.c.. The final goal of this research is application of newly developed treatment technology to a large-scale pilot wastewater treatment plant and real (municipal, hospital and/or industrial) treatment plants.

Transformations and effects of mercury (Hg) on terrestrial isopods (Isopoda, Crustacea)

Transformations of inorganic mercury ($^{203}\text{Hg}^{2+}$) (reduction to $^{203}\text{Hg}^0$ and methylation to organic Me^{203}Hg) in *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) and its environment were studied, using a purpose-built experimental setup where Hg cycling was followed using $^{203}\text{Hg}^{2+}$ tracer, including assimilation and distribution of T^{203}Hg and Me^{203}Hg in the animals at low Hg concentrations (0,5 and 5 $\mu\text{g Hg/g}$). In continuation, the effects of elevated concentrations of Hg^{2+} in the food (1) on feeding activity by standard laboratory toxicity test protocols and (2) on lysosomal membrane stability (LMS) of *P. scaber* digestive gland tubes (hepatopanceras) *in toto*, by lysosomal latency (LL) assay and the netural red retention (NRR) assay were investigated. LMS was assessed on animals, laboratory exposed to elevated Hg concentrations in the food, and animals collected at unpolluted (Maribor) and polluted (Idrija, Velenje) locations in Slovenia. The formation of $^{203}\text{Hg}^0$ depended on the $^{203}\text{Hg}^{2+}$ concentration in the leaves, moisture and bacteria, which had important role in reduction of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ to $^{203}\text{Hg}^0$ especially in the first day of the experiment. The contribution of the isopod's digestive flora in reduction was negligible compared to the reduction of $^{203}\text{Hg}^{2+}$ to $^{203}\text{Hg}^0$ in the environment. Approximately 3% of T^{203}Hg and only 2% of Me^{203}Hg consumed was assimilated by the animals. Low Me^{203}Hg assimilation and a loss of Me^{203}Hg when comparing assimilated and excreted Me^{203}Hg versus consumed Me^{203}Hg may be explained by the assumption that demethylation of MeHg prevailed over methylation of Hg^{2+} in the animal's digestive system. Feeding activity of laboratory animals fed with 300 $\mu\text{g Hg}^{2+}/\text{g}$ dry weight for five weeks was not significantly affected compared to control group of animals. However, LMS decreased already after 3 days of exposure to 5 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight. LMS in the hepatopancreas of animals from a highly mercury polluted environment (260 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of food, 1600 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of soil) was less affected than in laboratory animals fed with 5 and 50 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight for three days. This probably indicates tolerance of *P. scaber* to mercury in the mercury polluted environment and/ or lower bioavailability of environmental Hg. In animals from Velenje (0,010-0,028 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of food, 1,17 $\mu\text{g Hg/g}$ dry weight of soil) LMS was severely affected, most probably due to synergistic effect of pollutants, originating from Šoštanj thermal power plant emissions.



ODSTRANJEVANJE OSTANKOV ZDRAVILNIH UČINKOVIN NA PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAVAH

Tina Kosjek

Mentorja:

izr.prof.dr. Boris Kompare (FGG),
dr. Ester Heath (IJS)



