



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ZDRAVJE
URAD REPUBLIKE SLOVENIJE
ZA KEMIKALIJE

Številka: 18431-1/2008/12

Datum: 17. 6. 2009

BIOMONITORING KEMIKALIJ V OKOLJU

**Predlog pilotnega programa okoljskega biomonitoringa kemikalij
za obdobje 2010-2012**

Junij 2009

Zbrala in uredila:

mag. Lijana Kononenko,
podsekretarka

Odobrila:

dr. Marta Ciraj,
direktorica

VSEBINA

UVOD

1. **Predstavitev predloga in ciljev okoljskega biomonitoringa** (*mag. Lijana Kononenko, Urad RS za kemikalije*)
2. **Zagotavljanje kakovosti pri izvedbi nadzornih meritev kemikalij v okolju in bioloških sistemih: primeri iz humanega biomonitoringa v Sloveniji** (*Milena Horvat, Janja Tratnik, Darja Mazej - Inštitut Jožef Stefan*)

I. DEL: BIOMONITORING V KOPENSKIH EKOSISTEMIH

3. **Uporaba višjih rastlin in lišajev v okoljskem biomonitoringu** (*prof. dr. Franc Batič, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo*)
4. **Okoljski monitoring z vretenčarji v kopenskih ekosistemih Slovenije** (*doc. dr. Boštjan POKORNY, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.*)
5. **Akumulacijska bioindikacija kovin v gozdnem ekosistemu z uporabo gozdnih sadežev** (*dr. Samar Al Sayegh Petkovšek in doc. dr. Boštjan Pokorny, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.*)
6. **Drevesne branike kot bioindikator onesnaženosti okolja s kovinami** (*dr. Helena Poličnik, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.*)
7. **Mahovi in lišaji kot bioindikatorji depozicije kovin, radionuklidov in nekaterih organskih onesnažil zraka** (*dr. Zvonka Jeran, Inštitut Jožef Stefan*)
8. **Predlog programa za okoljski biomonitoring v kopenskih ekosistemih z mikroorganizmi** (*Mandič-Mulec Ines, David Stopar, Janez Hacin - Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za Mikrobiologijo*)
9. **Sistem za monitoring okolja s čebelami - SiMOČ** (*Janko Božič, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo*)
10. **Okoljski monitoring s kemijskimi in biološkimi testi biološke dostopnosti onesnažil v tleh za segment tla - rastline - talni organizmi** (*Marko Zupan, Helena Grčman, Domen Leštan, Metka Udovič, Damjana Drobne, Andreja Hodnik - Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja*)

II. DEL: BIOMONITORING V VODNIH EKOSISTEMIH

Skupni predlog (*doc. dr. Tatjana Tišler, KI, koordinatorica za področje vodnih ekosistemov, doc. dr. Metka Filipič, NIB, dr. Anita Jemec, KI, dr. Gorazd Kosi, NIB, dr. Zdenka Mazej, ERICO, doc. dr. Andreja Ramšak, NIB*)

UVOD

1. Predstavitev predloga in ciljev okoljskega biomonitoringa (mag. Lijana Kononenko, Urad RS za kemikalije)

Prostoživeči organizmi odražajo stanje okolja, v katerem živijo, zato lahko z metodami biomonitoringa služijo kot "zgodnje opozorilo" za potencialno izpostavljenost ljudi. V predstavljenem predlogu pilotne faze raziskav za obdobje treh let (2010-2012) se med drugim predlaga tudi določitev osnovnih (referenčnih) vrednosti kemijskega stanja (prisotnosti onesnaževal) in biološkega stanja za izbrane organizme in ekosisteme. Ta pilotna faza bo služila kot osnova za načrtovanje nadaljnjih raziskav in za oceno sprememb v času (spremljanje trendov) ter za primerjavo rezultatov, kar bodo omogočile tudi ocenjene osnovne vrednosti.

Pilotni program biomonitoringa okolja bo izdelan v sodelovanju z ministrstvom, pristojnim za kmetijstvo in ministrstvom, pristojnim za okolje. Izvajal se bo postopoma (korak za korakom) v treh letih, po vsem ozemlju Republike Slovenije, preko izbranih geografskih območij na temelju razdelitve na statistične regije, vključno z referenčnimi neonesnaženimi območji. Območja so opredeljena v splošnem kot: A) območja ohranjene narave, B) območja narave z zmernimi antropogenimi vplivi in C) degradirano okolje.

Cilj biomonitoringa v okolju je pridobiti statistično pomembne količine podatkov, ki bodo pokazale dejanske obremenitve življenjskega okolja in organizmov z izbranimi onesnaževali in njihove vplive na ekološke funkcije. Dolgoročni cilj je spremljanje trendov stanja v večletnem obdobju. Podatki bodo služili kot podlaga za oceno stanja, tveganja oz. škode, za pripravo in izvajanje pravih varstvenih ali sanacijskih ukrepov, obenem pa bodo omogočili redno spremljanje le-teh, kot npr. določa Zakon o kemikalijah v 49., 50. in 51. členu (prepovedi in omejitve) ter v 51.a členu (biomonitoring kemikalij).

Cilji so enotno definirani za monitoring kemikalij v organizmih, vključno s človekom (humani biomonitoring), z metodami merjenja in spremljanja sprememb v ljudeh in v prosto živečih organizmih, ki nastanejo zaradi njihove izpostavljenosti kemikalijam kot onesnaževalom. Okoljski in humani biomonitoring sta utemeljena na enakih ciljih: statistično pomembna količina podatkov (preiskovancev, vzorcev), izbor parametrov, meritev in opazovanj (kemikalij, biomarkerjev), geografska pokritost. Metode pa so prilagojene glede na razlike, po priporočilih smernic in strokovnih sodelavcev za posamezno področje (zdravstvena ekologija, ekologija mikroorganizmov, rastlin in živali). Po vzpostavitvi okoljskega biomonitoringa nekaj let za biomonitoringom kemikalij v ljudeh naj bi potekala oba programa čimbolj povezano.

Razvoj biomonitoringa na nacionalni ravni je dolgoročen projekt. Podatki, pridobljeni z biomonitoringom, odražajo celotno izpostavljenost določenim onesnaževalom, iz lokalnih točkovnih ali razpršenih virov ter iz njihovega prenosa na dolge razdalje. Zato je biomonitoring najboljši način ocene celokupne izpostavljenosti okolja kemikalijam, pa tudi njihovih vplivov na ljudi, prostoživeče organizme in ekosisteme. S sistematičnim zbiranjem večjega števila bioloških vzorcev in opazovanj v določenem časovnem obdobju bomo pridobili podatke o spremembah in trendih izpostavljenosti v času. Številni podatki monitoringov okolja bodo dobili pomembno dopolnilo, z dodatnimi študijami povezav med podatki o stanju okolja in podatki biomonitoringa bo lahko pojasnjeno veliko več, kot je bilo do sedaj. Biomonitoring pomeni korak naprej k večji medsebojni primerljivosti podatkov in dostopnosti virov podatkov ter k večji učinkovitosti s pomočjo skupnega razvoja znanstveno podprtih instrumentov in strategij. Bistvena pridobitev pa bodo, na podlagi ocene vplivov na okolje, utemeljeni, pripravljeni in izpeljani varstveni ali sanacijski ukrepi.

Pridobljeni podatki biomonitoringa o prisotnosti izbranih nevarnih kemikalij v prostoživečih indikatorskih vrstah organizmov in o njihovih vplivih na le-te in na stanje ekosistemov, bodo služili tudi za namen poročanja Republike Slovenije Komisiji o obremenitvah okolja z obstojnimi organskimi onesnaževali (POPs) na podlagi Uredbe o izvajanju Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta ES o obstojnih organskih onesnaževalih in Stockholmske konvencije o obstojnih organskih onesnaževalih. Podlage za izvajanje biomonitoringa so tudi v zakonodaji Evropske unije in v mednarodnih pogodbah (Krovna direktiva o vodah, Strategija EU za okolje in zdravje, več konvencij (LRTAP, Barcelonska, POPs, ...)).

2. Zagotavljanje kakovosti pri izvedbi nadzornih meritev kemikalij v okolju in bioloških sistemih: primeri iz humanega biomonitoringa v Sloveniji *(Milena Horvat, Janja Tratnik, Darja Mazej - Inštitut Jožef Stefan)*

Zagotavljanje kakovosti rezultatov je integralni del vsakega monitoring programa. V programih, kjer spremljamo prisotnost nizkih koncentracij kemikalij v okolju in ugotavljamo tako časovne kot tudi prostorske razlike, pa je pravilna zasnova programa za zagotavljanje kakovosti ključna za doseganje zastavljenih ciljev. Le-ta mora vključevati vse stopnje izvajanja programa - od načrtovanja, vzorčenja, priprave in hranjenja vzorcev, analize vzorcev, do upravljanja in obdelave podatkov. Glavni namen vsakega takega programa pa je, da pridobimo primerljive in sledljive podatke s pravilno oceno negotovosti rezultatov. Razen redne uporabe referenčnih materialov (certificiranih in ostalih kontrolnih vzorcev), lahko to zagotavljamo z redno udeležbo v primernih medlaboratorijskih testih, kjer mora biti vzorec primerljiv z analiziranimi vzorci, tako po matrici kakor tudi po koncentracijah.

Kot ilustracijo primernosti teh stopenj v praksi predstavljamo rezultate medlaboratorijskih primerjav na področju izvajanja humanega biomonitoringa v okviru EU projekta PHIME. Rezultate elementov v sledovih (Hg, Cd, Pb, Se, v sveži in liofilizirani krvi), ki so jih poročali laboratoriji iz različnih evropskih držav, kjer izvajajo humani biomonitoring, smo uspešno uporabili pri načrtovanju izvedbe humanega biomonitoringa v Sloveniji, pri otrocih med 6 in 11 letom.

Ugotovili smo, da je razen variabilnosti koncentracij znotraj preučevanih skupin otrok, ključnega pomena tudi odstopanje laboratorijev v medlaboratorijskih primerjavah, ki so vključeni v izvedbo biomonitoringa. Z uporabo statistične moči smo tako pokazali, da ima analiza vzorcev v enem laboratoriju prednost iz ekonomskega in tudi strokovno-etičnega stališča, saj lahko zastavljene cilje dosežemo z optimalno manjšim številom oseb, ki so vključene v biomonitoring. Podobno metodologijo je zato smiselno uporabiti tudi pri izvedbi okoljskega biomonitoringa.

I. DEL: BIOMONITORING V KOPENSKIH EKOSISTEMIH

3. Uporaba višjih rastlin in lišajev v okoljskem biomonitoringu (prof. dr. Franc Batič, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo)

I. Uvod

Sledenje stanja okolja v kopenskih ekosistemih z rastlinami in lišaji ima v ekologiji rastlin dolgo tradicijo. Nedvomno je prvi največji razmah tega pristopa zaslediti v fitocenologiji, predvsem zueriško- montpeljejske šole (Ellenberg in sod., 1992). Na osnovi prisotnosti in prevladovanja posameznih rastlinskih vrst v različnih okoljskih razmerah (lastnosti tal, klime, položaja na kontinentih in nadmorske višine) so za vrste evropske flore določene numerične vrednosti za svetlobo, temperaturo, kontinentalnost, vlažnost, pH, vsebnost dušika v tleh in slanosti rastišča. S pojavom vse večjega industrijskega onesnaževanja, razvojem prometa, energetike, industrializacijo kmetijstva in splošno urbanizacijo okolja so začeli rastline uporabljati tudi kot indikatorje onesnaženosti okolja, najprej v neposredni okolici virov zračnega onesnaženja, kasneje s pojavom propadanja gozdov pa tudi širše. V tem obdobju je tudi prevladalo prepričanje, da je uporaba bioindikacije v sklopu na učinke onesnaženja orientiranih okoljski raziskav nujno potrebna, kajti zgolj kemijske meritve onesnažil ne kažejo stanja žive narave, še manj so sposobne dati podatke o integralnih vplivih onesnažil in abiotičnih dejavnikov v časovni in prostorski skali. Vzporedno s tem se je razvijala uporaba bioindikatorjev v toksikoloških študijah v medicini, veterini, pridelavi in predelavi hrane in krme, v smislu zagotavljanja kemijske varnosti. Slednji pristop je le v primerih drastičnih onesnaženj okolja prerastel v ekotoksikološke študije.

Koncept uporabe organizmov za sledenje stanja okolja se je v primerih onesnaženja v kopenskih ekosistemih razvil v največji meri za sledenje vplivov onesnaženja zraka, v manjši meri tudi za sledenje onesnaženja tal, pa še to v največji meri kot posledice onesnaženja zraka. V te namene so bile razvite metode aktivne in pasivne bioindikacije, razviti so bili odzivni in akumulacijski indikatorji (Arndt in sod., 1987). Po opravljenih laboratorijskih raziskavah o vplivu zračnih onesnažil na rastline in lišaje kot tudi po številnih zaplinjevalnih poskusih v naravi (zaplinjanje v komorah brez pokrova (open-top chamber), zaplinjevanje na proste (FAE- free-air enrichment fumigation) so bili za najpogostejša onesnažila zraka (SO₂, HF, NO_x, O₃, PAN,..) izbrani monitorji- indikatorske rastline, s katerimi je mogoče kvalitativno in kvantitativno spremljati onesnaženje okoja. V povezavi s tem so bili razviti standardizirani postopki izpostavitve, opazovanja in spremljanja odziva indikatorskih rastlin, največ v povezavi z aktivnostmi v okviru programa ICP-Vegetation¹, kot enega izmed delovnih področij Delovne skupine za učinke onesnaženega zraka (WGE²) zaradi daljinskega transporta onesnaženega zraka (UNECE CLRTAP³).

V Sloveniji je bil ta programa poleg programa ICP-Forest (WGE, CLRTAP) najbolj usklajena aktivnost biomonitoringa onesnaženosti okolja v kopenskih ekosistemih z rastlinami, s poudarkom na spremljanju škodljivih učinkov ozona na kmetijskih rastlinah in polnaravni vegetaciji (trajna travišča). Pri tem so bile uporabljene različne indikacijske rastline, od sort in klonov na ozon odporne in občutljive plazeče detelje (*Trifolium repens* L.), navadnega glavinca (*Centaurea jacea* L.), tobaka (*Nicotiana tabacum* Bel W3, Bel b, Bel c') in še mnogih drugih indikatorskih vrst gojenih in samoniklih rastlin. Aktivnost je potekala v okviru WGE CLRTAP programa ICP-Vegetation, sprva kot razvoj metod v okviru razvojnih aplikativnih

¹ The International Cooperative Programme on Effects of Air Pollution on Natural Vegetation and Crops

² Working Group on Effects

³ Convention on Long-range Transboundary Air Pollution

projektov, kasneje kot diplomska, magistrska in doktorska dela dodiplomskih in podiplomskih študentov Biotehniške fakultete. Na območju Šaleške in Mežiške doline, v Zasavju in delno tudi v Ljubljani je ta aktivnost potekala tudi kot operativni monitoring večjih termoenergetskih in industrijskih objektov v izvedbi ERIC-a iz Velenja. Na osnovi teh aktivnosti imamo v Sloveniji že vpeljane metode biomonitoringa stanja okolja z rastlinami za primere splošnega onesnaženja zraka, onesnaženja z žveplovimi in fluorovimi spojinami, predvsem pa za monitoring troposferskega ozona (Batič in sod. 1998, Batič in sod. 2006). Poleg omenjenih aktivnosti so bile višje rastline uporabljen kot bioindikatorji onesnaženosti zraka in tal s težkimi kovinami (izbrane vrste samoniklih in gojenih rastlin), splošne onesnaženosti okolja (zraka, tal) z metodami citogenetske bioindikacije in s posameznimi raziskavami učinkov onesnaženega zraka na fiziološki in biokemični ravni (fotosintezna barvila, antioksidanti, encimi kot specifični in nespecifični markerji). Standardizacija monitoringa z višjimi rastlinami je v državah EU izven aktivnosti CLRTAP še v teku.

Verjetno so v svetu kot tudi v Sloveniji najbolj poznani bioindikatorji onesnaženosti zraka epifitski lišaji, tako kot odzivni in akumulacijski indikatorji, razvite so pasivne in aktivne metode bioindikacije (Amann in sod. 1987, Hawksworth & Rose, 1970, Nimis & Purvis, 2002). Zaradi dokaj usklajene aktivnosti v okviru mednarodne lišajske organizacije so razvite metode standardiziranega biomonitoringa z lišaji, predvsem z epifitskimi lišaji kot kazalniki čistoče zraka. V Sloveniji smo v okviru popisa stanja gozodov razvili enostavno metodo za velikopovršinsko sledenje stanja zraka v te namene (Batič & Kralj, 1989, 1995, Batič, 1991, 2002, Batič in sod. 2003,) ki je bila že prej in se še sedaj uporablja v didaktične namene, pri ekološkem ozaveščanju osnovnošolske in srednješolske mladine (Batič, 1984). V okviru bolj poglobljenih študij (diplome, magisteriji, doktorati) so bile v Sloveniji implementirane metode spremljanja stanja zraka s kartiranjem lišajskih vrst (okolice termoenergetskih objektov, večjih mest, visokodebelnih sadovnjakov) na osnovi evropskih smernic (Asta in sod., 2002) in združenja nemških inženirjev (VDI 3799, 1995).

II. Namen in cilj predlaganega okoljskega biomonitoringa z višjimi rastlinami in lišaji

Namen predlaganega okoljskega biomonitoringa z uporabo višjih rastlin in lišajev so naslednji:

- pregled obremenjenosti Slovenije, predvsem onesnaženosti zraka na osnovi kartiranja epifitskih lišajev po različnih regijah z analizo rezultatov dosedanjih raziskav, ki so bile opravljene na Biotehniški fakulteti kot tudi nekaterih drugih institucijah v Sloveniji (GIS, IJS, Erico Velenje).
- Opraviti nova kartiranja epifitskih lišajev v predvidenih območjih z uporabo usklajenih metod kartiranja epifitskih lišajskih vrst in eventuelne analize izbranih indikatorskih vrst glede na tarčna onesnažila (v sodelovanju z drugimi inštitucijami (IJS, ERICo Velenje).
- V okviru projekta ICP-Vegetation: **“Monitoring učinkov ozona na vegetaciji ”** izvesti lončni poskus z izbranimi indikatorskimi rastlinami po protokolu ICP-Vegetation, kar bi bila dobra okoljska podlaga za opredelitev nevarnosti izpostavitve ljudi fotooksidantom, ki jih z akumulacijskimi metodami biomonitoringa težje sledimo.
- Na osnovi usklajenih metod biomonitoringa obremenjenosti s kovinami in ciljnim organskimi onesnažili (PAH) izvesti biomonitoring s priporočenimi testnimi rastlinami in živalskimi organizmi, predvsem v agroekosistemih po posameznih regijah, če bodo bioindikatorji na voljo (osnova bo evropska standardizacija biomonitoringa onesnažil z višjimi rastlinami, sodelovanje z doc. dr. H. Grčman in prof. dr. D. Leštan-glejte njihov predlog).