VSEBINA

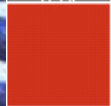
Uvod in cilji dela

Eksperimentalno delo

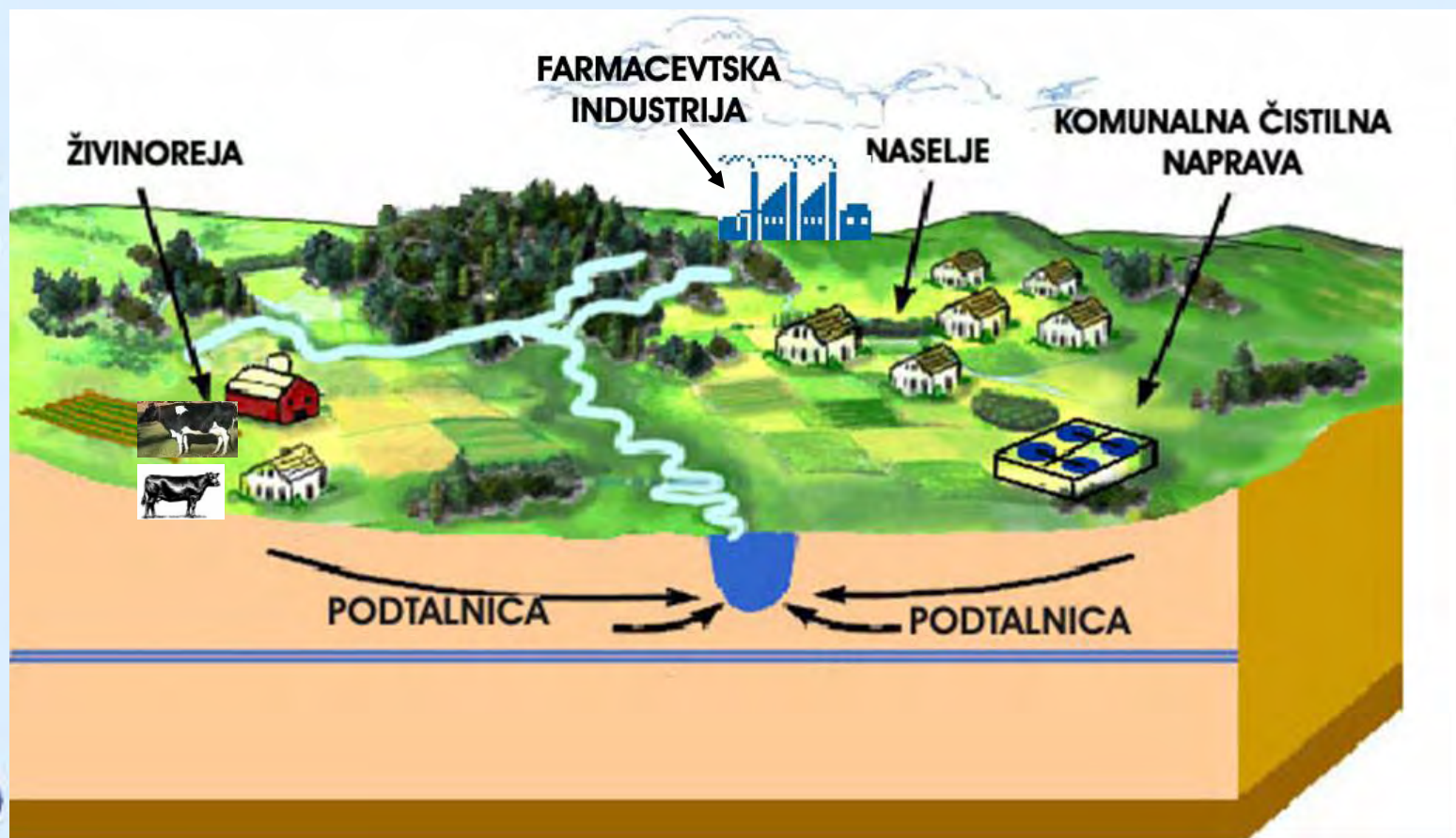
- analizni postopek
- “realni” vzorci
- pilotne čistilne naprave

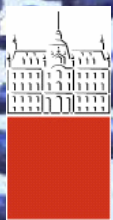
Rezultati

Nadaljevanje



Viri ostankov zdravilnih učinkovin v okolju





Prisotnost ostankov zdravilnih učinkovin v okoljskih vodah



- Vstop v okolje (visoka poraba)

učinkovina	masa (t leto ⁻¹)*	Kje in kdaj? / MIO prebivalcev	Masa v SLO; (t leto ⁻¹)** (2 MIO prebivalcev; l.2001)
Ibuprofen	48-96	Nemčija, 2001/ 82 MIO preb.	0,9
Naproksen	40	Kanada, 2001/ 33 MIO preb.	1,8
Ketoprofen	ni podatkov		0,3
Diklofenak	48-72	Nemčija, 2001	0,6
Klofibrinska ksl.	15-21	Nemčija, 2001	
Sulphametoksazol	16,6-76	Nemčija, 2001	
Trimetoprim	3,3-15	Nemčija, 2001	
Ranitidin	10,67	Italija, 2001/58 MIO preb.	
Karbamazepin	30	Kanada, 2001	
Furosemid	5,76	Italija, 2001	
Amoksicilin	125,75	Italija, 2001	
Bisoprolol	112	Nemčija, 2001	

* K. Kümmerer: Pharmaceuticals in the Environment; 2nd Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004

** T. Kosjek: Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Marec 2004

- **Obstočnost v okolju** (diklofenak, klofibrinska, protitumorne učinkovine, karbamazepin)



Po svetu (reke)...