III. Metode dela

Vrste biomonitoringa

a) Biomonitoring z lišaji bomo izvajali na dveh nivojih. Prvi nivo bo obdelava vsakokratnega popisa stanja gozdov na izbranem območju. V okviru popisa stanja gozdov se že od leta 1987 spremlja popis obrasti gozdnega drevoja z lišaji, ki ga po ustrznem uvajanju izvajata skupaj Gozdarski inštitut Slovenije in Zavod za gozdove RS (s skorjastimi, listastimi in grmičastimi lišaji) na 4 x 4 km mreži (okrog 750 lokacij, vsakih nekaj let) in na 16 x 16 km mreži (vsako leto, ~ 60 lokacij), ki vključuje v glavnem lokacije, ki so izven urbanih področij. Za potrebe okoljske biomonitoringa kot podlage za humani biomonitoring bi ovrednotili stanje lišajske obrasti kot merilo čistosti zraka.

b) Na izbranih območjih bi s standardizirano metodo (VDI 3799, EU-standard (Asta in sod., 2002)) skartirali urbana območja in s tem dokaj natančneje opredili splošno stanje čistoče ozračja, na osnovi indikacijskih vrednosti indeksa in pojavljanja posameznih vrst tudi ocenili obremenitve s posameznimi onesnažili (povezava z delom Jeranove, IJS). Predvidevamo sodelovanje z ERICo Velenje in drugimi kvalificiranimi lihenologi v Sloveniji.

c) Po protokolu programa ICP-Vegetation (Hayes in sod. 2006) bomo izvedli biomonitoring troposferskega ozona in ostalih fotooksidantov z izbranimi indikatorskimi rastlinami (sorte navadnega fižola, biotipi navadnega glavinca, plazeče detelje, v povezavi s standardizacijo biomonitoringa z višjimi rastlinami v območju EU). Predvidevamo sodelovanje z ERICo Velenje.

Preglednica 1: Finančno ovrednotenje:

Aktivnost	material /ure dela	Vrednost (v Evrih)
Monitoring ozona in fotooksidantov z višjimi rastlinami; ocena stroškov za eno mesto	material (lonci, zemlja, zaščitna sredstva) tedenska opazovanja 30 ur po 34, 12 E obdelava podatkov 15 ur po 34, 12 E	850,00 1023, 6 511, 8 Skupaj: 2384 E (brez DDV)
Popis lišajev v izvedbi GIS	Obdelava podatkov 70 ur (za 850 točk) po 34, 12 E	2388,4 E (brez DDV)
Popis epifitskih vrst: EU ali VDI metoda	6 dreves na ploskev = 3 ure po 34, 12 E; Število ploskev je odvisno od dogovora; mreža 4 x 4 km	102,36 E x št. ploskev
Obdelava rezultatov, priprava poročila	250 ur	8530 E

* Predračun stroškov izvedbe je preliminarne, ker obseg dela (število ploskev kot tudi izbrane metode) še niso dokončno določeni.

IV. Viri

Ammann, K., Herzig, R., Liebendörfer, L., Urech, M., 1987. Multivariate correlation of deposition data of 8 different air pollutants to lichen data in a small town in Switzerland. *Advances in Aerobiology* 51: 401-406.

Arndt, U., Nobel, W. & Schweizer, B. (1987) *Bioindikatoren. Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse*. Stuttgart : Eugen Ulmer.

Asta J, Erhardt W, Ferretti M, Fornasier F, Kirschbaum U, Nimis PL, Purvis OW, Pirintsos S, Scheidegger C, van Haluwyn C, Wirth V (2002) Mapping lichen diversity as an indicator of environmental quality. In: Nimis PL, Scheidegger C, Wolseley PA (Ed.), *Monitoring with Lichens - Monitoring Lichens*, Nato Science Program-IV, *Kluwer Academic Publisher*, The Netherlands, volume IV:273-279.

Batič, F., 1984. Ugotavljanje onesnaženosti zraka s pomočjo epifitskih lišajev in lišajska karta Slovenije kot rezultat dela. V: *Raziskovanje onesnaženosti zraka v Sloveniji 2. Dosedanje delo I nnavodila za naprej*. Prirodoslovno društvo Slovenije. Ljubljana, str20-26.

Batič, F., 1991. Bioindikacija onesnaženosti zraka z epifitskimi lišaji. *Gozd. vest.* 49(5): 248-254.

BATIČ, Franc, BIENELLI-KALPIČ, Andreja, CELAR, F..., CIGLAR, Roža, DŽUBAN, T..., ČUHALEV, Igor, KOPUŠAR, Nataša, MIKUŽ, Tina, PAČNIK, Leopolda, SINKOVIČ, T..., ŠIRCELJ, Helena, TURK, Boris, TURZA, J..., ZUPANČIČ, B.... Results of the ICP-Crops project carried out in Slovenia = Izsledki ICP-Crops projekta v Sloveniji. V: REČNIK, Metka (ur.), VERBIČ, Jože (ur.). *Kmetijstvo in okolje : zbornik posveta : proceedings of the conference, Bled, 12. - 13. 3. 1998*. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije, 1998, str. 565-572.

Batič, F., 2002. Bioindication of sulphur dioxide pollution with lichens. In: Kranner I, Beckett RP, Varma AK, editors. *Protocols in Lichenology*. Springer Lab Manual. p 484-503.

Batič, F., Kralj, T., 1989. Bioindikacija onesnaženosti zraka z epifitsko lišajsko vegetacijo pri inventurah proparadnja gozdov. *Zborn. gozdarsva in lesarstva* 34: 51-70.

Batič, F., Kralj, T., 1995. Bioindikacija onesnaženosti ozračja v gozdovih z epifitskimi lišaji. *Zborn. gozdarstva in lesarstva* 47: 5-56.

Batič, F., Tekavec, D., Turk, B., Mayrhofer, H., Poličnik, H., 2003. Mapping of epiphytic lichen flora in orchards and on chosen broadleaves with different methods. In: Jeran Z, Tkavc M, editors. *BioMAP, Proceedings (electronic source) of the 3rd International Workshop on Biomonitoring of Atmospheric Pollution (with emphasis on trace elements); 2003 September 21-25; Bled. Slovenija. Jožef Stefan Institute*. p 402.1-402.9.

BATIČ, Franc, TURK, Boris, PLANINŠEK, Anton, ZUPANČIČ, Boris, DROGOUDI, P., TUBA, Zoltán. Ten years of monitoring troposphere ozone by plants in Slovenia and some comparisons with results of Greece and Hungary. V: *4th International workshop on biomonitoring of atmospheric pollution (with emphasis on trace elements). BioMAP : book of abstracts : Agios Nikolaos, Greece, September 17-21, 2006*. [S. I: University of Crete, Department of Biology, 2006], str. 12-13.

Hawksworth, D.L., Rose, F., 1970. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using lichens. *Nature* 227: 145-148.

Ellenberg, H., Weber, H.-E., Düll, R., Wirth, V., Werner, V., Paulissen, D., 1992. *Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. Scripta Geobotanica, Vol.18, second edition, Verlag Erich Goltze, Göttingen*, 258 str.

Hayes F, Mills G, Harmens H, Novak K, Williams P, 2006. ICP Vegetation experimental protocol for monitoring the incidences of ozone injury on vegetation. *Natural Environment Research Council, icpvegetation.ceh.ac.uk*, pp. 28.

VDI Guideline 3799, Part 2, 1995. Measurement of immission effects. Measurement and evaluation of phytotoxic effects of ambient air pollutants (immissions) with lichens. Procedures for standardization of lichen transplantation.

4. Okoljski monitoring z vretenčarji v kopenskih ekosistemih Slovenije (doc. dr. Boštjan POKORNY, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.)

Izhodišča

Onesnaženost okolja lahko ugotavljamo s pomočjo bioindikatorjev (biomonitorjev) – organizmov, ki s svojimi življenjskimi funkcijami, razširjenostjo, kemično sestavo, fiziološkimi odzivi in morfološko-anatomskimi značilnostmi odsevajo razmere v okolju oziroma omogočajo zgodnji vpogled v prostorsko in časovno razsežnost vpliva onesnažil na življenjsko združbo (Arndt in sod., 1987; Batič, 1994, 1997; Markert in sod., 2003). Kot takšni **predstavljajo pravilno izbrani bioindikatorski organizmi zgoden/pravočasen opozorilni sistem (early-warning system), ki kaže na morebitno izpostavljenost/ogroženost posameznih vrst in združb, vključno z ljudmi.** Poleg zgodnjega odkrivanja prisotnosti dejavnikov okoljskega stresa in izpostavljenosti populacij/vrst/ekosistemov onesnaženosti okolja je ena največjih prednosti bioindikacije (biomonitoringa) možnost opravljanja retrospektivnih analiz (Peterle in Sawicka-Kapusta, 1991; Tataruch in Kierdorf, 2003), ki so pomembne za: (i) določitev najpomembnejših virov emisij v določenem časovnem trenutku; (ii) spremljanje in vrednotenje uspešnosti različnih ukrepov za zmanjšanje emisij onesnažil v okolje.

V svetu se za bioindikacijo onesnaženosti okolja v kopenskih ekosistemih zelo uspešno uporabljajo različne vrste vretenčarjev, zlasti ptičev (zbrano v Becker, 2003) in sesalcev (zbrano v Tataruch in Kierdorf, 2003). Med slednjimi se pogosto uporabljajo mali sesalci (zlasti žužkojedi), zajci, male zveri (npr. lisica), rogarji (npr. gams) in različne vrste iz družine jelenov (*Cervidae*), še zlasti **srnjad (*Capreolus capreolus* L.). Slednja je med vsemi vrstami prostoživečih vretenčarjev v Evropi prepoznana kot najprimernejša vrsta za bioindikacijo onesnaženosti okolja z različnimi onesnažili** (Tataruch in Kierdorf, 2003). Srnjad namreč izpolnjuje številne kriterije, ki naj bi jih izpolnjevala vrsta, katero želimo uporabiti v bioindikativne namene: visoka stopnja kopičenja onesnažil; pozitivna povezava med vnosom onesnažil v ekosisteme in njihovimi vsebnostmi v tkivih srnjadi; določena tkiva (rogovje, čeljusti) omogočajo vsebinsko utemeljene in zanesljive retrospektivne raziskave; standardizirane vzorčevalne in analitske metode lahko enostavno razvijemo; vrsta ni ogrožena in ima ekološki optimum skoraj povsod v Evropi; teritorialen način življenja z arealom aktivnosti, ki je praviloma bistveno manjši od 100 ha; ekološke in fiziološke značilnosti vrste so dobro poznane; specifičen način prehranjevanja (rastlinojedi izbiralec); relativno dolga življenjska doba; etično sprejemljivo vzorčenje v sklopu rednega odstrela živali (samo v Sloveniji je letno uplenjenih med 35.000 in 45.000 osebkov srnjadi); pomembna zastopanost mesa srnjadi v prehrani ljudi (zbrano v Pokorny, 2003; Tataruch in Kierdorf, 2003).

Veliko primernosti srnjadi za bioindikacijo onesnaženosti okolja v kopenskih ekosistemih Slovenije stopnjuje dejstvo, da gre za najpomembnejšo vrsto divjadi, katere odvzem (odstrel) iz lovišč je ne le zelo številčen, temveč tudi izjemno dobro načrtovan, nadziran in dokumentiran. Tako obstajajo za vsak odstreljen ali kako drugače izločen osebek srnjadi zelo natančni podatki o spolu, starosti, telesni masi kot kazalniku vitalnosti osebkov, masi rogovja (v primeru moškega spola), datumu in natančni geografski lokaciji uplenitve. Vsi naštetih podatki so sproti dostopni tudi v on-line elektronski obliki, in sicer prek nacionalnega lovsko-informacijskega sistema. Ustvarjene baze podatkov in njihova dostopnost so izjemnega pomena tako z vidika proučevanja vplivnih dejavnikov na vsebnosti onesnažil v izbranih ciljnih organih/tkivih vzorčnih osebkov kot tudi z vidika ugotavljanja vpliva izpostavljenosti onesnažilom na telesno stanje (kondicijo) živali.

Zaradi navedenih dejstev je bilo **v Sloveniji v zadnjem desetletju izvedenih večje število raziskovalnih projektov, v katerih je bila srnjad uporabljena kot bioindikator onesnaženosti okolja,** in ki so bili financirani bodisi neposredno iz proračunskih sredstev

(aplikativni in CRP projekti) ali s strani velikih točkovnih virov emisij (npr. Termoelektrarna Šoštanj, Rudnik Žirovski vrh). Tako so bile izvedene naslednje aktivnosti:

- Biomonitoring z živim srebrom onesnaženih območij Slovenije (Idrija, Podljubelj), in sicer z metodo akumulacijske bioindikacije (določitev vsebnosti različnih oblik Hg v številnih tkivih sicer relativno majhnega vzorca osebkov srnjadi) ter z ugotavljanjem sprememb oblik Hg (metilacija, demetilacija) v organizmu srnjadi (Gnamuš, 2000).
- Akumulacijska bioindikacija onesnaženosti večjega števila območij Slovenije (Šaleška dolina, Zgornja Mežiška dolina, Zasavje, Poljanska dolina, vojaški poligon Poček, Kozjansko, Kočevsko, Pokljuka) s kovinami, in sicer z določitvijo vsebnosti primarno Pb, Cd, Hg in As, pa tudi Ni, Cr, Zn in Cu v >1000 vzorcih notranjih organov (ledvice, jetra, vranica) >400 osebkov srnjadi, uplenjene v naštetih območjih v letih 1997 – 2006 (Pokorny, 2000, 2003; Pokorny in sod., 2001, 2006; Pokorny in Ribarič-Lasnik, 2002; Pokorny in Zaluberšek, 2005, 2007).
- Akumulacijska bioindikacija onesnaženosti Šaleške doline s policikličnimi aromatskimi ogljikovodiki (PAH-i), in sicer z določitvijo vsebnosti 16 EPA-PAH-ov v ledvicah in jetrih 17 osebkov srnjadi, uplenjenih v letu 2006 v tem območju (Pokorny in Zaluberšek, 2007).
- Retrospektivna bioindikacija (zgodovinski biomonitoring) spreminjanja onesnaženosti okolja večjega števila območij Slovenije (Šaleška dolina, Zgornja Mežiška dolina, Poljanska dolina, vojaški poligon Poček, Posavje) s svincem in fluoridi, in sicer z določitvijo vsebnosti onesnažil v >250 rogovjih srnjakov, uplenjenih v naštetih območjih v obdobju 1925 – 2007 (Pokorny, 2003, 2006a, 2006b; Pokorny in sod., 2004a, 2009).
- Ugotavljanje odziva (reakcije) srnjadi na izpostavljenost onesnaženju kot pomembni komponenti okoljskega stresa, in sicer z meritvami nihajoče asimetrije rogovja srnjakov, uplenjenih v Šaleški dolini v obdobju 1961 – 2002 (Pokorny in sod., 2004b, 2004c).
- Zgodovinski biomonitoring spreminjanja onesnaženosti Šaleške doline s fluoridi, in sicer z določitvijo vsebnosti fluoridov v 200 vzorcih spodnjih čeljusti srnjadi, uplenjene v tem območju v obdobju 1997 – 2007 (Jelenko in sod., 2009).
- Ugotavljanje onesnaženosti celotne Slovenije s fluoridi v zelo veliki prostorski resoluciji (1 x 1 km mreža kvadrantov, kar omogoča zelo natančno lociranje odstreljene srnjadi v t.i. lovskem informacijskem sistemu), in sicer z metodo odzivne bioindikacije, t.j. z ocenjevanjem stopnje zobne fluoroze čeljusti vseh (!) osebkov srnjadi, ki so bili iz slovenskih lovišč izločeni v letu 2007 (raziskava trenutno poteka na ERICo Velenje).
- Ugotavljanje anomalij spodnjih čeljusti in zobovja srnjadi, med katerimi so vsaj nekatere tudi posledica onesnaženosti okolja in so kot take dober odzivni bioindikator (raziskava trenutno poteka na ERICo Velenje).

V zgoraj naštetih raziskovalnih aktivnostih in biomonitoringih pridobljeni rezultati in izkušnje omogočajo racionalnejše izvajanje okoljskega monitoringa kemikalij, saj so bila nekatera območja/regije upoštevaje določene skupine onesnažil v preteklosti zelo intenzivno proučene (npr. Šaleška dolina), posamezni raziskovalni projekti pa tudi trenutno potekajo, za kar so finančna sredstva že zagotovljena (npr. popolna vseslovenska bioindikacija onesnaženosti okolja s fluoridi z določitvijo stopnje zobne fluoroze srnjadi). Vsak osebek katerekoli vrste vretenčarjev je namreč individuum s svojstvenimi ekološkimi in sociobiološkimi lastnostmi, zato združevanje vzorcev z namenom izdelave »povprečnih vzorcev« ni smiselno (Tataruch in Kierdorf, 2003), kar ima za posledico potrebo po relativno velikem številu vzorcev posameznih živali. **Zaradi tega je smiselno v primeru vretenčarjev v začetnih letih okoljski monitoring omejiti na zgolj eno živalsko vrsto – t.j. srnjad, za katero že obstajajo številni v preteklosti zbrani rezultati in možnost njihove vključitve v program monitoringa kemikalij.** Seveda pa v primeru zadostnih sredstev ne izključujemo možnosti razširitve programa monitoringa v naslednjih letih tudi na nekatere druge vrste, ki bi lahko bile ustrezen kazalnik onesnaženosti okolja z določenimi skupinami onesnažil – npr. na: (i)

poljskega zajca (*Lepus europaeus*) v agrarni krajini severovzhodne Slovenije (zlasti z vidika določitve obremenitve vrste in ekosistemov s pesticidi); (ii) raco mlakarico (*Anas platyrhynchos*) na vseh večjih stoječih in tekočih vodah (povezava vodnih in kopenskih ekosistemov, še zlasti v smislu določitve onesnaženosti okolja s kovinami).