Zdravilna učinkovina	Kanada*		Nemčija* [ng L ⁻¹] ^a (maks. konc.)
	srednja konc. [ng L ⁻¹]	maks. konc. [ng L ⁻¹]	
Klofibrinska ksl.	15	175	5 – 30
Diklofenak	26	194	5 – 49
Ibuprofen	64	790	50 – 280
Karbamazepin	20	650	1100 ^a
Ketoprofen	12	50	-
Naproksen	94	551	-
Atorvastatin	10	15	-
Pentoksifilin	8	9	-
Ciklofosfamid	5	5	-
Fluoksetin	13	46	-
Trimetoprim	43	134	200 ^a
Sulfametoksazol	-	-	480 ^a

* K. Kümmerer: Pharmaceuticals in the Environment; 2nd Ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004



V Sloveniji...

vzorec	datum vzorčenja	koncentracija (ng L ⁻¹)			
		naproksen	diklofenak	ketoprofen	ibuprofen
KRKA 1	jul.04	-	-	-	-
	sep.04	-	-	-	-
	apr.05	-	-	-	-
KRKA 2	jul.04	310	280	-	-
	sep.04	60	50	-	-
	apr.05	280	310	120	-
LJUBLJANICA 1	jul.04	-	-	-	-
	sep.04	-	-	-	-
LJUBLJANICA 2	jul.04	70	-	-	-
	sep.04	-	-	-	-
SAVA	jul.04	80	10	-	-
	sep.04	-	-	-	-
MURA	jul.04	50	40	-	-
DRAVA 1	jul.04	50	30	-	-
	sep.04	-	-	-	-
DRAVA 2	jul.04	20	30	-	-
	sep.04	40	-	-	-
PŠATA	jul.04	20	-	-	-

T. Kosjek, E. Heath, A. Krbavčič; Environment International 31 (2005) 679-685.

Dan MR; O2, april 2006



Rešitev?

- pravilno ravnanje z ostanki zdravilnih učinkovin

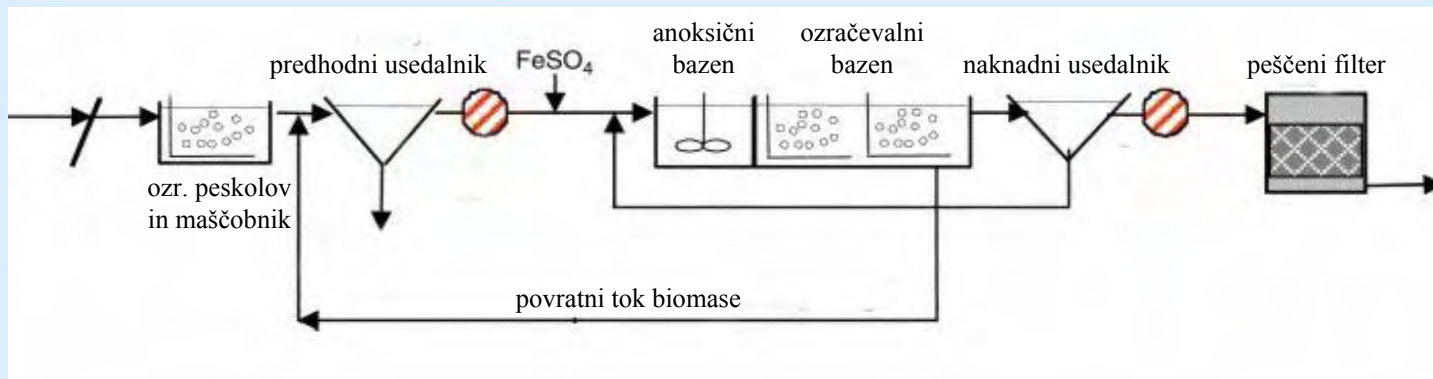
- odstranitev ostankov zdravilnih učinkovin na glavnih virih onesnaženja → preden vstopijo v okolje:
 1. bolnišnične čistilne naprave
 2. čistilne naprave iztokov iz farmacevtske industrije
 3. komunalne čistilne naprave



Delovna hipoteza:



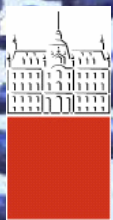
Literatura: klasično čiščenje odpadnih vod zdravilnih učinkovin ne odstrani v zadostni meri,



- določitev učinkovitosti obstoječih čistilnih naprav v Sloveniji
- uporaba izboljšanih / dodatnih metod odstranjevanja zdravilnih učinkovin iz čistilnih naprav

ZATO:

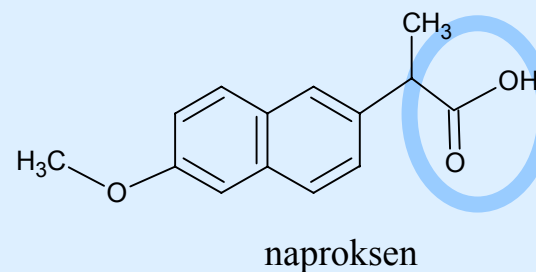
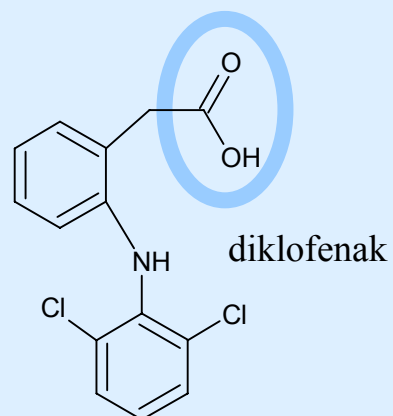
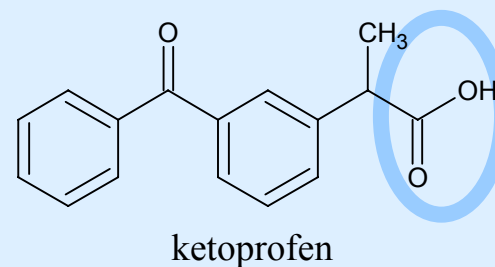
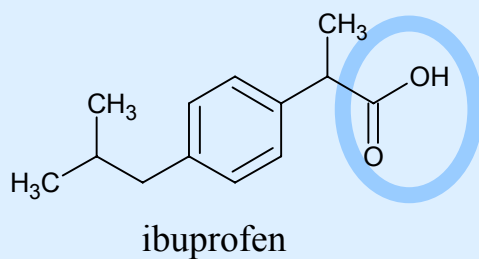
... načrtovanje in izdelava pilotne čistilne naprave



Na osnovi:

1. letnih porab zdravilnih učinkovin v Sloveniji
2. prisotnosti v površinskih vodah v Sloveniji

⇒ izbrani predstavniki NSAIDs (arilalkanojske kisline):





Analizni postopek za določanje NSAIDs v vodnih vzorcih:

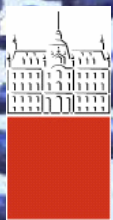
A./ Priprava vzorca

- Priprava vzorca za ekstrakcijo (nakisanje, filtriranje,...)
- Dodatek internega standarda (Mecoprop)
- Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE): Strata™ X
- Derivatizacija: MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil trifluoracetamid)



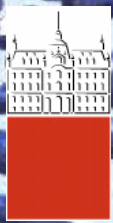
B./ Analiza: plinska kromatografija z masno spektrometrično detekcijo (GC-MSD)

- Separacija: plinska kromatografija (GC)
 - Instrument: HP 6890 GC
 - Kapilarna kolona Zebron ZB-5 (Phenomenex, 30m, 0,25mm, 0,25um)
 - Nosilni plin: He; pretok 37 cm s⁻¹
 - Način injiciranja: injiciranje celotnega vzorca (“splitless”); T injektorja: 250°C; volumen inj.: 1μL
- Identifikacija: plinska kromatografija z masno spektrometrično detekcijo
 - beleženje kromatograma izbranih ionov (SIM) → kvantitativno določanje
 - beleženje kromatograma vseh ionov (SCAN): v območju 50 do 550 masnih enot → identifikacija produktov (bio)razgradnje