Opredelitev vsebine okoljskega monitoringa z vretenčarji (srnjadjo)

Predvidene aktivnosti

Upošteva cilje okoljskega biomonitoringa kemikalij, dosedanje izkušnje z uporabo kopenskih vretenčarjev kot bioindikatorjev onesnaženosti okolja (zbrano v Tataruch in Kierdorf, 2003), slovenske izkušnje z uporabo srnjadi kot bioindikatorske vrste (Pokorny, 2003; Pokorny in sod., 2006; Pokorny in Zaluberšek, 2007), kriterije za izbor in sam izbor prioritarnih kemikalij ter dogovore in zaključke znotraj ekspertne skupine za okoljski monitoring kemikalij, predlagamo, da se v sklopu okoljskega monitoringa z vretenčarji (srnjadjo) v kopenskih ekosistemih Slovenije izvedejo naslednje aktivnosti:

- 1. Celovit pregled (sinteza) dosedanjih izkušenj in rezultatov bioindikacije/biomonitoringa onesnaženosti okolja z uporabo različnih vrst kopenskih vretenčarjev v Sloveniji** (prva delovna faza, v letu 2010).
- 2. Detajlna vseslovenska določitev trenutne onesnaženosti okolja s fluoridi, in sicer z uporabo spodnjih čeljusti srnjadi** ter kombinacijo akumulacijskih (določitev vsebnosti fluoridov v 600 čeljustih srnjadi iz Podravske (okolica Kidričevega), Savinjske (Šaleška dolina), Zasavske (Zasavje) in Dolenjske (Kočevsko) regije) ter odzivnih bioindikacijskih metod (določitev stopnje zobne fluoroze kot kazalnika izpostavljenosti osebkom fluoridom, in sicer na vseh čeljustih odrasle srnjadi, uplenjene v letih 2007/08 v vseh slovenskih loviščih) (v letu 2010; aktivnosti izvedene s finančnimi sredstvi ARRS, rezultati bodo neposredno dostopni tudi za namene okoljskega monitoringa kemikalij).
- 3. Določitev vsebnosti kovin (Pb, Cd, As, Cu, Zn, Cr in Ni) ter Hg v ledvicah srnjadi** (izbranim ciljnim organu za kovine/Hg), in sicer v po 40 vzorcih (po 10 mladičev, 10 enoletnih živali in 20 odraslih živali) na posamezno regijo – skupaj 480 vzorcev oziroma 160 vzorcev letno (obdobje 2010 – 2012).
- 4. Določitev vsebnosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH-ov) v polovici števila jeter tistih osebkom**, za katere bomo določali vsebnosti kovin v ledvicah; po 20 vzorcev na regijo – skupaj 240 vzorcev oziroma 80 vzorcev letno (obdobje 2010 – 2012).
- 5. Določitev ostankov organokloriranih pesticidov in polikloriranih bifenilov (PCB), in sicer v obledvični tolšči** polovice naključno izbranih osebkom iz nabora pod točko 3, t.j. po 20 vzorcev (po 5 mladičev, 5 enoletnih živali in 10 odraslih živali) na posamezno regijo – skupaj 240 vzorcev oziroma 80 vzorcev letno (obdobje 2010 – 2012).
- 6. Določitev ostankov dioksinov in furanov (PCDD in PCDF), dioksinom podobnih PCB-jev ter polibromiranih difenil etrov (PBDE) v posameznih vzorcih obledvične tolšče** naključno izbranih osebkom iz nabora pod točko 3, in sicer po 5 vzorcev odrasle srnjadi iz treh degradiranih okolij (območja C), dveh območij z zmernimi antropogenimi vplivi (B) in enega območja ohranjene narave (A) – skupaj 30 vzorcev oziroma 10 vzorcev letno (obdobje 2010 – 2012).
- 7. Retrospektivni biomonitoring sprememb v onesnaženosti okolja z določitvijo vsebnosti Pb, njegovih stabilnih izotopov (^{206}Pb , ^{207}Pb , ^{208}Pb) in fluoridov v treh zgodovinskih serijah vzorcev rogovja**, uplenjenih v treh izbranih območjih (vsako leto vključeno po eno območje) v obdobju zadnjih petdesetih let – skupaj 150 vzorcev oziroma 50 vzorcev letno (obdobje 2010 – 2012).
- 8. Detajlna analiza nekaterih dostopnih kazalnikov vitalnosti osebkom srnjadi** (npr. telesne mase, mase rogovja, pojav anomalij in obolenj spodnjih čeljusti/zobovja) v odvisnosti od različnih habitatnih dejavnikov, vključno z dejavniki, ki vplivajo na emisije in

imisijske onesnažil (analize v GIS okolju) ter v odvisnosti od ugotovljenih vsebnosti onesnažil v izbranih ciljnih organih/tkivih posameznih osebkov, in sicer **z namenom ugotavljanja vpliva izpostavljenosti kemikalijam/onesnaženosti okolja na odziv (vitalnost) osebkov ter posledično na stabilnost populacij** (obdobje 2010 – 2012).

Izbor ciljnih organov/tkiv

Kot ciljne akumulacijske organe/tkiva predlagamo tiste organe, v katerih poteka najbolj intenzivna akumulacija posameznih skupin onesnažil, in ki so hkrati primerni tudi z vidika dostopnosti vzorcev ter izpolnjevanja nekaterih organizacijsko-tehničnih pogojev (npr. enostavnost vzorčenja, možnost skladiščenja, minimalna nevarnost sekundarnega onesnaženja zaradi odstrela živali ali ravnanja z vzorci v loviščih). **Izbrani organi/tkiva so:** (i) **ledvice** (določitev vsebnosti kovin in Hg); (ii) **jetra** (določitev vsebnosti PAH-ov); (iii) **obledvično maščevje oz. tolšča** (določitev vsebnosti lipofilnih onesnažil, kot so organoklorni pesticidi, PCB-ji, dioksini in furani); (iv) **rogovje** (retrospektivna določitev vsebnosti onesnažil z afiniteto do akumulacije v kostnih tkivih – Pb in fluoridi).

Izbor ciljnih območij

Okoljski monitoring kemikalij v kopenskih ekosistemih z uporabo srnjadi bo potekal v **obdobju 2010–2012, in sicer v vseh 12 statističnih regijah Slovenije, pri čemer bodo vsako leto v program monitoringa vključene po 4 regije.** Predlagamo, da je letna razporeditev regij naslednja (seveda je možna tudi drugačna razporeditev, ki bo skladna z enotnim terminskim planom okoljskega monitoringa kemikalij): (i) 2010 – Jugovzhodna Slovenija, Osrednjeslovenska, Gorenjska in Podravska regija; (ii) 2011: Savinjska, Koroška, Pomurska in Goriška regija; (iii) 2012: Zasavska, Spodnjeposavska, Notranjsko-kraška in Obalno-kraška regija. **V vsaki izmed 12 regij Slovenije bo izbrano po eno raziskovalno območje, ki ga bo praviloma sestavljala površina treh lovišč** (skupaj cca. 10.000 ha raziskovalne površine/regijo). **Vsako leto bodo tako v program vključena 4 območja**, in sicer eno območje ohranjene narave (območje A), najmanj eno območje narave z zmernimi antropogenimi vplivi (območje B) in najmanj eno degradirano okolje (območje C). Natančnejši razpored raziskovalnih območij je razviden iz *preglednice 1*.

Preglednica 1: Predlog časovnega in prostorskega razporeda biomonitoringa s srnjadjo.

Leto	Regija	Tip območja	Raziskovalno območje	Opomba*
2010	Jugovzhodna Slovenija	A	Kočevski Rog	
	Osrednjeslovenska regija	B	Ljubljansko barje	6
	Gorenjska regija	C	Okolica Jesenic, Mežaklja	6
	Podravska regija	B/C	Ptujsko polje, okolica Kidričevega	7
2011	Savinjska regija	C	Celjska kotlina	6, 7
	Koroška regija	C	Zgornja Mežiška dolina (tudi okolica Raven)	
	Pomurska regija	B	Prekmurska ravnina (agrarni ekosistemi)	6
	Goriška regija	A	Banjšice, Trnovski gozd	
2012	Zasavska regija	C	Zasavje	6
	Spodnjeposavska regija	B	Brežiško-krško polje, Krakovski gozd	
	Notranjsko-kraška regija	A	Snežnik	6, 7
	Obalno-kraška regija	B	Okolica Sežane, Divače in Kozine	

* V vseh naštetih območjih se izvedejo vse v poglavju 2.1 predvidene aktivnosti, z izjemo 6. aktivnosti (določitev ostankov PCDD, PCDF in PBDE), ki se izvede le v območjih, označenih s številko 6 v zgornji preglednici, in 7. aktivnosti (retrospektivni biomonitoring z uporabo rogovja), ki se izvede le v območjih, označenih s številko 7.

Organizacija in metode dela

Celoten okoljski monitoring z uporabo srnjadi naj bo koordiniran s strani ene institucije, ki ima izkušnje z biomonitoringom s to vrsto in ima tudi možnosti ustreznih kontaktov v Lovski zvezi Slovenije oziroma neposredno z upravljavci z lovišči. Zbiranje vzorcev je namreč možno zgolj z optimalnim sodelovanjem z upravljavci z lovišči, in sicer v sklopu rednega (z letnimi načrti lovišč predpisanega) odstrela srnjadi. Vzorce notranjih organov in maščobnega tkiva bodo zato (po predhodnem informiranju in kratkem usposabljanju) na terenu vzorčili odgovorni predstavniki lovišč (t.j. gospodarji oz. prevzemniki divjadi), medtem ko bodo vzorce rogovja (le-to je dostopno v trofejnih zbirkah upleniteljev) vzorčili sami izvajalci monitoringa (15-20 vzorcev na izbrano lovišče).

Znotraj posameznega raziskovalnega območja bo vzorčenje ledvic (obe ledvici), obledvične tolšče in jeter potekalo v po treh loviščih, v katerih bo skupaj zbranih po 40 vzorcev vseh naštetih tkiv, in sicer po 10 mladičev (september-oktober, 3-4 vzorci na lovišče), 10 enoletnih živali (maj-junij, 3-4 vzorci na lovišče) in 20 odraslih živali (maj-oktober, 6-8 vzorcev na lovišče) v enakomerni spolni strukturi. Izmed zbranih vzorcev bodo vsi vzorci ledvic vključeni v analize kovin, za določitev vsebnosti organskih onesnažil pa bo naključno izbrano ustrezno število (glej poglavje 2.1) vzorcev jeter ali maščevja. Kemijske analize vzorcev bodo opravljene z ustreznimi kemijskimi metodami v izbranih (primernih) laboratorijih.

Finančna konstrukcija (ocena predvidenih stroškov)

Za izvedbo okoljskega monitoringa s srnjadjo v obsegu, ki je predviden v točki 2.1 tega predloga, je **skupni strošek izvedbe v obdobju 2010–2012 ocenjen na 272.664 EUR, in sicer v enakomerni medletni porazdelitvi (90.888 EUR/leto; glej preglednico 2).** Pri izračunu stroškov je za laboratorijske analize upoštevan 30 % popust glede na tržno ceno. V primeru potrebe po racionalizaciji programa predlagamo, da se stroški izvedbe monitoringa zmanjšajo z izpuščanjem celotnih sklopov analiziranih parametrov in ne z zmanjšanjem števila vzorcev znotraj posameznih parametrov. V primeru potrebe po izpuščanju posameznih parametrov tudi predlagamo, da se parametri izpuščajo po naslednji prioriteti (najprej so navedeni parametri, ki jih je najbolj smiselno izpustiti): (1) PBDE; (2) PCDD, PCDF in dioksinom podobni PCB-ji; (3) svinec v rogovju; (4) fluoridi v rogovju; (5) PCB-ji; (6) organoklorni pesticidi; (7) PAH-i; (8) kovine.

Uporabljene reference

ARNDT, U. / NOBEL, W. / SCHWEIZER, B., 1987. Bioindikatore: Möglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntnisse.- Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 388 s.

BATIČ, F., 1994. Bioindikacija onesnaženosti zraka in njen pomen pri vzpostavitvi integralnega monitoringa.- V: Batič, F. (ed.), Varstvo zraka – stanje in ukrepi za izboljšanje stanja v Sloveniji. Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje, s. 12/1-12/10.

BATIČ, F., 1997. Bioindikacija in stresna fiziologija: princip pri ekosistemskih raziskavah gozdnih ekosistemov.- V: Znanje za gozd (zbornik ob 50. obletnici Gozdarskega inštituta Slovenije). Ljubljana, Gozdarski inštitut Slovenije, s. 93-102.

BECKER, P. H., 2003. Biomonitoring with birds.- V: Markert, B. A. / Breure, A. M. / Zechmeister, H. G. (eds.), Bioindicators & biomonitors: principles, concepts and applications. Amsterdam, Elsevier Science, s. 677-736.

GNAMUŠ, A., 2000. Biološki indikatorji za dolgotrajno spremljanje onesnaženosti okolja z živim srebrom na širšem območju Idrije.- Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 125 s.

JELENO, I. / BIENELLI-KALPIČ, A. / POKORNY, B., 2009. Čeljusti srnjadi kot kazalec kakovosti življenjskega okolja in pripomoček za upravljanje s populacijami.- ERICo Velenje, 63 s.

MARKERT, B. A. / BREURE, A. M. / ZECHMEISTER, H. G. (eds.), 2003. Bioindicators & biomonitors: principles, concepts and applications. Amsterdam, Elsevier Science, 998 s.

PETERLE, T. J. / SAWICKA-KAPUSTA, K., 1991. Pollution effects on wildlife: conveners' report.- V: Bobek, B. / Perzanowski, K. / Regelin, W. (eds.), Global trends in wildlife management. Trans. 18th IUGB Congress, Krakow, Swiat Press, s. 441-443.

POKORNY, B., 2000. Roe deer (*Capreolus capreolus*) as an accumulative bioindicator of heavy metals in Slovenia.- Web Ecol., 1: 54-62.

POKORNY, B., 2003. Notranji organi in rogovje srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) kot bioindikatorji onesnaženosti okolja z ioni težkih kovin.- Doktorska disertacija, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, 193 s.

POKORNY, B., 2006a. Retrospektivni biomonitoring onesnaženosti ekosistemov Šaleške doline s svincem in fluoridi z uporabo rogovja srnjakov.- Zb. Gozd. Les. 80: 65-80.

POKORNY, B., 2006b. Roe deer (*Capreolus capreolus* L.) antlers as an accumulative and reactive bioindicator of lead pollution near the largest Slovene thermal power plant.- Vet. Arhiv 76: S131-S142.

POKORNY B. / RIBARIČ-LASNIK C., 2000. Lead, cadmium and zinc in tissues of roe deer (*Capreolus capreolus*) near the lead smelter in Koroška region (northern Slovenia).- Bull. Environ. Contam. Toxicol., 64: 20-26.

POKORNY, B. / ZALUBERŠEK, M., 2005. Izdelava analize vsebnosti težkih kovin v tkivih srnjadi v okolici Rudnika Žirovski vrh.- ERICo Velenje, 28 s.

POKORNY, B. / ZALUBERŠEK, M., 2007. Srnjad kot bioindikator onesnaženosti okolja.-ERICo Velenje, 47 s.

POKORNY, B. / RIBARIČ-LASNIK, C. / DOGANOC, D. Z. / ADAMIČ, M., 2001. Ledvice srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) kot bioindikator onesnaženosti okolja s težkimi kovinami.- Zb. Gozd. Les. 64: 143-186.

POKORNY, B. / RIBARIČ-LASNIK, C. / GLINŠEK, A., 2004a. Roe deer antlers as a historical bioindicator of lead pollution in the Šalek Valley, Slovenia.- J. Atmosph. Chem. 49: 175-189.

POKORNY, B. / ADAMIČ, M. / RIBARIČ-LASNIK, C., 2004b. Nihajoča asimetrija (s poudarkom na asimetriji rogovja cervidov) kot zgodnji pokazatelj stresa: principi, dosedanja dognanja in možnosti uporabe.- Zb. Gozd. Les. 73: 137-159.

POKORNY, B. / ADAMIČ, M. / RIBARIČ-LASNIK, C., 2004c. Nihajoča asimetrija rogovja srnjakov (*Capreolus capreolus* L.) kot kazalec onesnaženosti okolja in pripomoček za upravljanje s populacijami.- Zb. Gozd. Les. 74: 5-40.

POKORNY, B. / POLIČNIK, H. / AL SAYEGH-PETKOVŠEK, S., 2006. Srnjad kot bioindikator onesnaženosti okolja.- ERICo Velenje, 48 s.

POKORNY, B. / JELENKO, I. / KIERDORF, U. / KIERDORF, H., 2009. Roe deer antlers as historical bioindicators of lead pollution in the vicinity of a lead smelter, Slovenia.- Water Air Soil Pollut. doi: 10.1007/s11270-009-0014-z. (v tisku).

TATARUCH, F. / KIERDORF, H., 2003. Mammals as biomonitors.- V: Markert, B. A. / Breure, A. M. / Zechmeister, H. G. (eds.), Bioindicators & biomonitors: principles, concepts and applications. Amsterdam, Elsevier Science, s. 737-772.

5. Akumulacijska bioindikacija kovin v gozdnem ekosistemu z uporabo gozdnih sadežev (dr. Samar Al Sayegh Petkovšek in doc. dr. Boštjan Pokorny, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.)

Uvod

Obremenjenost gozdnih ekosistemov s kovinami je možno ugotavljati oz. spremljati z uporabo gozdnih sadežev (trosnjakov gliv – gob, jagodičja in užitnih plodov lesnih vrst) kot **akumulacijskih pokazateljev** onesnaženosti gozdnih tal. Kovine namreč sodijo v sam vrh nevarnih snovi zaradi svoje strupenosti (teratogeni, rakotvorni, genotoksični učinki), obstojnosti v okolju in sposobnosti kopičenja v višjih členih prehranjevalnih verig (Adriano, 2001; ATSDR, 2005); posledično je nujno poznati njihove vsebnosti v vseh segmentih ekosistemov oziroma v našem življenjskem okolju.

V slovenskem prostoru je razmeroma malo podatkov o vsebnosti kovin v trosnjakih gliv in še manj podatkov o vsebnosti kovin v ostalih gozdnih sadežih (užitni plodovi lesnih vrst ter divje jagodičje). Izjema so pionirske študije o vsebnosti kovin v trosnjakih gliv iz sedemdesetih let (Stegnar in sod., 1973; Byrne in sod., 1976, 1979) in študije speciacije arzena v nekaterih vrstah gob (Byrne in Tušek-Žnidarič, 1983; Byrne in sod., 1995, 1997; Slekovec, 1995; Šlekovec in sod., 1997).

Edina novejša raziskava o vsebnosti kovin (Cd, Pb, Hg in As) je bila opravljena v obdobju 2000-2007 v imisijskem območju Termoelektrane Šoštanj in v izbranih primerjalnih območjih (imisijsko ogrožena območja: Zasavje in Zgornja Mežiška dolina; vpliv vojaške dejavnosti: vojaški poligon Poček; referenčni lokaciji: Zgornja Savinjska dolina, Kočevsko) (Al Sayegh Petkovšek in sod., 2002; Pokorny in Al Sayegh Petkovšek, 2005; Al Sayegh Petkovšek, 2008). Raziskava je pripeljala do naslednjih ugotovitev: (a) trosnjaki gliv (gobe) imajo izjemno sposobnost kopičenja kovin; (b) vsebnosti As in Cd so v večini vrst višjih gliv iz Šaleške doline in Zgornje Mežiške doline med največjimi izmerjenimi v Evropi, nasprotno padejo vsebnosti Pb in Hg v Šaleški dolini (ter Hg in As v Zgornji Mežiški dolini) za večino vrst v rang vsebnosti, ki so značilne za neonesnežena območja; (c) zaradi velikih vsebnosti kovin je potrebna pazljivost pri prehranjevanju z določenimi vrstami gliv; (d) ugotovili smo, da so izbrane vrste gliv odlični kazalniki onesnaženih tal s Cd (orjaški dežnik), As (jesenski goban, vijoličasta bledivka) in Hg (jesenski goban); (e) v plodovih divjega jagodičja (gozdne jagode, maline, robide, borovnice in brusnice) smo v primerjavi z glivami izmerili bistveno nižje vsebnosti Pb in Cd, kljub temu pa zakonsko dovoljene vsebnosti Cd prekoračuje pomembno število vzorcev nekaterih vrst jagodičja; (f) vsebnost Cd v užitnih plodovih vseh v raziskavo vključenih lesnih vrst (glog, črn trn, mokovec, jrebika, brin) so nizke, vsebnosti Pb pa so v plodovih iz Zgornje Mežiške doline tako velike, da smo priporočili, da se v tem območju iz prehrane ljudi izločijo plodovi šipka, mokovca, gloga in brina (ibid.).

Raziskava je opozorila na to, da se v nekaterih območjih kopičijo kovine v gozdnih sadežih v vsebnostih, **ki prekoračujejo celo zakonsko dovoljene vsebnosti (MDK)** (Ur. l. RS, št. 69/03). Zaradi slednjega je smiselno spremljati vsebnosti kovin v izbranih gozdnih sadežih tudi drugje v Sloveniji, še zlasti v okoljih za katere domnevamo, da so močno onesnažena s kovinami (npr. Celjska kotlina, Jesenice itd.), oziroma se na njihovem območju izvaja intenzivna nabiralniška aktivnost (npr. Pokljuka, Pohorje, Smrekovško pogorje). Poleg določitve kovin v gozdnih sadežih je možno sočasno določiti tudi vsebnosti radionuklidov v izbranih območjih (npr. okolica Krškega).

Predstavljene ugotovitve so **odlično izhodišče** za oblikovanja predloga vsedržavnega biomonitoringa izpostavljenosti gozdnih sadežev oz. gozdnih ekosistemov kovinam. Hkrati predstavljajo pridobljeni rezultati **bazo podatkov** za nekatera območja v Sloveniji (predvsem za Zgornjo Mežiško in Šaleško dolino).

II. Nameni in cilji predlaganega okoljskega biomonitoringa

Gozdni sadeži predstavljajo pomemben sestavni del ekosistemov v gozdni krajini, ki v Sloveniji pokriva več kot 60 % površin, kjer lahko – zaradi njihove sezonske pogostnosti, užitnosti in velikega akumulacijskega potenciala v primeru gliv – pomembno vplivajo na **kopičenje in prenos onesnažil** (v tem primeru kovin) vzdolž prehranjevalne verige do človeka. Ugotovljeno je bilo, da prehranjevanje z gobami predstavlja vir vnosa kovin v telo srnjadi (Pokorny in sod., 2004; Al Sayegh Petkovšek in Pokorny, 2007). Poudariti velja tudi, da v pozno poletnem in jesenskem obdobju gobe predstavljajo v nekaterih območjih Slovenije pomemben prehranski vir za lokalno prebivalstvo in so hkrati tudi iskan prehranski artikel v trgovinah in na tržnicah. Poleg gob so s toksikološkega vidika pomembni tudi ostali gozdni sadeži: jagodičje (borovnice, brusnice, gozdne jagode in robide) in užitni plodovi drevesnih vrst (npr. šipek, enovratni glog, mokovec, črni trn, dren, navadni brin). Plodovi naštetih vrst so pogosto zastopani v prehrani prebivalstva zaradi svojih zdravih učinkov oz. visokih vsebnosti različnih vitaminov (črn trn, glog, šipek, brinje, bezeg), zelo okusnih plodov oz. izdelkov iz njih (marmelade in džemi – npr. rumeni dren, šipek, mokovec) ter možnosti uporabe v žganjekuhi (brinje). Nekateri izmed naštetih plodov se intenzivno uporabljajo tudi v industrijski proizvodnji raznih čajev; tako vsebujejo »planinski« in »gorski« čaji po 18 % plodov črnega trna in 34 % plodov šipka; slednji so vključeni tudi v »trpotčev čaj« (10 % šipkovih plodov) in predstavljajo najpomembnejšo sestavino »šipkovega čaja« (80 %).

Izbrane vrste gob, jagodičja in užitnih plodov so pokazatelji onesnaženosti gozdnih ekosistemov. Še zlasti gobe imajo določene prednosti v primerjavi z drugimi bioindikatori in sicer: (a) so hiperakumulatorji, izmerjene velike vsebnosti kovin poenostavljajo kemijske analize ter omogočajo primerjave med različno obremenjenimi območji; (b) enostavnost vzorčenja in splošna razširjenost bioindikatorskih vrst gliv (npr. jesenski goban, orjaški dežnik, kostanjasti goban, vijoličasta bledivka); (c) biomonitoring je lahko osnova za izdelavo ocene tveganja za višje člene prehranjevalne verige (toksikološki vidik); predlagani vrsti gliv jesenski goban in orjaški dežnik sta kulinarično najbolj cenjeni vrsti gob.

V predlaganem okoljskem biomonitoringu želimo doseči naslednje **cilje**:

- določiti vsebnosti najbolj problematičnih kovin (Cd, Pb, Hg, As) v izbranih vrstah gob, divjega jagodičja in v užitnih plodovih grmovnih ter drevesnih vrst na območju Slovenije in tako pridobiti podatke o obremenjenosti gozdnih in travniških ekosistemov s kovinami;
- narediti prostorsko primerjavo v obremenjenosti gozdnih sadežev s kovinami med različnimi regijami Slovenije in znotraj posameznih regij;
- ugotoviti trende onesnaženosti s kovinami oziroma v posameznih okoljih spremljati učinkovitost ukrepov za zmanjšanje onesnaženosti okolja;
- oceniti vnos kovin v prehranjevalno verigo.

III. Metode dela

a) Območje biomonitoringa

Biomonitoring bomo izvajali v predlaganih regijah. V vsaki regiji bomo načeloma izbrali degradirano okolje, območje, kjer se čutijo zmerni antropogeni vplivi in referenčno območje, kjer praviloma ni vplivov človeške dejavnosti. Gozdne sadeže bomo vzorčili v odvisnosti od njihovega pojavljanja, in sicer: od junija do oktobra gobe, od junija do avgusta jagodičje in od septembra do novembra užitne plodove lesnih vrst (glej Prilogo 1). Predlagamo naslednje vrste gozdnih sadežev: jesenski goban, orjaški dežnik, gozdne jagode, borovnice (brusnice), navadni šipek in brin. Omenjene vrste so zanimive tako z bioindikativnega (so pokazatelji onesnaženosti) kot antropogenega (toksikološkega) vidika (vir prehrane za živali in ljudi).

b) Vzorčenje, priprava vzorcev, kemijske analize

Gozdne sadeže bomo vzorčili na izbranih lokacijah naključno (usklajeno z ostalimi sklopi okoljskega biomonitoringa) v odvisnosti od pojavljanja vrst. Sušili jih bomo v sušilniku pri 28 °C do konstantne teže. Posušeni material bomo homogenizirali in ga razklopili s popolnim kislinskim sežigom v mikrovalovni napravi. Vsebnosti kovin bomo nato določili z metodo induktivno sklopljene plazme z masno-spektrometrično detekcijo (ICP-MS). Pri obdelavi rezultatov bomo uporabili primerne statistične metode.

c) Finančna konstrukcija

V finančnem vrednotenju predlaganega okoljskega biomonitoringa predstavljamo stroške analiz in dela za **območje obravnave** (glej Preglednico 1), ki vključuje tri različno obremenjena območja: ohranjena narava (A), narava z zmernimi antropogenimi vplivi (B) in degradirano okolje (C). Pripravili smo dve oceni stroškov, in sicer obsežnejšo (I.), kjer smo obravnavali vsako regijo kot območje obravnave in manj obsežno, kjer bomo na območju vseh predlaganih regij v posameznem letu izbrali tri območja, ki so različno obremenjena s kovinami. **Pomembno je, da je območje obravnave usklajeno z ostalimi sklopi okoljskega biomonitoringa** in zato je realna (optimalna) ocenitev stroškov možna šele po sprejeti geografski razdelitvi izvajanja okoljskega biomonitoringa. Za gobe predlagamo analizo spektra kovin (Pb, Cd, As, Hg, itd.), za jagodičje in plodove pa analizo Pb ter Cd.

Preglednica 1: Pregled stroškov analiz in dela.

AKTIVNOST	območje obravnave (A, B in C območje)	
	število meritev* / število ur	SKUPNA VREDNOST (EUR)
Analize gob (jesenski goban + orjaški dežnik)	18 (Pb, Cd, As, Hg, itd.)	2.574,00
Analize jagodičja (gozdne jagode + borovnice)	18 (Pb, Cd)	1.580,40
Analize užitnih plodov (navadni šipek)	18 (Pb, Cd)	1.580,40
SKUPAJ ANALIZE		5.734,80
Terensko delo	48 x 2	2.472,96
Obdelava podatkov, izdelava poročila, reference**	120	3.805,20
SKUPAJ STROŠKI DELA		6.278,16
SKUPAJ (brez DDV)		12.012,96

Opombe: *V posamezen vzorec gob bomo združili trosnjake iste vrste, ki med seboj niso oddaljeni več kot nekaj 10 m (največkrat 3 ali 4 gobe). Podobno velja za jagodičje oz. plodove – v posamezen vzorec bomo združili plodove večjega števila gmičkov oz. grmov in dreves, ki rastejo v bližini. ** V prvem letu izvajanja okoljskega biomonitoringa bomo 80 % raziskovalnih ur, ki jih prikazujemo v tej aktivnosti, porabili za pregled obstoječega stanja na področju akumulacijske bioindikacije kovin z uporabo gozdnih sadežev.

IV. Viri

Adriano D.C. 2001. Trace elements in the terrestrial environment. New York, Springer Verlag: 533 str.

Al Sayegh Petkovšek, S., Pokorny B., 2006. Glive kot odzivni in akumulacijski bioindikatorji onesnaženosti gozdnih rastišč v Šaleški dolini. Zb. Gozd. Les, 81: 61-71.

Al Sayegh Petkovšek S., Pokorny B. 2007. Fungi in the nutrient of roe deer and some other wild-living ruminants: evidence from faeces. V: Abstracts of 8th Roe Deer Meeting, Velenje, Slovenia, June 25 – 26, 2007: 58.

Al Sayegh Petkovšek S., Pokorny B., Ribarič Lasnik C., Vrtačnik J. 2002. Vsebnost Cd, Pb, Hg in As v trosnjakih gliv iz gozdnate krajine Šaleške doline. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 67: 5-46.

Al Sayegh Petkovšek, S., 2008. Glive kot odzivni in akumulacijski bioindikatorji onesnaženosti gozdnih rastišč. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 251 str.

ATSDR 2005. CERCLA list of priority hazardous substances. Agency for toxic substances and disease registry, www.atsdr.cdc.gov/99list (31.3.2008).

Byrne A.R., Dermelj M., Vakselj T. 1979. Silver accumulation by fungi. Chemosphere, 10,: 815-821.

Byrne A.R., Ravnik V., Kosta L. 1976. Trace element concentration in higher fungi. Science of the total environment, 6: 65-78.

Byrne A.R., Šlejkovec Z., Stijve T., Fay L., Gösser W., Gailer J., Irgolič K.J. 1995. Arsenobetain and other arsenic species in mushrooms. Applied organometallic chemistry, 9: 305-313.

Byrne A.R., Šlejkovec Z., Stijve T., Gösser W., Gailer J., Irgolič K.J. 1997. Identification of arsenic compounds in mushrooms, and evidence for mycelia methylation. Australasian Mycological Newsletter (Canberra) 16, 3: 49-54.

Byrne A.R., Tušek-Žnidarič M. 1983. Arsenic accumulation in the mushroom *Laccaria amethystina*. Chemosphere, 12: 1113-1117.

Pokorny B. 2003. Notranji organi in rogovje srnjadi (*Capreolus capreolus* L.) kot bioindikatorji onesnaženosti okolja z ioni težkih kovin: doktorska disertacija. (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire). Ljubljana, samozal.: 193 str.

Pokorny B., Al Sayegh Petkovšek S., 2005. Vsebnost težkih kovin v gozdnih sadežih iz Šaleške doline, Zasavja, Zgornje Mežiške doline in Zgornje Savinjske doline: zaključno poročilo: DP 8/02/05. Velenje, ERICo Velenje: 103 str.

Pokorny B., Al Sayegh Petkovšek S., Ribarič Lasnik C., Vrtačnik J., Doganoc D. Z., Adamič M., 2004. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. Science of the total environment, 324: 223-234.

Pravilnik o onesnaževalcih v živilih. Ur. I. RS, št. 69/2003.

Slekovec, M., 1995. Determination of total arsenic and arsenic compounds in mushrooms. Dissertation, Graz, Karl-Franzens Universität, 130 s.

StatSoft 2006. Statistica for Windows 7.1. Tulsa, StatSoft: CD.

Stegnar P., Kosta L., Byrne A.R., Ravnik V. 1973. The accumulation of mercury and the occurrence of methyl mercury in some fungi. Chemosphere, 2: 57-63.

Šlejkovec Z., Byrne A.R., Stijve T., Gösser W., Gailer J., Irgolič, K.J. 1997. Arsenic compounds in higher fungi. Applied organometallic chemistry, 11: 673-682

6. Drevesne branike kot bioindikator onesnaženosti okolja s kovinami (dr. Helena Poličnik, ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave d.o.o.)

SPLOŠNO

Ena največjih prednosti bioindikacije je možnost opravljanja retrospektivnih analiz (Peterle in Sawicka-Kapusta, 1991; Pokorny, 2003); zaradi pomanjkanja podatkov iz preteklosti je namreč zgolj s sedanjimi (novimi) meritvami emisij, imisij in vsebnosti onesnažil v različnih (a)biotskih medijih nemogoče zanesljivo ugotoviti pretekle trende onesnaženosti okolja. Njihovo poznavanje je nujno za spremljanje in vrednotenje uspešnosti različnih sanacijskih ukrepov (npr. uvedba neosvinčenega bencina, izgradnja čistilnih naprav na točkovnih virih emisij). Raziskovalci v zadnjem času veliko pozornost namenjajo metodam, ki omogočajo natančno določitev vira onesnaženja (uporaba razmerij stabilnih izotopov Pb; npr. Åberg s sod., 1999; Meharg s sod., 2002; Flament s sod., 2002, Oh s sod. 2004), in izboru ustreznih vrst vzorcev za retrospektivno rekonstrukcijo onesnaženosti okolja s težkimi kovinami skozi čas. Za slednje se najpogosteje uporabljajo: (i) med sabo ločene in relativno natančno datirane plasti v jezerskih sedimentih (npr. Bindler s sod., 2000; Farmer s sod., 2000; Lamborg s sod., 2000; Vreča s sod., 2001; Jeran s sod., 2002; Renberg s sod., 2002) ter v šotiščih (npr. Lamborg s sod., 2000; Shotyk, 2002; Weiss s sod., 2002; Martinez-Cortizas s sod., 2002); (ii) lupine školjk (npr. Outridge s sod., 2000); (iii) človeško zobovje (npr. Tvinnereim s sod., 1997; Åberg s sod., 1998); (iv) rogovje različnih vrst iz družine jelenov (npr. Tataruch, 1995; Medvedev, 1995; Chyla s sod., 1996; Kierdorf in Kierdorf, 1999, 2000a, 2000b, 2001a, 2001b, 2002a, 2002b; Pokorny s sod., 2004); (v) branike dreves (Berg in Steinnes, 1993; Watmough in Hutchinson, 2002; Bellis s sod., 2002b; Padilla in Anderson, 2002; Klaminder s sod., 2005; Cheng s sod., 2007) in v njih vključeni žepi lubja (Satake s sod., 1996; Bellis s sod., 2002a, 2002b; Åberg s sod., 2004).

Pri uporabi prvih štirih zgoraj naštetih vrst vzorcev za zgodovinski biomonitoring obstajajo nekateri zelo pomembni zadržki: (a) disperzija in translokacija težkih kovin (npr. vertikalno spiranje kovin v sedimentih oz. šotiščih) lahko bistveno vplivata na rezultate; (b) zelo težavno zbiranje vzorcev, ki so praviloma dostopni le na posameznih in relativno neonesnaženih lokacijah (jezerski sedimenti, šotišča, školjke); (c) nezanesljivo datiranje večine vrst vzorcev; (d) v primeru rogovja omejenost relevantnih analiz le na tista onesnažila, ki se kopičijo v kosteh (t.i. *bone-seeking pollutants*: svinec, stroncij in fluoridi). Čeprav lahko nekatere izmed naštetih omejitev veljajo tudi za branike in vraslo skorjo (npr. možnost lateralne translokacije kovin med branikami, pojavljanje žepov lubja v deblu navzven ni vidno, tudi v primeru drevesnih branik datiranje vzorcev ni vedno zanesljivo; Satake s sod., 1996), so dosedanje raziskave pokazale, da so **letni prirastni kolobarji lesa (branike) zelo uporaben pripomoček za retrospektivno določanje trendov v spreminjanju onesnaženosti okolja s kovinami, vključno z določitvijo najpomembnejših virov emisij v določenem časovnem obdobju** (npr. Satake s sod., 1996; Watmough in Hutchinson, 2002; Padilla in Anderson, 2002; Åberg s sod., 2004).

Metoda kemijske analize lesa oziroma določanja vsebnosti kovin in drugih elementov v branikah dreves (t.i. *dendrokemijske analize*) temelji na predpostavki, da vsebnosti določenega elementa v braniki odražajo dostopnost tega elementa v okolju, v katerem je drevo raslo (Jonsson s sod., 1997). Nekatero drevesno vrsto so za tovrstne analize mnogo bolj primerne od drugih (Watmough in Hutchinson, 2003a). Rezultati analize lesa so namreč odvisni od strukture lesa, narave elementov, ki jih želimo določiti, in od poti privzema teh elementov v les (Jonsson s sod., 1997). Tako je določitev vsebnosti hranil v lesu hrasta neprimerna za študije onesnaženosti okolja, saj so vsebnosti le-teh lahko različne zaradi fiziološkega stresa, ki ni povezan z onesnaženostjo (Bukata s sod., 2007). Na vsebnosti elementov, ki jih ne štejemo k hranilom (t.j. elementov v sledovih), pa fiziološki stres skoraj nima vpliva, vendar so lahko njihove vsebnosti v lesu bolj kot od onesnaženosti odvisne od značilnosti tal (npr. pH, matična kamnina, tip tal) (*ibid.*). Zaradi pričakovanih razlik v

akumulaciji težkih kovin v različnih vrstah dreves so pričakovane tudi razlike v njihovih absolutnih vsebnostih. Za oceno relativne primernosti posameznih drevesnih vrst za biomonitoring kovin je zato potrebno določiti odvisnost vsebnosti kovin v branikah od poznanih emisij v določenem časovnem obdobju in ne le opraviti preproste primerjave vsebnosti kovin v letnih prirastnih kolobarjih lesa (Watmough in Hutchinson, 2003a). Ob izboru ustrezne drevesne vrste je retrospektivna analiza lesa primerno orodje za določanje časovnih trendov v onesnaženosti okolja (Fisher s sod., 2002).

Za retrospektivno rekonstrukcijo trendov v onesnaženosti okolja s kovinami smo v Sloveniji v preteklih petih letih že uporabili les (branike) osmih drevesnih vrst z različnim tipom lesa (venčasto porozni listavci: graden (*Quercus petraea*), pravi kostanj (*Castanea sativa*); difuzno porozni listavci: trepetlika (*Populus tremula*), navadna breza (*Betula pendula*), navadna bukev (*Fagus sylvatica*); iglavci: evropski macesen (*Larix decidua*), navadna smreka (*Picea abies*), rdeči bor (*Pinus sylvestris*)). Na podlagi ugotovljenih soodvisnosti med vsebnostmi kovin v posamezni drevesni braniki v lesu dreves iz Šaleške doline z dobro poznanimi podatki letnih emisij anorganskih onesnažil za obdobje 1980 – 2005 v okolici Termoelektrarne Šoštanj smo izbrali najprimernejše drevesne vrste za retrospektivne raziskave (Poličnik s sod., 2006, 2007, 2008, 2009; Pokorny s sod., 2006). Ugotovili smo močne soodvisnosti med letnimi emisijami SO₂ oziroma prahu iz TEŠ in vsebnostmi Cd v branikah vseh iglavcev in tudi difuzno poroznih vrstah listavcev, kar nakazuje, da so te vrste primerne za sledenje onesnaženosti okolja s Cd celo na letni ravni. Za rdeči bor smo poleg tega ugotovili še visoko značilne soodvisnosti tudi za Pb. Poleg rdečega bora je za zgodovinski biomonitoring onesnaženosti okolja s kovinami primeren še predvsem les trepetlike.