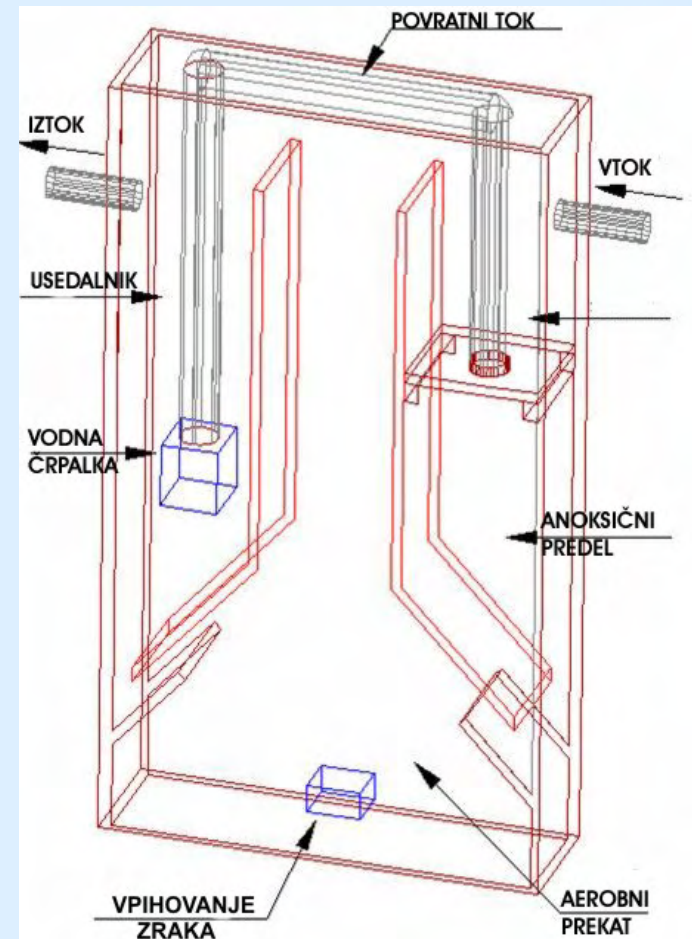
C./ Analizni postopek

- vpeljan za površinske (rečne in vodovodne vode ter vode iz vodnjakov) vode in vode iz pilotnih čistilnih naprav
- optimizacija postopka za analizo odpadnih vod (učinkovitost čistilnih naprav v Sloveniji)



Pilotna čistilna naprava (PČN)

- PČN: podobna klasičnim KČN s poživiljenim blatom
- začetna biomasa: aktivno blato iz CČN Domžale-Kamnik
- zasnova: anaerobni, aerobni in anoksični pogoji
- dimenzija: najmanjša možna, ki še omogoča instalacijo opreme in vzdrževanje → 4,0 L
- dnevni pretok (pripravljenega) hranilnega medija:
 - 2,0 L → retencijski čas v PČN: 48 ur



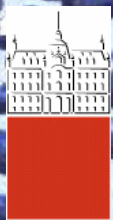


Pilotna čistilna naprava



- trije paralelni reaktorji
- enaki delovni pogoji
- dodatek NSAIDs (ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak) v različnih koncentracijah:
 - R0: kontrolni poskus – brez uvajanja NSAIDs
 - R1: 0,05 mg L⁻¹ vsake učinkovine
 - R2: 0,005 mg L⁻¹ vsake učinkovine





REZULTATI:

Odstranjevanje NSAIDs v PČN



Delež odstranitve NSAIDs, izražen kot srednja in povprečna vrednost:

% odstranitve		srednja vrednost	povprečna vrednost	standardna deviacija
IBUPROFEN	R1	98,9	94,6	9,2
	R2	90,2	89,3	5,5
NAPROKSEN	R1	98,7	96,3	5,3
	R2	89,7	90,7	4,8
KETOPROFEN	R1	98,2	93,5	9,8
	R2	90,5	90,8	6,2
DIKLOFENAK	R1	60,4	62,6	27,7
	R2	59,5	48,1	27,5

- odstranitev izbranih spojin iz reaktorja z višjo koncentracijo (R1) je uspešnejša
- nekonstantna odstranitev diklofenaka (visoka standardna deviacija)



Mehanizem odstranitve v PČN

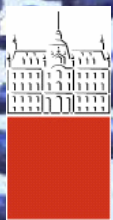


- **Več potencialnih poti:**

- razgradnja (fotodegradacija, kemična razgradnja, toplotna razgradnja)
- biorazgradnja
- adsorpcija na biomaso ali stene reaktorske posode

→ **Nadaljevanje: preučevanje načina odstranitve NSAIDs v PČN:**

- A./ določitev deleža NSAIDs, ki so se adsorbirali na biomaso ali stene reaktorjev
- B./ določitev deleža spojin, ki se je odstranil kot posledica abiotske razgradnje, npr. fotorazgradnje ter identifikacija njihovih razgradnih produktov



Nadaljevanje dela

- Optimizacija postopka določanja NSAIDs v odpadnih vodah ter ocena učinkovitosti obstoječih čistilnih naprav v Sloveniji
- Določitev mehanizma odstranitve izbranih ostankov zdravilnih učinkovin na PČN
- Vpliv svetlobe (fotorazgradnja) na učinkovitost odstranitve
- Identifikacija razgradnih produktov
- Vključitev širšega spektra zdravilnih učinkovin v študijo (bio)razgradnje, npr. klofibrinska kisl., karbamazepin, estrogeni, protitumorne učinkovine,...
- Vključitev dodatnih metod za razgradnjo obstojnejših zdravilnih učinkovin, npr. ozonizacija/H₂O₂, uporaba nanomembran, ipd.
- Aplikacija postopka čiščenja na realni (industrijski, komunalni ali bolnišnični) čistilni napravi



Zahvala

- Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo
- “Raziskave prisotnosti ostankov zdravilnih učinkovin v odpadnih in površinskih vodah ter možnosti njihovega čiščenja” (L1-6552)
- Center odličnosti
okoljske tehnologije