Zaradi vsesplošne razširjenosti drevja in enostavne dosegljivosti vzorcev lahko drevesne branike uporabimo za vseslovensko in biološko relevantno (upoštevana tudi biodostopnost kovin) opredelitev zgodovinskih trendov onesnaženosti okolja. Zgodovinski biomonitoring z branikami omogoča zanesljivo ugotavljanje sprememb v onesnaženosti okolja in posledično oceno uspešnosti različnih sanacijskih ukrepov, izvedenih na velikih virih emisij.

PROGRAM MONITORINGA

Namen predlaganega segmenta okoljskega monitoringa kemikalij je ugotavljanje zgodovinskih trendov onesnaženosti okolja s kovinami (Pb, Cd, Zn, Cr, Ni, Mn, Co in V) v vseh 12 statističnih regijah Slovenije, in sicer z uporabo letnih prirastnih kolobarjev lesa (branik) rdečega bora (*Pinus sylvestris*) in trepetlike (*Populus tremula*) kot bioindikatorjev z dvema podciljema:

1. Retrospektivna določitev onesnaženosti okolja s kovinami v vseh 12 statističnih regijah Slovenije, in sicer v pentadah vsaj za sto let nazaj (z uporabo lesa rdečega bora), na letnem nivoju pa za obdobje zadnjih petindvajset let (z uporabo lesa trepetlike).
2. Primerjava trendov v onesnaženosti okolja in trenutne obremenjenosti ekosistemov s kovinami med različnimi območji v Sloveniji.

Način izvedbe monitoringa (retrospektivnih analiz)

Retrospektivni monitoring se izvaja na podlagi analiz spektra kovin petletnih prirastkov rdečega bora za vsaj 100 let nazaj in na podlagi analiz spektra kovin v enoletnih prirastkih trepetlike za 25 let nazaj. V vsaki statistični regiji Slovenije se v vzorec vključijo po 2 drevesi vsake vrste (2 rdeča bora in 2 trepetliki), skupaj torej 4 drevesa v vsaki regiji.

Lokacije izvajanja retrospektivnih analiz

Program monitoringa z drevesnimi branikami predvideva vzorčenje in analize lesa dreves v vseh 12 statističnih regijah v Sloveniji (natančne lokacije bodo prilagojene ostalim aktivnostim monitoringa kemikalij v kopenskih/gozdnih ekosistemih).

Terminski plan

Na štirih območjih oz. regijah so retrospektivne raziskave onesnaženosti okolja s kovinami z uporabo branik rdečega bora in trepetlike že bile opravljene v sklopu aplikativnega raziskovalnega projekta »Drevesne branike kot retrospektivni bioindikator časovnih sprememb v onesnaženosti okolja« (L1-7135-1007), za ostale regije pa bi bilo zaželeno vzorčenje in analize opraviti v sklopu okoljskega biomonitoringa kemikalij v obdobju treh let (2010 – 2012). V vsakem letu je tako smiselno v raziskavo dodatno vključiti po tri regije:

2010: Dolenjska (Kočevsko kot neonesnaženo, referenčno območje) – analize že opravljene

Osrednjeslovenska regija

Gorenjska regija

Podravska regija

2011: Savinjska regija – analize delno že opravljene (Šaleška dolina)

Koroška regija – analize delno že opravljene (Zgornja Mežiška dolina)

Pomurska regija

Goriška regija

2012: Zasavska regija – analize že opravljene (Zasavje)

Spodnjeposavska regija

Notranjsko-kraška regija

Obalno-kraška regija

FINANČNA KONSTRUKCIJA

Za uresničitev predlaganega programa je v vsaki regiji potrebno za zgodovinsko rekonstrukcijo vzorčiti po 2 drevesi rdečega bora, in sicer petletne vzorce za vsaj 100 let nazaj (v povprečju 25 vzorcev na posamezno drevo) in po 2 trepetliki (enoletne vzorce) za 25 let nazaj (25 vzorcev na posamezno drevo). Skupaj se tako v vsaki regiji vzorči po 4 drevesa, vsako po 25 vzorcev, oziroma skupaj po 100 vzorcev branik na posamezno regijo. Vsako leto se praviloma v raziskavo vključijo 3 regije (za četrto podatki že obstajajo), torej skupaj 12 dreves oziroma 300 vzorcev. V vseh treh letih bo v raziskavo na novo vključenih 36 dreves s po 25 vzorci; skupaj bo opravljenih 900 analiz spektra kovin.

Okvirna finančna konstrukcija za izvedbo predlaganega zgodovinskega monitoringa je podana v spodnji preglednici.

	število enot/leto	cena/enoto	cena skupaj/leto	cena skupaj za 3 leta
terensko delo – vzorčenje	80 ur	34,12 €	2.729,60 €	8.188,80 €
priprava vzorcev	60 ur	23,88 €	1.432,80 €	4.298,40 €
kemijske analize	300 vzorcev	100,00 €	30.000,00 €	90.000,00 €
obdelava podatkov	80 ur	34,12 €	2.729,60 €	8.188,80 €
izdelava poročil, objave, sinteza dosedanjih študij	200 ur	34,12 €	6.824,00 €	20.472,00 €
SKUPAJ BREZ DDV			43.716,00 €	131.148,00 €

OPOMBA: V ceno ni vključen DD

7. Mahovi in lišaji kot bioindikatorji depozicije kovin, radionuklidov in nekaterih organskih onesnažil zraka (dr. Zvonka Jeran, Institut Jožef Stefan)

Uvod

Zaradi industrijske dejavnosti, kmetijstva, prometa, individualnih kurišč in drugih antropogenih virov je zrak vse bolj onesnažen, strupene snovi iz ozračja pa neposredno spreminjajo (motijo) življenjske procese v kopenskih in vodnih ekosistemih ter vplivajo tudi na zdravje ljudi. Nevarnosti, ki jih prinaša onesnažen zrak je prisililo mednarodno skupnost k iskanju metod in načinov za določanje kritičnih obremenitev in vplivov, ki jih imajo specifični onesnaževalci na okolje s skupnim ciljem, da se onesnaževanje zmanjša. Med onesnaževalci, ki jih je po mednarodnih konvencijah oziroma protokolih potrebno slediti pa sodijo tudi težke kovine (Cd, Hg, Pb) in obstojne organske snovi. Za pridobitev kvalitetnih imisijskih podatkov o posameznih onesnaževalcih (npr. kovin, radionuklidov, ...) moramo vzorčenje izvesti na večjem številu vzorčevalnih mest z uporabo ustrezne vzorčevalne in merilne opreme, ki je pogosto omejena na določanje le posameznih specifičnih onesnaževalcev in zahteva tudi določeno infrastrukturno opremljenost vzorčevalnega mesta in varstvo. Tak način vzorčenja je drag in ga zato izvajajo le na manjšem številu vzorčevalnih mest. Kot pomožna ali dopolnilna metoda za spremljanje depozicije kovin in radionuklidov ter v zadnjem času tudi policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) se v Evropi in tudi drugod po svetu vse bolj uveljavlja biomonitoring z uporabo epifitskih lišajev in/ali talnih mahov. Ti dve skupini rastlinskih organizmov, ki sicer nista v sorodstveni zvezi namreč zadostujeta osnovnim zahtevam, ki so pogoj, da nek organizem lahko uporabljamo kot aktivni ali pasivni akumulatorski biomonitor/bioindikator **onesnaženosti zraka**: sta splošno razširjeni v okolju, morfologija se ne spreminja z letnimi časi, dostopni za vzorčenje vse leto, vzorčenje je enostavno, imata veliko akumulacijsko sposobnost, ki ni odvisna od letnega časa, imata dolgo življenjsko dobo, zaradi specifične zgradbe (brez kutikule, koreninskega sistema, velike površine) sprejemata tako nutiente kot tudi toksične substance v glavnem v obliki mokrega ali suhega useda iz zraka, naravne koncentracije elementov v njihovih steljkah so izredno nizke, cena vzorčenja in analize je nizka v primerjavi z drugimi fizikalnimi metodami.

Oba biomonitorska organizma se v svetu splošno uporabljata za monitoring onesnaženosti zraka tako v okolici znanih emisijskih virov kot tudi za ugotavljanje onesnaženosti zraka na velikih področjih oz. nivoju cele države. (Herzig s sod., 1998; Reis s sod., 1996, Sloof s sod., 1991; Wolterbeek s sod., 2001). V Evropi pa v okviru ICP-Vegetation⁴, ki je eden izmed delovnih področij delovne skupine za učinke onesnaženega zraka (WGE⁵) zaradi daljinskega transporta onesnaženega zraka (UNECE CLRTAP⁶) in v koordinaciji Centra za ekologijo in hidrologijo (Centre for Ecology and Hydrology -CEH) iz Bangor-ja Velika Britanija, poteka vse evropski projekt: **“Depozicija težkih kovin z analizo mahov”** (Heavy Metals in European mosses:2000/2001 survey, 2003, Spatial and temporal trends in heavy metal accumulation in mosses in Europe (1990-2005), 2008). V omenjeni projekt je vključenih več kot 30 evropskih držav s skupno približno 7000 vzorčevalnih mest, vzorčenja in analize mahov pa se izvajajo na vsakih 5 let. S tovrstnim pristopom se je ustvarila obsežna podatkovna baza o depoziciji kovin v Evropi, ki omogoča tako indentifikacijo najbolj onesnaženih področij kot tudi spremljanje časovnih trendov.

V Sloveniji je biomonitoring z uporabo lišajev in mahov že vpeljan in se izvaja tako v okolici nekaterih znanih emisijskih virov (Rudnik Žirovski vrh, Rudnik Hg v Idriji, mesto Ljubljana,

⁴ The International Cooperative Programme on Effects of Air Pollution on Natural Vegetation and Crops

⁵ Working Group on Effects

⁶ Convention on Long-range Transboundary Air Pollution

TEŠ, okolica Mežice) kot tudi na območju celotne Slovenije (Jeran s sod., 1995, 1996, 2002, 2003, Horvat s sod., 2000; Pavšič-Mikuž, P., 2005) Odsek za znanosti o okolju pa je že trikrat (1995, 2000, 2006) aktivno sodeloval v zgoraj omenjenem vseevropskem projektu z uporabo mahov in pridobil pomembne podatke o depoziciji kovin na ozemlju Slovenije, ki so podlaga za ugotavljanje časovnih trendov, poleg tega pa služijo tudi kot osnova za določitev tistih področjih, kjer bi bile zaradi povišanih vsebnosti kovin potrebne bolj intenzivne raziskave na gostejši mreži vzorčevalnih mest (Jeran s sod., 1998, 2007). Rezultati omenjenega monitoringa se nanašajo na neurbanizirana področja, saj vzorci niso bili nabrani v okolici večjih urbanih in industrijskih središč.

Namen in cilj predlaganega okoljskega biomonitoringa z lišaji oz. mahovi

Namen predlaganega okoljskega biomonitoringa z uporabo lišajev in mahov so naslednji:

- pregled obremenjenosti Slovenije s kovinami po različnih regijah z analizo rezultatov dosedanjih raziskav, ki so bile opravljene tako na IJS kot tudi nekaterih drugih institucijah v Sloveniji (BF, Erico).
- Opraviti novo vzorčevanje in analizo mahov na področju celotne Slovenije. V okviru projekta ICP-Vegetation: **“Depozicija težkih kovin z analizo mahov”** je za leto 2010 predvideno novo vseevropsko vzorčevanje in analiza mahov.
- Opraviti bolj podrobno študijo obremenjenosti s kovinami in po potrebi tudi nekaterih organskih spojin (PAH) znotraj posameznih regij

Metode dela

a) Območje biomonitoringa

Biomonitoring z mahovi (lišaji) bomo izvajali na 16 x 16 km mreži (~ 60 lokacij), ki vključuje v glavnem lokacije, ki so izven urbanih področij. Po potrebi bomo vključili še nekatere lokacije v neposredini bližini urbanih in večjih industrijskih središč v regijah (5-6 dodatnih lokacij v posamezni regiji; skupaj ~ 40 dodatnih lokacij).

b) Vzorčevanje, priprava vzorcev in analiza

Vzorčevanje in analiza bo potekala v skladu z uveljavljeno metodologijo (Jeran s sod., 2007). V izbranih vrstah mahov bomo po totalnem mokrem razkroju vzorcev določili vsebnost As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, V in Zn z uporabo ICP-MS metodo. V vzorcih bomo izmerili tudi policiklične aromatske ogljikovodike (PAH).

Finančno ovrednotenje

Aktivnost	Število meritev /ur	Skupna vrednost
Terensko delo	350 ur	10.591,00
Priprava vzorcev	400 ur	9.078,00
Kemijska analiza- multielementna analiza	100 vzorcev	10.500,00
Kemijska analiza, PAH	100 vzorcev	24.600,00
Obdelava rezultatov, priprava poročila	450 ur	23.134,50
Skupaj stroški dela (brez DDV)		77.903,50

Reference

Heavy Metals in European mosses:2000/2001 survey, UNECE ICP-Vegetation, compiled by A. Buse, D. Norris, H. Harmens, P. Büker, T.Ashenden, G. Mills, March 2003, CEH.

Herzig, R., Liebendorfer, L., Urech, M., Ammann, K., Buecheva, M. and Landolt, W. Passive biomonitoring with lichens as a part of an integrated biological measuring system for monitoring air pollution in Switzerland, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 1989, 35, 43-57.

Horvat, Milena, Jeran, Zvonka, Špirić, Zdravko, Jaćimović, Radojko, Miklavčič, Vesna. Mercury and other elements in lichens near the INA Naftaplin gas treatment plant, Molve, Croatia. *J. environ. monit. (Print)*, 2000, vol. 2, str. 139-144.

Jeran, Zvonka, Byrne, Anthony Robert, Batič, Franc. Transplanted epiphytic lichens as biomonitors of air-contamination by natural radionuclides around the Žirovski vrh uranium mine, Slovenia. *Lichenologist (Lond.)*, 1995, vol. 27, str. 375-385.

Jeran, Zvonka, Jaćimović, Radojko, Batič, Franc, Smodiš, Borut, Wolterbeek, H.T. Atmospheric heavy metal pollution in Slovenia derived from results for epiphytic lichens. *Fresenius' j. anal. chem.*, 1996, vol. 354, str. 681-687.

Jeran, Z. Jaćimović, R. and Ščančar, J. (1998) Atmospheric heavy metal deposition in Slovenia (results for mosses) IJS-DP 7846.

Jeran, Zvonka, Jaćimović, Radojko, Batič, Franc, Mavsar, Robert. Lichens as integrating air pollution monitors. *Environ. pollut. (1987)*. [Print ed.], 2002, vol. 120, str. 107-113.

Jeran, Zvonka, Jaćimović, Radojko, Pavšič-Mikuž, Petra. Lichens and mosses as biomonitors : [presented at XIIth International Conference on Heavy Metals in the Environment, 26-30 May, 2003, Grenoble, France]. *J. phys., IV (Les Ulis)*, 2003, vol. 170, str. 675-678.

Jeran, Zvonka, Smrke, Janja, Mrak, Tanja, Šlejkovec, Zdenka, Mazej, Darja, Ogrinc, Nives. *Strokovne podlage za ugotavljanje depozicije kovin in dušika v Sloveniji v letu 2006/2007 na podlagi Konvencije o prekomernem onesnaževanju zraka na velike razdalje : poročilo o izvedbi projekta*, (IJS delovno poročilo, 9741). Ljubljana: Institut Jožef Stefan, 2007. 29 str.

Pavšič-Mikuž, P., 2005. Kovine in mikroelementi v mahovih in epifitskih lišajih na območju Slovenije, magistrsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.

Reis, M.A., Alves, L.C., Wolterbeek, H.Th., Verburg, T., Freitas M.C. and Gouveia A.: Main atmospheric heavy metal sources in Portugal by biomonitor analysis, *Nuclear Instruments and methods in Physics Research B* 1996 109/110, 493-497.

Sloof, J.E. and Wolterbeek, H. Th.: National trace element air pollution monitoring survey using epiphytic lichens, *Lichenologist* 1991, 23 (2), 139-165.

Spatial and temporal trends in heavy metal accumulation in mosses in Europe (1990-2005), H. Harmens, D. Norris and the participants of the moss survey, CEH, July 2008.

Wolterbeek B.: Biomonitoring of trace elements air pollution: principles, possibilities and perspectives, *Environmental Pollution* 120 (2002) 11-21,

8. Predlog programa za okoljski biomonitoring v kopenskih ekosistemih z mikroorganizmi (Mandič-Mulec Ines, David Stopar, Janez Hacin Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za Mikrobiologijo)

Uvod

Mikrobi igrajo ključno vlogo pri kroženju biogenih elementov in s tem vplivajo na ravnotežje plinov v atmosferi ter ravnotežje hranil v talnih in vodnih ekosistemih. Tla delujejo kot okoljski filter katerega učinkovitost je odvisna od mikrobne aktivnosti v povezavi s fizikalno kemijskimi dejavniki okolja. Mikrobna populacija se odziva na stresne dejavnike kot so kemična onesnažila s spremembami v številčnosti, encimski aktivnosti in sestavi mikrobne združbe, zato so mikroorganizmi odlični indikatorji zdravja tal ter posledic za atmosfero (emisije toplogrednih plinov) in vode (eutrofikacija).

Mikrobna aktivnost, ki je rezultat številčnosti in sestave mikrobne združbe lahko služi kot pokazatelj a) biodostopnosti anorganskih in organskih onesnažil ter b) biorazgradljivosti organskih onesnažil.

Mikrobna biomasa v tleh imobilizira anorganska in organska onesnažila obenem pa je tudi vir hranil za rastline in vir hrane za talno fauno in tako posredno ali neposredno regulira prehod onesnažil v višje organizme.

Formalni in operativni okviri za bioimonitoring tal z mikroorganizmi v EU

Formalne okvire za mikrobni biomonitoring tal v posameznih državah predstavljajo nacionalni programi monitoringa tal (npr. Nizozemska, Nemčija, Velika Britanija) ali Internacionalni program Integriranega Monitoringa (ICP-IM - v Italiji, Avstriji, Baltskih republikah, Rusiji, Švedski). Formalni okvir za vrednotenje tal v Evropi sta dokument Evropske komisije (CEC Discussion paper COM 2002-179) in dokument Evropske agencije za okolje (Huber et al 2001, EEA technical report 61).

Tako nacionalni kot mednarodni programi monitoringa tal vključujejo osnovne (MDS-Minimum Data Set) in specifične mikrobiološke parametre, kot indikatorje zdravja talnega ekosistema (Winding et al. 2005), . V večini evropskih držav sodijo med osnovne indikatorje :

- talna mikrobna biomasa - merjena z metodo substratno inducirane respiracije (SIR) ali z metodo fumigacije in ekstrakcije
- potencialna mineralizacija ogljika – merjena kot bazalna respiracija, dihanje v aerobnih okoljih in metanogeneza v anaerobnih okoljih
- potencialna mineralizacija dušika merjena kot amonifikacija, potencialna nitrifikacija (NEA) in denitrifikacija (DEA)

V nekaterih državah (Nizozemska, Nemčija) med osnovne mikrobne indikatorje vključujejo tudi eno od metod profoliranja talne mikrobne združbe (DGGE, PLFA).

Bolj specifični mikrobiološki indikatorji ki se nanašajo na sestavo in metabolne značilnosti talne mikrobne združbe, pa pokažejo potencial za mikrobno razgradnjo ali imobilizacijo specifičnih onesnažil v mikrobno biomaso. Metode zajemajo:

- merjenje specifične encimske aktivnosti oziroma odziv posameznih vrst bakterij – biosenzorjev v onesnaženih okoljih,
- merjenje splošnih metabolnih značilnosti talne mikrobne združbe – Biolog,

- analiza genetskih značilnosti talne mikrobne združbe – TRFLP, 16S rDNA, ter fenotipskih značilnosti z analizo - m RNA,
- uporabo talnih mikrokozmov za test specifične encimske aktivnosti in potenciala talne mikrobne biomase za razgradnjo in imobilizacijo specifičnih onesnažil.

Formalni in operativni okviri za bioimonitoring tal z mikroorganizmi v Sloveniji

Naše raziskave (Kraigher in sod., 2006, Stres in sod., 2008, Jerman in sod., 2009, Likar in sod., 2009). mikrobne aktivnosti (respiracija, metanogeneza, nitrifikacija, denitrifikacija) v talnih ekosistemih Ljubljanskega Barja so pokazale, da se značilne razlike v mikrobni aktivnosti med talnimi ekosistemi ohranjajo, kljub precejšnji sezonski variabilnosti. Simultane raziskave sestave talnih mikrobnih združb (bakterije, arheje, posamezne funkcionalne skupine) so prav tako pokazale značilne razlike v sestavi združbe med ekosistemi ne pa sezonske variabilnosti v roku 1 leta. Proučevani talni sistemi visokega in nizkega barja se značilno razlikujejo po fizikalnih in kemijskih parametrih, ki so kot kaže odločilni za aktivnost in sestavo mikrobne združbe.

Raziskav o dolgoročnem vplivu organskih in anorganskih onesnažil na fizikalno kemijske in posledično na mikrobiološke lastnosti tal pri nas doslej še ni bilo in odgovore lahko da le večletni monitoring. V Sloveniji sistematičnega biomonitoringa tal z mikroorganizmi ni.

V okviru projekta »Raziskave Onesnaženosti Tal Slovenije« - **ROTS** v obdobju 1989-2007« nastaja baza podatkov za izbrane lokacije v mreži vzorčnih ploskev 1x1 km znotraj osnovne preliminarne mreže 8x8 km (Zupan in sod. 2004, 2005, 2006, 2007). Za posamezne vzorčne točke v mreži vzorčnih ploskev so podani pedološki parametri tal (tekstura, pH, org. snov, razmerje C/N) ter vsebnosti anorganskih nevarnih snovi (10 kovin, fluoridi), in 7 organskih nevarnih snovi (PAH, PCB, CHC insekticidi, Atrazin) glede na Uredbo o mejnih oopozorilnih in kritičnih imisijskih vrednosti nevarnih snovi v tleh (Ur.l. RS 68/96).

Projekt ROTS je del vzpostavitve sistema monitoringa kakovosti tal v RS in talnega informacijskega sistema kot ga opredelujeta Zakon o varstvu okolja (Ur.l. RS 41/04). in Resolucija NPVO za obdobje 2005-2012 (Ur.l. RS 2/06). Vzorčne ploskve projekta ROTS in drugih že potekajočih projektov biomonitoringa (zbornik delavnice OBM 10. april 2009) so torej idealne za mikrobni biomonitoring tal. V okviru terminskega in regionalnega načrta okoljskega biomonitoringa kemikalij (UKMZ) bi v posameznih regijah izbrali vzorčne točke ROTS s podobnimi pedološkimi lastnostmi in razlikami glede na osnovne ter mejne, opozorilne in kritične vrednosti anorganskih in organskih nevarnih snovi opredeljenih v Uredbi.

Globina vzorčenja je za mikrobni biomonitoring enaka kot v projektu ROTS (0-5-20 cm) prostorski in časovni načrt vzorčenja pa je potrebno ustrezno prilagoditi saj se večina mikrobioloških parametrov tal določa na svežih vzorcih. Zato bi morali vzorčenje in merjenje mikrobne aktivnosti opraviti hkrati na vzorcih z osnovnimi in povišanimi vrednostmi nevarnih snovi. Uporabili bi pristop po korakih (Rombke et al. 2002, cit. po Winding et al 2005). V prvem koraku bi določili mikrobno biomaso (ISO 1997b,c), mikrobno respiracijo (ISO 2002 a,b) in mineralizacijo N (ISO 1997a). V nadaljnjih korakih pa bi analizirali bolj specifične funkcionalne mikrobne parametre (npr. oksidacija amonija (ISO 2001), dehidrogenazna aktivnost DIN 1988), fiziološki profil (Biolog) in strukturo mikrobne združbe (PLFA, DGGE, T-RFLP). Učinek nekaterih onesnaževal se namreč ne kaže v funkcionalnih mikrobioloških parametrih ampak v strukturi mikrobne združbe (Hund-Rinke et al. 2004, cit po Winding et al 2005).

Tehnična oprema in kadrovska usposobljenost naše raziskovalne skupine za potrebe mikrobne biomonitoringa tal ustreza Pravilniku o pogojih glede strokovno-tehnične usposobljenosti izvajalcev biomonitoringa (Ur.l. RS 12/09).

Okvirna vrednost progama bio monitoringa tal z mikroorganizmi v SLO

Po shemi, ki bi zajemala vzorce štirih stopenj onesnaženja tal (osnovne, mejne, opozorilne in kritične vrednosti) z 18 onesnažili (10 kovin, fluoridi, 7 organskih onesnažil), povzetimi iz podatkovne baze projekta ROTS, znaša ocena stroškov vzorčenja in analiz osnovnih mikrobioloških indikatorjev (meritve mikrobne biomase, mineralizacije C in N): 64.770 EUR/leto.

Reference

KRAIGHER, Barbara, STRES, Blaž, HACIN, Janez, AUSEC, Luka, MAHNE, Ivan, ELSAS, Jan D., MANDIĆ-MULEC, Ines. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil biol. biochem.* 2006, vol. 38, str. 2762-2771.

STRES, Blaž, DANEVČIČ, Tjaša, PAL, Levin, MRKONJIĆ FUKA, Mirna, RESMAN, Lara, LESKOVEC, Simona, HACIN, Janez, STOPAR, David, MAHNE, Ivan, MANDIĆ-MULEC, Ines. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS microbiol. ecol.*, 2008, issue 1, vol. 66, str. 110-122.

JERMAN, Vesna, METJE, Martina, MANDIĆ-MULEC, Ines, FRENZEL, Peter. Wetland restoration and methanogenesis : the activity of microbial populations and competition for substrates at different temperatures. *Biogeosci. discuss. (Online)*. [Online ed.], 2009, vol. 6, str. 1-30.

LIKAR, Matevž, REGVAR, Marjana, MANDIĆ-MULEC, Ines, STRES, Blaž, BOTHE, Hermann. Diversity and seasonal variations of mycorrhiza and rhizosphere bacteria in three common plant species at the Slovenian Ljubljana Marsh. *Biol. fertil. soils (Print)*, 2009, 11 str., [in press].

WINDING A, HUND-RINKE K., RUTGERS M. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2005, vol 62, Issue 2, str 230-248.

HUBER S, SYED B, FREUDENSCHUSS A., ERNSTSEN V, LOVELAND P. 2001. Proposal for a European soil monitoring and assessment framework. Technical report 61 EEA, Copenhagen

EC 2002. Towards a thematic strategy for soil protection. Discussion paper COM 2002-179. CEC, Brussels

9. Sistem za monitoring okolja s čebelami - SiMOČ¹ (Janko Božič, Univerza v Ljubljani, . Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo)

Uvod

Medonosna čebela je pomemben člen v okolju. Bistveno prispeva k ustrezni opravitvi žužkocvetnih rastlin tako samoniklih kot gojenih rastlin. Človek z gojenjem čebel bistveno prispeva k ustreznemu pridelku mnogih kulturnih rastlin, poleg tega pa je gojitev čebel v zadnjih desetletjih ob prihodu tujih čebeljih boleznih tudi nujno za ustrezno opraševanje samoniklih rastlin. Na čebelarjenje pomembno vplivajo dogajanja v naravi, bodisi zaradi človekovega delovanja ali naravnih sprememb. Tako je lahko celotna čebelja družina pomemben bioindikator onesnaženja ali drugih sprememb v naravi. Dodatno lahko s sledenjem dogajanja znotraj čebelje družine uporabimo še bolj specifične bioindikatorje (vedenjske spremembe posameznih čebel). V praktični rabi pa lahko ob zaznavi nenavadnih dogodkov ločeno zberemo vzorce prinešenega cvetnega prahu, medicine ali čebel samih. Tovrstno aktivno zbiranje vzorcev je bistvena nadgradnja od klasičnega intervalnega zbiranja vzorcev čebeljih pridelkov iz čebeljih panjev. Predlagam postopno vključevanje čebel v monitoring okolja od pasivnega do postopnega naprednejšega aktivnega vzorčenja. Za osnovo je lahko že obstoječa opazovalna in prognostična služba v kombinaciji s pasivnim vzorčenjem na čebelarstvih z znanih lokacij.

Pasivni monitoring

Osnova tega je lahko načrtno hranjenje vzorcev čebeljih pridelkov, ki so načrtno zbrani skozi celotno sezono v naprej določenih kvadrantih. Vzorčenje medu bi moralo potekati od vseh točenj v sezoni, z eventualnim dodatnim odvzemom medenih satov. V določenih fenoloških fazah pa bi bilo potrebno zbrati vzorce cvetnega prahu, propolisa in voska. Tako zbrani vzorci bi predstavljali pomembno osnovo tako za raziskave prisotnosti onesnažil, kot tudi iskanje sestavin v čebeljih pridelkih za specifično uporabo v prehrani oziroma zdravstvenem varstvu.

- a. Pridobitev vzorcev čebeljih pridelkov
- b. Skladiščenje vzorcev in evidentiranje osnovnih podatkov o vzorcih
- c. Izvajanje posameznih analiz

Finančno sta najzahtevnejša druga in tretja faza. Problem so ustrezni prostori in oprema za skladiščenje (zamrzovalniki, omare). Glede na možnost se da omejiti obseg vzorčenja, a vsekakor bi bilo nujno vključiti vsa fitogeografska območja Slovenije (5X). Smiselno je predvideti vsaj dve lokaciji v neobremenjenem okolju z neposrednimi onesnažili in po dve lokaciji obremenjeni z onesnažili (kmetijstvo, urbana okolje in industrija). Čebelji pridelki bi morali biti zbrani vsaj na šestih gospodarskih panjih na eni lokaciji stalnega čebelarstva (brez selitve) in čez celo sezono. Predlagam zbiranje osnovnih čebeljih pridelkov, med kumulativno, ostale pridelke pa ob določenih fenofazah medonosnih rastlin (n.p. regrat, robinija, pravi kostanj, zlata rozga):

- med - po 3kg od vsakega točenja,
- vosek (satje iz gradilnikov, nezaleženi) - 3X po 200g,
- propolis – 4X po 100g
- cvetni prah – 4X po 1kg

Poleg osnovnih fizikalno kemijskih analiz, predlagam tudi analize na vrstno sestavo cvetnega prahu v medu in vzorcih osmukanega cvetnega prahu (sledenj sprememb v biodiverziteti,

¹ SiMOČ nastaja v okviru istoimenskega CRP projekta kot nabor metod in njihov preizkus, za samo izvajanje in analize zbranih vzorcev pa je potrebno zagotoviti sistemska sredstva.

kontrola porekla). Med in cvetni prah sta primerna za sledenje različnih onesnažil, tako vodotopnih kot lipofilnih. Slednje je možno slediti tudi v vosku in propolisu, sam propolis pa je lahko dober pokazatelj onesnaženja zraka (zbirka drevesnih smol). Vsi pridelki so tudi pomembni v prehrani, telesni in zdravstveni negi ljudi, zato je pomembno poleg sledenja onesnažil, zbirati tudi podatki o biološki aktivnosti (antimikrobnost, antioksidativnost,...). Analitika na ostanke organskih onesnažil (n.p. pesticidi, biocidi) je zaradi narave substrata zahtevna, poleg tega pa mora omogočati detekcijo pod 1ppb.

Okvirna vrednost analiz lahko tako zneso tudi 500€ po vzorcu. Pavšalni izračun stroškov pokaže, da je relativno poceni pridobiti vzorce, saj bi za predviden obseg zadoščala sredstva okoli 5000 €. Za uspešno zbiranje vzorcev osmukanega cvetnega prahu bi bilo potrebno zagotoviti manjše zamrzovalnike na samem mestu zbiranja (čebelarju), v kolikor ne bi imeli možnosti začasnega hranjenja v zamrzovalniku, ter večji laboratorijski zamrzovalnik (-70°C) za hranjenje vzorcev cvetnega prahu v večjem obsegu do dveh let za zagotovitev analiz, v manjšem pa tudi za daljši čas. Za ugotavljanje porekla, se lahko skladišči tudi suh cvetni prah ali v alkoholu. Mogoče se bi bilo izogniti globokemu zmrzovanju v primeru dvojnega shranjevanja cvetnega prahu tako posušenega kot razpuščenega v medu iz iste lokacije ob hkratnem hranjenju vzorca uporabljenega medu. V tem primeru je potrebno zagotoviti ustrezne skladiščne prostore in primerno informacijsko podporo. Pasivni monitoring s čebelami je smiselno združiti z drugimi oblikami pasivnega monitoringa in zbiranja vzorcev.

Aktivni monitoring

Za izhodišče aktivne monitoringa lahko prevzamemo delujočo opazovalno prognozično službo gozdnega medenja. Sistem opazovalnih panjev na elektronskih tehnicah je lahko izhodišče aktivnemu spremljanju morebitnih nenadnih izpustov onesnažil v okolje. Z dodatno elektronsko opremo, ki bi vključevala spremljanje akustičnih signalov in vsaj še pašne aktivnosti z avtomatskim spremljanjem čebel na žrelu je mogoče vzpostaviti učinkovit sistem, ki bi omogočil vzorčenje čebele ali čebeljih pridelkov v primeru stresne situacije v čebelji družini, ki bi jo bilo mogoče povezati z morebitnimi onesnažili v panju. Tudi zajem vzorcev bi bilo mogoče avtomatizirati. Osnove takemu sistemu razvijamo v okviru CRP projekta Sistem za monitoring okolja s čebelami – SiMOČ.

Pričakujemo, da bomo imeli konec leta 2010 pripravljene vse osnove vsaj za navedeno obliko aktivnega monitoringa in bo mogoče začeti vzpostavljanje mreže aktivnih opazovalnih postaj s čebeljimi družinami. Vzoredno pripravljamo tudi osnove za še dodatne oblike aktivnega monitoringa s pomočjo opazovalnega panja in koriščenjem informacij iz plesnega sporazumevanja. Na ta način je pa mogoče aktivno zbiranje vzorcev iz znanih lokacij iz okolice čebeljega panja, tudi v obsegu do 2000 m. Takšen način je lahko zanimiv za vzorčenje področij v primeru premalo utemeljenega suma sproščanja onesnažil ali pa za spremljanje razporeditve na znanem onesnaženem območju. Avtomatizacija tovrstnega vzorčenja pa zahteva dodaten razvoj. Tudi sam čebelji ples je lahko bioindikator pojava strupenih snovi. Pašna čebela je lahko ob nabiranju subletalnih doz strupov prizadeta do te mere, da prekine z osmičenjem v panju in začne izvajati potresavi ples. Ob hujših zastrupitvah pa se seveda čebele sploh ne vrnejo v panj.

Posebna oblika aktivnega monitoringa pa je tudi kontrola območja na znana onesnažila s pomočjo dresiranih čebel na specifične vonjave. Tak način se že uporablja za iskanje ostankov eksplozivnih sredstev in tudi mamil.

Povzetek

S čebelami je mogoče takoj bistveno dopolniti monitoring okolja, predvsem zaradi širokega pokrivanja področja iz enega samega čebelnjaka. V začetni fazi je koristno združiti različne oblike monitoringa na istih vzorčnih površinah, da se ugotovi dejanske korelacije med merjenimi parametri z različnimi oblikami monitoringa. Pasivni monitoring je mogoče

vzpostaviti takoj, seveda pa je potrebno zagotoviti vsaj sredstva za vzorčenje, skladiščenje in osnovne fizikalno kemijske analize zbranih vzorcev. Smiselno je predvideti vzpostavitev aktivnega monitoringa, zlasti v kombinaciji z že obstoječo opazovalno prognostično službo gozdnega medenja.

Reference

BOŽIČ, Janko, ABRAMSON, Charles I. Living with animals: pesticide effects on honeybees. V: BEKOFF, Marc (ur.). Encyclopedia of human-animal relationships : a global exploration of our connections with animals. 1. natis. Westport: Greenwood press, 2007, str. 1153-1154.

Bromenshenk, J.J., C.B. Henderson, and G.C. Smith. 2003. Biological Systems (Paper II), Appendix S. In: Alternatives for Landmine Detection, J. MacDonald et. al., eds. RAND Science and Technology Institute for Office of Science and Technology Policy, Arlington, VA.

Celli, G., Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. Bulletin of Insectology, 56, 137-139.

PODRIŽNIK, Blaž. Vzorčenje in določitev izvora obnožine zibajočih plesalk medonosne čebele : diplomsko delo. Ljubljana: [B. Podrižnik], 2007.

ŠEŠERKO, Melita. Raziskave in monitoring s čebelami na vplivnem območju Termoelektrarne Šoštanj: poročilo za leto 2007 . - Velenje : ERICo, 2008

DeVillers, J. & Pham-Delegue, M.H. (2002) (Eds.) Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals, London: Taylor and Francis.

10. Okoljski monitoring s kemijskimi in biološkimi testi biološke dostopnosti onesnažil v tleh za segment tla - rastline - talni organizmi (Marko Zupan, Helena Grčman, Domen Leštan, Metka Udovič, Damjana Drobne, Andreja Hodnik - Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta Oddelk za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja)

1. Izhodišča

Onesnaženost tal z organskimi in anorganskimi onesnažili antropogenega izvora je problem svetovne razsežnosti in predstavlja nesprejemljivo grožnjo za okolje in organizme. Zato je potrebno onesnaženje ustrezno ovrednotiti in obravnavati. Tveganje, ki ga onesnaženo področje predstavlja za okolje in organizme, ocenimo na podlagi ustreznih analitskih metod, s katerimi ovrednotimo stopnjo onesnaženja tal na tem področju. Ocenjevanje onesnaženosti tal v Sloveniji kot tudi drugod (Dean, 2007) temelji na celokupni koncentraciji onesnažil v tleh (Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh, 1996), vendar se pri preučevanju onesnaženosti tal daje čedalje več pomena tudi določanju speciacije in dostopnosti posameznih vrst onesnažil (Mulligan in sod., 2001; Kumpiene in sod., 2007). Posamezne oblike onesnažil se namreč lahko razlikujejo po njihovi mobilnosti, biološki dostopnosti in vplivu na ekološke sisteme ter na organizme same (Miró in Hansen, 2006; Lock in Janssen, 2003). Celokupne koncentracije onesnažil namreč ne smemo enačiti z njihovo dostopnostjo za organizme (biološko dostopnostjo). Biološko dostopna koncentracija se namreč nanaša na tisti delež oz. frakcijo celokupne koncentracije onesnažila, ki jo organizem lahko privzame, oz. ki ima vpliv na biološki material (Geebelen in sod., 2003).

Fizikalne, kemijske in biološke lastnosti onesnažil najpomembneje vplivajo na usodo in vpliv onesnažil na okolje (Walker, 2009). Določamo jih na več načinov, npr. z uporabo selektivnih ekstraktij, kjer v več zaporednih stopnjah izpostavljamo tla vedno močnejšim reagentom (ekstraktantom). Na ta način ekstrahiramo iz tal tisti delež onesnažil, ki je vezan v določeni obliki ter ima določen vpliv na okolje in organizme. Znano je, da niso vse oblike dostopne organizmom; slednje zato ne ogrožajo neposredno okolja in organizmov (Ure, 1991, 1996). Pri ocenjevanju onesnaženosti okolja je zato potrebno uporabljati ustrezen nabor selektivnih ekstrakcijskih testov, ki temeljijo na lastnostih tal in obravnavanega onesnažila. Takih testov je veliko in niso med seboj poenoteni, kar povzroča zmedo pri izbiranju primernih za določanje biološke dostopnosti onesnažil v tleh.

Med najpogosteje uporabljenimi selektivnimi kemijskimi testi so testi za določanje dostopnosti onesnažil za rastline (fitodosegljivost onesnažil). Rastline namreč preko koreninskega sistema črpajo npr. kovinske ione iz talne raztopine. Mehanizmi akumulacije obsegajo izvencelično in znotrajcelično vezavo kovin na naravne ligande, translokacijo kovinsko-ligandnih kompleksov preko vaskularnega sistema in kopičenje kovin v različnih delih rastline (Raskin in sod., 1994). Na podlagi koncentracije akumuliranih onesnažil v rastlinskih tkivih takih vrst lahko sklepamo o onesnaženosti tal in izpostavljenosti lokalnega prebivalstva onesnažilom kot posledica vključevanja na onesnaženih področjih vzgojene zelenjave in sadja v prehrano. Določene vrste kozmopolitskih rastlin, ki uspevajo tudi na onesnaženih tleh, npr. ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.) (Hudnik in sod., 1994), se uporabljajo kot bioindikatorske vrste. Kemijske selektivne ekstraksije tistega deleža onesnažil iz tal, ki je dostopen rastlinam (fitodosegljiv) predstavljajo nadgradnjo in poenostavitev analiz vsebnosti onesnažil v rastlinskih delih. Obstaja več vrst takih ekstraktij, med katerimi je potrebno izbrati najustreznejšo glede na lastnosti tal in onesnažil v tleh ter glede na namembnost preučevanega področja (Lindsay in Norwell, 1978; Novozamsky in sod., 1993).

Dosedanje ocene izpostavljenosti kovinam na podlagi celokupnih koncentracij se ravno zaradi prej omenjenega dejstva, da niso vse oblike kovin enako dostopne organizmom, dopolnjujejo z *in vivo* in *in vitro* testi biološke dostopnosti. *In vivo* raziskave na živalih (npr. budrah) so dolgotrajne in drage, zato se pozornost posveča predvsem razvoju *in vitro* testov, ki bi ustrezno simulirali rezultate *in vivo* testov (ISO/TS 17924:2007). Fiziološko osnovani ekstrakcijski testi (»Physiologically Based Extraction Tests«, PBET) temeljijo na simulaciji človeškega gastrointestinalnega (GI) trakta z uporabo umetnih bioloških raztopin kot selektivnih ekstrakcijskih raztopin (Ruby in sod., 1992, 1993, 1996; Hack in Selenka, 1996; Swindell in Reid, 2006; Turner in Ip, 2007; Trimble in sod., 2008). Po zaužitju tal se med prebavo onesnažil delno ali v celoti sprostito iz talne matrice v prebavno kašo (himus). Ta delež onesnažil, ki ji pravimo biodostopni delež (»bioaccessible fraction«), predstavlja maksimalno koncentracijo onesnažil, ki se lahko absorbira v črevesju, t.j. transportira preko črevesnega epitela v limfo in v krvni obtok. Del teh onesnažil se lahko metabolizira v celicah črevesnega epitela ali v jetrih in se nato izloči iz telesa, del onesnažil pa nemetaboliziran preide preko jeter v sistemski obtok (biodosegljivi delež, »bioavailable fraction«) (Daugherty in Mrsny, 1999; Oomen in sod., 2002; Oomen in sod., 2003). Fiziološko osnovani *in vitro* ekstrakcijski testi omogočajo določanje biološke dostopnosti onesnažil, saj ne simulirajo celotnega procesa privzema onesnažil v organizem (Ruby in sod., 1996). Zato v splošnem raje kot o biodosegljivosti onesnažil govorimo o njihovi biodostopnosti.

Do tu smo kot orodje za določanje biološke dostopnosti onesnažil v tleh in s tem potencialne nevarnosti, ki jo taka tla predstavljajo, omenjali le kemijske selektivne ekstrakcijske teste. Njihova pomanjkljivost je, da ne zajemajo dinamične in kompleksne narave interakcij med kovino, tlemi in organizmom (Basta in Gradwohl, 2000). Zato je za natančnejše ugotavljanje dejanske biološke dosegljivosti kovin in njihovega potencialnega trofičnega prenosa potrebno uporabljati biološke oz. tako imenovane „*in vivo*“ teste (Kamnev in van der Lelie, 2000). V primeru „*in vivo*“ akumulacije onesnažil v organizmih lahko določimo dejansko biodosegljivost onesnažil v tleh, saj so onesnažila, ki so se nakopičila v telesih poskusnih organizmov, prešle v organe in tkiva kot biodosegljivi delež onesnažil (Ruby in sod., 1996). Med nevretenčarji se pri raziskavah akumulacije najpogosteje uporabljajo mehkužci, deževniki, raki, žuželke in pajkovci (Hopkin, 1998). Terestrični enakonožni raki (Crustacea, Isopoda) in deževniki (Oligochaeta) so sposobni akumulirati tako kovine (Hopkin, 1998; Witzel, 1998; Calhõa in sod., 2006; Loureiro in sod., 2006; Vijver in sod., 2006) kot tudi organska onesnažila (van Hattun in sod., 1998; Johnson in sod., 2002; Hallgren in sod., 2006) sorazmerno z njihovo koncentracijo (Hopkin in sod., 1993; Heikens in sod., 2001; Sun in Li, 2005) in se jih zato lahko uporablja kot bioindikatorje onesnaženosti tal (Gál in sod., 2008).

Akumulacija organskih onesnažil v izopodih ni verodostojen parameter obremenjenosti okolja z organskimi onesnažili, pač pa nas zanimajo učinki teh onesnažil. Za ta namen se uporablja niz biomarkerjev na različnih nivojih biološke organizacije. Med zelo uveljavljene biomarkerje onesnaženosti okolja sodi destabilizacija lizosomalne membrane (Nolde et al. 2006). Pri izopodih pa je mogoče študirati tudi mnoge druge biomarkerje citotoksičnosti in histopatološke pokazatelje. Kombinacija odzivov pri istem organizmu pa nam omogoča kakovostno in verodostojno oceniti stanje v določenem okolju.

2. Opredelitev vsebine okoljskega monitoringa s kemijskimi in biološkimi testi biološke dostopnosti onesnažil v tleh

2.1 Predvidene aktivnosti

2.1.1 Izbor ciljnih območij

Območja vzorčenja bodo izbrana po statističnih regijah (Jugovzhodna Slovenija, Osrednjeslovenska regija, Gorenjska regija, Podravska regija, Savinjska regija, Koroška regija, Pomurska regija, Goriška regija, Zasavska regija, Spodnjeposavska regija, Notranjsko-kraška regija, Obalno-kraška regija), glede na prioritete cilje projekta Biomonitoring in razpoložljiva finančna sredstva. V vsaki regiji bomo izbrali po tri območja, pri čemer bodo glavni kriteriji enotna travniška raba, vrsta tal in oddaljenost od vira onesnaženja. Izbor vzorčnega mesta in vzorčenje bo potekalo v skladu z metodologijo ROTS (Raziskave onesnaženosti tal Slovenije; Zupan in sod., 2008): vzorčno mesto bo zajelo površino elipsoidne oblike z radijem 50 m, pripravljene bodo izkopi na šestih obodnih mestih, združeni vzorec bo sestavljen iz 30 pod vzorcev, pri čemer bomo vzorčili ločeno v treh globinah 0-5 cm, 5-10 cm in 10-20 cm. Izbrane rastline bomo vzorčili iz celotne izbrane površine in sicer kot celotni nadzemni del: steblo, liste in morebitne cvetove.

2.1.2 Analiza tal

V talnih vzorcih bomo določali osnovne kazalce kakovosti tal (pH, vsebnost organske snovi, teksturo, kationsko izmenjalno kapaciteto in vsebnost karbonatov), celokupno vsebnost onesnažil v tleh, po postopku, ki je predpisan v zakonodaji (Ur. L. RS 68/96) ter biološko dosegljive oblike onesnažil (opisane v poglavju 2.1.3). Za vse analize bomo uporabili standardizirane (ISO) postopke oziroma postopke, ki jih predvideva tudi metodologija ROTS (Zupan in sod., 2008)

2.1.3 Izbor testov za določanje biološke dostopnosti onesnažil v tleh

Nabor kemijskih »*in vitro*« testov bo vključeval uveljavljene metode določanja biološke dostopnosti onesnažil v tleh, in sicer:

- ◇ Rastlinam dostopen delež onesnažil (fitodosegljivi delež) bomo določili s tremi metodami ekstrakcije, t.j. z ekstrakcijo z dietilen triamin pentaocetno kislino (DTPA) (Lindsay in Norvell, 1978), z ekstrakcijo z raztopino kalcijevega klorida (Novozamsky in sod., 1993) in z ekstrakcijo z etilen diamin tetraocetno kislino (EDTA). Rezultate posameznih ekstrakcijskih metod bomo primerjali med seboj in izbrali najustreznejšo za vsako posamezno vzorčno mesto.
- ◇ Človeku dostopen delež onesnažil bomo določili s fiziološko osnovanimi testi biološke dostopnosti onesnažil v tleh (Hack in Selenka, 1996; Oomen in sod., 2000; Turner in Ip, 2007). S temi testi simuliramo okolje človeškega prebavnega trakta, kjer se iz zaužite hrane (v napem primeru tal) izločijo onesnažila, ki se nato lahko absorbirajo v organe in tkiva.
- ◇ Biološko dostopne oblike organskih onesnažil bomo določili s selektivnimi kemijskimi ekstrakcijskimi testi, kot so ekstrakcija z butanolom in hidroksi propil β -ciklodekstrinom (Swindell in Reid, 2006) ter ekstrakcija s Tenax-om in SPME (Trimble in sod., 2008).

Nabor bioloških »*in vivo*« testov bo vključeval uveljavljene metode določanja biološke dosegljivosti na podlagi izbranih bioloških parametrov, in sicer:

- ◇ Akumulacija onesnažil v tkivih šestih indikatorskih rastlinskih vrst, med katerimi sta dve zeli, dve detelji in dve travi: ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.), regrat (*Taraxacum officinalis* L.), plazeča detelja (*Trifolium repens* L.), črna detelja (*Trifolium pratense* L.), pokončni stoklasec (*Bromopsis erecta* (Huds.), Fourr) ter trpežna ljujka (*Lolium perenne* L.).

Prvi dve indikatorski rastlini se uporabljata tudi za prehrano ljudi in v zdravilstvu, vse pa so pomembne krmne rastline. Na osnovi koncentracij v njihovih nadzemnih delih in poznanih deležev v travni ruši bomo lahko izračunali obremenjenost krme z onesnažili, kar je pomemben vidik prehoda onesnažil preko rastlin v živali in hrano živalskega izvora.

- Akumulacija onesnažil v dveh deževniških vrstah iz dveh različnih ekoloških skupin, in sicer v smrdljivem deževniku (*Eisenia foetida* Savigny) ter v njivskem deževniku (*Aporrectodea caliginosa* Savigny).
- Akumulacija onesnažil v izopodnih rakah vrste *Porcellio scaber* (Udovic in sod., 2009).
- Analiza stabilnosti lizosomalne membrane, analiza stabilnosti plazmaleme, peroksidacija lipidov in peroksidacija proteinov ter histološki in histopatološki parametri določeni na prebavnih žlezah. Vse merjene parametre bo,mo primerjali glede na stopnjo onesnaženosti. Izsledke o biološki dostopnosti onesnažil določene s kemijskimi oz. z biološkimi testi bomo primerjali med seboj z namenom, da določimo ozek, a najustreznejši in najbolj reprezentativen nabor testov za določanje biološke dostopnosti onesnažil v tleh kot merilo za oceno potencialne nevarnosti, ki jo taka onesnažena tla predstavljajo za okolje in organizme.

3. Finančna konstrukcija

Vrsta vzorca	Cena/leto
Izbor vzorčnih lokacij in vzorčenje tal (tri ploskve)	1200 €
Analiza tal	
<ul style="list-style-type: none"> • standardna pedološka analiza • kovine • organske potencialno nevarne snovi (PAHi, PCB, fenoli, mineralna olja) 	880€ 1600€ 4500€
Analiza rastlin (kovine):	7800€
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Plantago lanceolata</i> L. • <i>Taraxacum officinalis</i> L. • <i>Trifolium repens</i> L. • <i>Trifolium pratense</i> L. • <i>Bromopsis erecta</i> (Huds.), Fourr • <i>Lolium perenne</i> L. 	
Ekotoksikološki testi z organizmi:	7500 €
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Eisenia fetida</i> Savigny • <i>Aporrectodea caliginosa</i> Savigny • <i>Porcellio scaber</i> 	
Obdelava podatkov in izdelava poročila	2500 €
	25980

* Predračun stroškov izvedbe je preliminaren, ker obseg dela (število ploskev kot tudi izbrane metode) še niso dokončno določeni.

4. Uporabljena literatura

- Basta, N., Gradwohl, R., 2000. Estimation of Cd, Pb and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *Journal of Soil Contamination* 9, 149-164.
- Calh a, C.F., Soares, A.M.V.M., Mann, R.M., 2006. Cadmium assimilation in the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus* – Is trophic transfer important? *Science of the Total Environment* 371, 206-213.
- Daugherty, A.L., Mrsny, R.J., 1999. Transcellular uptake mechanisms of teh intestinal epithelial barrier. Part one. *Pharmaceutical Science and Technology Today* 4, 144-151.
- Dean, J.R., 2007. *Bioavailability, Bioaccessibility and Mobility of Environmental Contaminants*. 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, West Sussex.
- G al, J., Markiewicz-Patkowska, J., Hursthouse, A., Tatner, P., 2008. Metal uptake by woodlice in urban soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 139-149.
- Hack, A., Selenka, F., 1996. Mobilization of PAH and PCB from contaminated soil using a digestive tract model. *Toxicology Letters* 88, 199-210.

- Hallgren, P., Westbom, R., Nilsson, T., Sparring, S., Björklund, E., 2006. Measuring bioavailability of polychlorinated biphenyls in soil to earthworms using selective supercritical fluid extraction. *Chemosphere* 63, 1532-1538.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendriks, A.J., 2001. Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* 113, 385-393.
- Hopkin S.P. 1998. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London , Elsevier Applied Science Publishers Ltd: 366 str.
- Hopkin S.P., Jones D.T., Dietrich D. 1993. The isopod *Porcellio scaber* as a monitor of the bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: towards a global 'woodlouse watch' scheme. *The Science of the Total Environment* 134, 1: 357-365
- Hudnik V., Zupan M., Lobnik F., Kozak-Legiša Š. 1994. Bioavailability assessment of Cd, Zn and Pb in polluted soils with the indicator plant *Plantago lanceolata* L. *Environmental Geochemistry and Health* 16, 2: 39-51
- ISO/TS 17924. Soil quality – Assessment of human exposure from ingestion of soil and soil material – Guidance on the application and selection of physiologically based extraction methods for estimation of the human bioaccessibility/bioavailability of metals in soil. 2007:16 str.
- Johnson, D.L., Jones, K.C., Langdon, C.J., Pearce, T.G., Semple, K.T., 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1363-1370.
- Kamnev A.A., van der Lelie D. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* 20, 4: 239-258
- Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C. 2007. Stabilization of Pb-and Cu-contaminated soil using coal fly ash and peat. *Environmental Pollution* 145, 1: 365-373
- Lindsay W.L., Norvell W.A. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42, 3: 421-428
- Lock, K., Janssen, C.R., 2003. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environmental Pollution* 126, 371-374.
- Loureiro S., Sampaio A., Brandão A., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. 2006. Feeding behaviour of the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* Brandt, 1833 (Crustacea, Isopoda) in response to changes in food quality and contamination. *Science of the Total Environment* 369, 1-3: 119-128
- Miró, M., Hansen, E.H., 2006. Recent advances and perspectives in analytical methodologies for monitoring the bioavailability of trace metals in environmental solid substrates. *Microchimica Acta* 154, 3-13.
- Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F. 2001. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60, 1-4: 193-207
- Nolde N., Drobne D., Valant J., Padovan I., Horvat M. 2006. Lysosomal membrane stability in laboratory- and field-exposed terrestrial isopods *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 8: 2114-2122.
- Novozamsky, I., Lexmond, T.M., Houba, V.J.G., 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 51, 47-58.
- Oomen, A.G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, A., Cornelis, C., Schoeters, W., van der Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., van Wijnen, J.H., 2002. Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology* 36, 3326-3334.
- Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe, C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., Sips, A.J.A.M., 2003. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 281-287.
- Oomen, A.G., Sips, A.J.A.M., Sijm, D.T.H.M., Tolls, J., 2000. Mobilization of PCBs and Lindane from soil during in vitro digestion and their distribution among bile salt micelles

- and proteins of human digestive fluid and the soil. *Environmental Science and Technology* 34, 297-303.
- Raskin, I., Kumar, P.B.A., Dushenkov, S., Salt, D.E., 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5, 285-290.
- Ruby, M.V., Davis, A., Kempton, J.H., Drexler, J.W., Bergstrom, P.D., 1992. Lead bioavailability-dissolution kinetics under simulated gastric conditions. *Environmental Science and Technology* 26, 1242-1248.
- Ruby, M.V., Davis, A., Link, T.E., Schoof, R., Chaney, R.L., Freeman, G.B., Bergstrom, P., 1993. Development of and in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. *Environmental Science and Technology* 27, 2870-2877.
- Ruby, M.V., Davis, A., Schoof, R., Eberle, S., Sellstone, C.M., 1996. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environmental Science and Technology* 30, 422-430.
- Sun, H.W., Li, J.G., 2005. Availability of pyrene in unaged and aged soils to earthworm uptake, butanol extraction and SFE. *Water Air and Soil Pollution* 166, 353-365.
- Swindell, A.L., Reid, B.J., 2006. Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere* 62, 1126-1134.
- Trimble, T.A., You, J., Lydy, M.J., 2008. Bioavailability of PCBs from field-collected sediments: Application of Tenax extraction and matrix-SPME techniques. *Chemosphere* 71, 337-344.
- Turner, A., Ip, K.H., 2007. Bioaccessibility of metals in dust from the indoor environment: application of a physiological based extraction test. *Environmental Science and Technology* 41, 7851-7856.
- Udovic, M., Drobne, D., Lestan, D., 2009. Bioaccumulation in *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) as a measure of the EDTA remediation efficiency of metal-polluted soil. *Environ Poll* <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.023>, doi: 10.1016/j.envpol.2009.04.023.
- Ure, A.M., 1991. Trace-element speciation in soils, soil extracts and solutions. *Mikrochimica Acta* 2, 49-57.
- Ure, A.M., 1996. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *The Science of the Total Environment* 178, 3-10.
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih imisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. Ur.l. RS št. 68, 29. XI. 1996.
- van Hattun, B., Pons, M.J.C., Montaños, J.F.C., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater isopods and field-partitioning between abiotic phases. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 257-267.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Jager, T., van Straalen, N.M., Wolterbeek, H.T., van Gestel C.A.M., 2006. Kinetics of Zn and Cd accumulation in the isopod *Porcellio scaber* exposed to contaminated soil and/or food. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1554-1563.
- Walker, C.H., 2009. *Organic Pollutants. An Ecotoxicological Perspective*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Witzel, B., 1998. Uptake, storage and loss of cadmium and lead in the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Water Air and Soil Pollution* 108, 51-68.
- Zupan, M., Grčman, H., Lobnik, F. 2008 *Raziskave onesnaženosti tal Slovenije*. Ljubljana, Agencija R. Slovenije za okolje.63. str.

II. DEL: BIOMONITORING V VODNIH EKOSISTEMIH

Skupni predlog pripravili:

doc. dr. Tatjana Tišler, KI, koordinatorka za področje vodnih ekosistemov,

doc. dr. Metka Filipič, NIB,

dr. Anita Jemec, KI,

dr. Gorazd Kosi, NIB,

dr. Zdenka Mazej, ERICO,

doc. dr. Andreja Ramšak, NIB

Utemeljitev

Spremembe kvalitete vodnih ekosistemov, ki so posledica človekovih dejavnosti, omejujejo možnost uporabe vodnih virov ter škodljivo vplivajo na zdravje ljudi in na biološko raznolikost vodnih ekosistemov. Onesnaženje se tradicionalno »meri« z določanjem koncentracij kemikalij v posameznih segmentih vodnega okolja (sedimentu, vodi, tudi v tkivih organizmov). Tak pristop ne omogoča celostne ocene, kako onesnaženje v resnici vpliva na organizem in ali povzroči v njem kakšne poškodbe. Poleg tega monitoring, ki temelji na fizikalno-kemijskih parametrih, pogosto ne zajame vseh prisotnih onesnažil, ker ne vključuje detekcije vseh možnih onesnažil in ker so njihove koncentracije pogosto pod mejo detekcije kemijskih analitskih metod. Posebna skupina onesnažil so genotoksične spojine, za katere obstaja verjetnost, da zanje podatki o potencialni genotoksičnosti sploh niso znani. Na osnovi fizikalno-kemijskih analiz tudi ni mogoče predvideti toksikoloških lastnosti kompleksnih zmesi onesnažil v vodi, ker lahko pride med komponentami do sinergističnih, antagonističnih in potencirajočih interakcij. Ravno zaradi tega se vedno bolj uveljavlja biomonitoring in merjenje odziva na onesnažila z biomarkerji (t.j. odzivi v organizmih), tak pristop je vključen v spremljanje onesnaženja v številnih evropskih državah in v ZDA in Kanadi. Biomarkerji nam omogočajo spremljanje toksikokinetike onesnažila v telesu; t.j. kako se razgrajujejo, kakšni metaboliti nastanejo pri razgradnji (pogosto še bolj škodljivi kot izhodna spojina), kakšni so učinki delovanja onesnažila na izbrane procese v organizmu. Lahko pa se onesnažilo kopiči v telesu in se le počasi razgrajuje, kar ugotavljamo s študijami bioakumulacije v telesu.

Pravna podlaga za biomonitoring vodnega okolja

V Sloveniji je program biomonitoringa zakonsko opredeljen z Zakonom o kemikalijah, biomonitoring pa je vključen tudi v pomembna strateška dokumenta: Nacionalni program kemijske varnosti in Predlog resolucije o Nacionalnem planu zdravstvenega varstva 2008-2013. Monitoring voda določa tudi Vodna direktiva (Water Framework Directive 2000/60/EC), objavljena v Uradnem listu Evropskih skupnosti (UL L 327/1, 22.12.2000, 72 str.). Pravna podlaga za izvajanje biomonitoringa morja je Sredozemski akcijski načrt (UNEP - MAP) in je bil 1975 sprejet kot prvi regionalni program za morje v okviru Programa ZN za okolje (UNEP). Leto kasneje (1976) je bila sprejeta Konvencija o varstvu morskega okolja in obalnih območij Sredozemlja, (krajše Barcelonska konvencija), podpisalo pa jo je 22 pogodbenic vključno z Evropsko unijo kot celoto. Prav tako Stockholmska konvencija o obstojnih organskih onesnažilih, ki jo je Republika Slovenija ratificirala 2004, nalaga previdnost in ukrepe za preprečevanje učinkov, ki jih ta onesnažila povzročajo v biocenozah.

Trenutno stanje biomonitoringa vodnih ekosistemov v Sloveniji

Programi biomonitoringa so v svetu razširjeni tako v morju (North Sea Task Force Programm, biomonitoring v Sredozemskem morju) kot v rečnih vodah (Biomonitoring of

Environmental Status and Trends, ZDA). Trenutno v Sloveniji Agencija za okolje RS v skladu z Zakonom o varstvu okolja [1] in podzakonskimi akti izvaja imisijski monitoring kakovosti površinskih vod (*Monitoring kakovosti površinskih vodotokov v Sloveniji, Monitoring kakovosti voda za življenje sladkovodnih vrst rib*), jezer (*Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer*) in morja (*Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja morja, Program spremljanja kakovosti vode za življenje morskih školjk in morskih polžev*). Program monitoringa kakovosti površinskih vodotokov se pripravi v skladu z določili Uredbe o kemijskem stanju površinskih voda [2], Pravilnika o monitoringu kemijskega stanja površinskih voda [3] ter Operativnega programa zmanjševanja onesnaževanja površinskih voda s prednostnimi in drugimi nevarnimi snovmi [4], ki vključuje zahteve, predpisane v Odločbi Sveta 77/795/EGS [5]. V navedenih predpisih se kakovost voda ocenjuje na osnovi monitoringa kemijskih in ekoloških parametrov, pristop z uporabo biomarkerjev pa ni vključen v obstoječi monitoring površinskih voda. Biomonitoring morja se trenutno izvaja v okviru programa »Program spremljanja kakovosti morja in vnosov onesnaženja s kopnega v skladu z Barcelonsko konvencijo«. Vendar v okviru tega programa zajema biomonitoring zelo majhen del, saj vključuje uporabo klapavic *Mytilus galloprovincialis* le na treh postajah dvakrat letno in zajema samo dva biomarkerja (poškodbe DNA in indukcija metalotioneinov).

Namen predlaganega biomonitoringa

Namen biomonitoringa vodnih ekosistemov je nadgradnja obstoječega kemijskega in ekološkega monitoringa stanja voda, kar bo omogočilo celovitejši pregled dejanskega stanja obremenitve vodnega okolja in organizmov z onesnažili ter spremljanje trendov stanja v daljšem časovnem obdobju. Rezultati biomonitoringa bodo pripomogli k zagotavljanju trajnostnega upravljanja naravnih vodnih virov ter prispevali k izboljšanju kvalitete življenja za ljudi in živali. Predlagani program bo vključeval različne vodne ekosisteme in sicer tekoče in stoječe površinske vode ter morje.

Predlogi biomonitoringa za posamezne vodne ekosisteme

Tekoče površinske vode

Predlagamo nadgradnjo obstoječega Monitoringa kakovosti površinskih vodotokov v Sloveniji, ki ga izvaja ARSO. Izbrali smo dva pristopa k biomonitoringu: (1) odvzem vode v okviru odvzemov rednega kemijskega monitoringa ter izvedba nadaljnjih testov v laboratoriju, ter (2) analiza biomarkerjev v organizmih vzetih iz okolja tekom monitoringa ekološkega stanja okolja.

Kot modelni organizem smo izbrali sladkovodne rake vrste postranice *Gammarus sp.*, ki so v slovenskih vodah glede na podatke rednega monitoringa razširjeni. V primeru, da na izbranih mestih v času vzorčenja osebkov te vrste ne bodo prisotni, bomo analize izvedli na drugih primernih vrstah sladkovodnih rakov. Zaradi široke palete možnih onesnažil predlagamo širok nabor biomarkerjev, od sprememb na nivoju organizma do celičnih sprememb. Predlagani biomarkerji so encimski test aktivnosti holinesteraze (ChE), aktivnost glutation S-transferaze (GST) ter koncentracija metalotioneinov (MT). Delovanje holinesteraze je zelo specifično in povezano z delovanjem organofosfornih in karbamatnih insekticidov in do določene mere tudi s kovinami. Aktivnost ChE je v prisotnosti omenjenih spojin zmanjšana. Aktivnost GST je povezana z detoksifikacijo organskih spojin in je biomarker učinka določenih planarnih organskih spojin kot so policiklični aromatski ogljikovodiki, pogosto pa se njena aktivnost spremeni v prisotnosti pesticidov. Metalotioneini so proteini, katerih vsebnost se spremeni v prisotnosti kovin. Pridobljeni rezultati bodo imeli skupaj z obstoječimi podatki o vsebnosti onesnažil na izbranih mestih ter ekološkimi statusom veliko težo.

Poleg omenjenih biomarkerjev bomo določali tudi prisotnost genotoksičnih snovi, ki spadajo med najnevarnejše snovi za zdravje ljudi in za okolje. Stroka je soglasna, da je izpostavljenost genotoksičnim snovem tesno povezana z nastankom poškodb DNA, povečanjem pogostnosti mutacij in nastankom različnih vrst raka pri ljudeh. V kontekstu okolja genotoksične snovi lahko zmanjšajo reproduktivno sposobnost izpostavljenih populacij in s tem vplivajo na fiziološko stanje posameznih organizmov, ki ga opisujejo tudi kot "sindrom genotoksičnih bolezni". Prisotnost genotoksičnih onesnažil v vodah ima lahko dolgoročne negativne zdravstvene vplive tako na ljudi, kot na vodne ekosisteme. Metode, ki se uporabljajo za ocenjevanje genotoksičnosti okoljskih vzorcev so večinoma iste, kot jih predpisujeta OECD in EC navodila za testiranje genotoksičnosti kemikalij s tem, da so ustrezno prilagojene za testiranje kompleksnih vzorcev. Za monitoring genotoksičnosti predlagamo SOS/umuC test s *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002. Ta test je standardiziran za monitoring odpadnih vod (ISO 13829: 2000), zato je najprimernejši tudi za monitoring površinskih voda. Pomembno je, da je standard izdelan za testiranje nativnih, nekonzentriranih vzorcev, ter da vsebuje tudi kriterije za oceno genotoksičnosti. Vzorce za monitoring genotoksičnosti bi odvzeli v okviru odvzemov rednega kemijskega monitoringa, tako, da bi za vsak posamezen vzorec pridobili podatke o kemijski obremenjenosti in genotoksičnosti. Na osnovi dobljenih podatkov, bi lahko identificirali kritična, z genotoksini onesnažena mesta. Podatki bi bili tudi osnova za identifikacijo virov genotoksičnih onesnažil in s tem uvedbo ukrepov za njihovo zmanjšanje.

Vzorčevalna mesta

Biomonitoring površinskih vod bi bilo smiselno uvesti na tistih merilnih mestih, ki so značilna za vodna telesa površinskih voda, obremenjena zaradi odvajanja odpadnih voda enega ali več virov onesnaževanja ali zaradi znatnega vpliva razpršenih virov onesnaževanja ter na izbranih referenčnih merilnih mestih, ki so merilna mesta na manj onesnaženih vodnih telesih površinskih voda, ki se uporabljajo za referenčne točke pri določanju meril za ugotavljanje kemijskega stanja površinskih voda. Na osnovi poročila: »*Monitoring kakovosti površinskih vodotokov v Sloveniji v letu 2006*« predlagamo, da se začne biomonitoring izvajati na izbranih merilnih mestih za katera je bilo ugotovljeno slabo kemijsko stanje v letu 2006 in/ali so vključena v Operativni program zmanjševanja onesnaževanja površinskih voda s prednostnimi in drugimi nevarnimi snovmi. To so: Mura, merilno mesto Ceršak, Kučnica, merilno mesto Gederovci, Logašnica, merilno mesto Jačka, Ledava, merilno mesto Čentiba, Sava, merilno mesto Jesenice na Dolenjskem; Dravinja, merilno mesto Videm pri Ptuj, Pesnica, merilno mesto Zamušani, Krka, merilno mesto Krška vas; Cerknica, merilno mesto Cerknica (Dolenja vas), Koren, merilno mesto Nova Gorica; Sotla, merilno mesto Rogaška Slatina, Ljubljana, Zalog. Biomonitoring bi v prvem letu izvedli na 3 mesece in sicer v zimskem, pomladanskem, poletnem in jesenskem mesecu. Na letni ravni je to 48 vzorcev.

Jezera

Tudi v tem primeru predlagamo nadgradnjo obstoječega *Programa spremljanja ekološkega in kemijskega stanja jezer*, ki ga izvaja ARSO. S kemijskimi analizami lahko določimo le trenutno vsebnost težkih kovin v vodi in zato ni nujno, da so ob onesnaženosti vode tudi živa bitja in sedimenti onesnaženi s tem onesnažilom ali obratno. Prihaja namreč do časovnega zamika, poleg tega pa je dokazano, da vsebnosti npr. kovin v sedimentih in v organizmih z dolgim življenjskim ciklom kažejo zgodovino vsebnosti kovin v vodnem ekosistemu in zaledju za več let nazaj in je zato njihova koncentracija le v šibki povezavi s trenutno koncentracijo kovin v vodi, ki je odraz krajšega obdobja. Tudi zato je nujno uporabljati bioindikatorske organizme za določitev obremenjenosti vodnih ekosistemov z onesnažili. Nekateri organizmi so sposobni kopičiti velike količine onesnažil. Te se nato prenašajo po prehranjevalnih verigah navzgor in se v procesu biomagnifikacije (biološkega povečanja) koncentrirajo, kar

predstavlja tveganje za zdravje živali in ljudi. V jezerskih ekosistemih se bomo osredotočili predvsem na bioakumulacijo različnih onesnažil v ribah in makrofitih. Oba organizma sta pogosto uporabljena v študijah bioakumulacije, makrofiti predvsem zaradi njihove izredne zmožnosti akumulacije kovin. V omenjenih organizmih bomo določali koncentracijo kovin in sicer Hg v mišičnini rib, ostale kovine pa v jetrih rib ter kovine v koreninah emerznih rastlin. Medtem, ko so kovine zelo obstojne, so PAO-ji (policiklični aromatski ogljikovodiki) in pesticidi (razen lipofilnih organokloridnih pesticidov) v organizmih podvrženi razgradnji. Zato merjenje njihove koncentracije v organizmih niso primeren bioakumulacijski marker, ker ne odražajo stopnje obremenjenosti okolja s temi onesnažili. Veliko boljši pokazatelj izpostavljenosti organizmov PAO-jem in pesticidom so zato koncentracije njihovih produktov razgradnje. Metabolite pesticidov in PAO-jev bomo določali v žolčniku rib ter v koreninah emerznih rastlin. V ribah bomo spremljali tudi morfološki parameter LSI indeks (Liver Somatic Index), kot razmerje med svežo težo jeter in svežo težo celotne ribe. Ob izpostavljenosti rib onesnažilom se LSI indeks poveča.

Vzorčevalna mesta

Osredotočili se bomo na jezera, ki so že vključena v program državnega monitoringa kakovosti jezer: obe naravni jezera Blejsko in Bohinjsko jezero, umetno Velenjsko jezero, rečni akumulaciji Ptujsko jezero in Ormoško jezero ter zadrževalniki Šmartinsko, Slivniško, Perniško, Gajševsko in Ledavsko jezero v vodnem območju Donave ter Klivnik, Molja in Vogršček v vodnem območju Jadranskega morja. Bio-dostopnost onesnažil se v posameznih jezerih med sabo razlikuje, zato je težko samo na osnovi rezultatov kemijskega monitoringa določiti kritične točke. Na določenih neonesnaženih lokacijah so dokazali povečano bio-dostopnost težkih kovin v primerjavi z bolj onesnaženimi primerjalnimi lokacijami (primerjava med lokacijami ob Aljaškem zalivu in ob kalifornijski obali), razlog za slednje naj bi bile nizke vsebnosti kontrolnih dejavnikov (organski ogljik, sulfidi in Fe hidroksidii).

V prvi fazi bi obravnavali Šaleška jezera (Velenjsko, Družmirsko in Škalsko jezero), ki ležijo v neposredni bližini Termoelektrarne Šoštanj (TEŠ), za katera že imamo nekaj podatkov.

Morje

Za tarčni organizem smo izbrali klapavico (*Mytilus galloprovincialis*), ki jo že sedaj uporabljamo v biomonitoringu. Predlagani biomarkerji so enaki kot v primeru sladkovodnih rakov, torej encimski test aktivnosti acetilthioholin esteraze (AChE) in aktivnost glutation S-transferaze (GST), kar nam bo omogočalo oceno uporabnosti teh dveh biomarkerjev v različnih vodnih okoljih. Poleg tega bomo določali tudi stabilnost lizosomskih membran v prebavni žlezi klapavic in kondicijski ter somatogonadski indeks (GSI) školjk. Kondicijski indeks je pogosto uporabljen fiziološki biomarker rasti in metabolizma v školjkah, ki odraža učinke onesnaženja na populacijskem nivoju. GSI odraža razmnoževalni potencial školjk, ki je v obremenjenem okolju lahko zmanjšan. Prav tako nam pomaga ovrednotiti splošni stres in primerjati odziv školjk med različnimi vzorčnimi mesti, ki se med sabo razlikujejo v količini hranil.

Vzorčevalna mesta

Izbrali smo 3 standardna vzorčevalna mesta ob slovenski obali v Koprskem, Strunjanskem in Piranskem zalivu. Za referenčno postajo smo izbrali vzorčevalno mesto v Strunjanskem zalivu. Vzorčevalni mesti v Strunjanskem in v Piranskem zalivu sta znotraj območja namenjega za vzgojo školjk in rib. V predlaganem biomonitoringu bomo nadgradili obstoječi biomonitoring na ta način, da bomo merili večje število biomarkerjev kot je to v sedanjem biomonitoringu (novi biomarkerji stabilnost lizosomskih membran, dva encimska testa,

kondicijski in gonadosomatski indeks). Vzorčenje bomo izvajali dvakrat letno in sicer v mesecu marcu in v septembru. Školjke bomo izpostavili vplivom onesnažil 3 mesece pred pobiranjem.

Reference:

- [1] Zakon o varstvu okolja ZVO-1 (Uradni list RS, št. 41/2004)
 [2] Uredba o kemijskem stanju površinskih voda (Uradni list RS, št. 11/2002)
 [3] Pravilnikom o monitoringu kemijskega stanja površinskih voda (Uradni list RS, št. 42/02)
 [4] Operativni program zmanjševanja onesnaževanja površinskih voda s prednostnimi in drugimi nevarnimi snovmi, ki ga je sprejela Vlada Republike Slovenije na 76. redni seji dne 27.5.2004
 [5] Odločba Sveta 77/795/EGS z dne 12.12.1977 o oblikovanju skupnega postopka za izmenjavo informacij o kakovosti površinske sladke vode v Skupnosti

Obseg vzorčenja in finančna ocena

Biomonitoring	Število merilnih mest			Število vzorcev letno			Finančna ocena €/ leto			Finančna ocena €/ 3 leta
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	
Leto programa										
Tekoče vode	12	12	12	48	48	48	118.560*	118.560*	118.560*	355.680
Jezera	4	4	5	96	96	120	52.888	52.888	64.260	170.036
Morje	3	3	3	6	6	6	19.682	19.682	19.682	59.046
Skupaj							191.130	191.130	202.502	584.762

* genotoksičnost (NIB) 48.960 EUR in ekotoksičnost (KI) 69.600 EUR