

Kasvien fytoimediaatiopotentiali CCA:lla saastuneen maan puhdistuksessa

Petra Manninen-Egilmez¹, Pirjo Mäkelä¹, Helinä Hartikainen², Arja Santanen¹, Mervi Seppänen¹, Frederick Stoddard¹, Markku Yli-Halla²

¹ Helsingin Yliopisto, Soveltavan biologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin Yliopisto, petra.manninen@helsinki.fi, pirjo.makela@helsinki.fi, arja.santanen@helsinki.fi, mervi.seppanen@helsinki.fi, frederick.stoddard@helsinki.fi

² Helsingin Yliopisto, Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, PL 27, 00014 Helsingin Yliopisto, helina.hartikainen@helsinki.fi, markku.yli-halla@helsinki.fi

Tiivistelmä

Maaperän saastuminen on maailmanlaajuinen ympäristöongelma. Ihmisen toiminnan tuloksena esimerkiksi raskasmetalleilla pilaantuneita maa-alueita on runsaasti. CCA (chromated copper arsenate) on maailmalla laajasti käytetty puun kyllästysaine, joka on saastuttanut laajoja maa-alueita mm. sahalaiteilla, tehdasalueilla ja kaatopaikoilla. Kuparin, kromin ja arseenin yhtäaikainen esiintyminen vaikeuttaa maan puhdistamista kemiallisesti. Tästä johtuen fytoimediaatiomenetelmät näyttäisivät olevan paras vaihtoehto CCA:lla saastuneiden maiden puhdistamiseksi.

Fytoimediaatiolla tarkoitetaan maaperän puhdistamista kasvien avulla. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia kasvien kykyä puhdistaa maaperää haitta-aineista. Kokeessa kasvatettiin eri kasvilajeja sekä selvitettiin niiden kestävyys raskasmetalleja vastaan sekä kyky ottaa raskasmetalleja maasta.

Raskasmetallien kertyminen eri kasvinosiin sekä biomassan muodostus määritettiin. Biomassan muodostumisen sekä kasvien raskasmetallipitoisuuden avulla arvioitiin kasvien fytoimediaatiopotentiali. Kasveista havainnoitiin lisäksi lehtialan muodostus, itävyys juurinyströiden muodostus, juurien rakenne ja anatomia, vesisuhteet, yhteyttäminen, ravinnepitoisuus. Lisäksi tutkitaan antioksidanttiaktiivisuutta, raskasmetallien lokalisoitumista, fytokelatiinien muodostusta sekä määritetään kasvien tuhkapitoisuus ja koostumus.

Astiakokeissa lupiinit tuottivat noin kolme kertaa suuremman biomassan verrattuna hampukasveihin. Kupari kerääntyi eniten valko- ja sinilupiinin lehtiin, keltalupiinin korsiin sekä hampun lehtiin ja siemeniin. Kromia kerääntyi lehtiin ja korsiin, mutta ei palkoihin ja siemeniin. Arseni kerääntyi suurimmaksi osaksi lupiinien lehtiin sekä hampun korsiin, mutta sitä löydettiin huomattavasti kohonneina pitoisuuksina jokaisesta kasvinosasta. Raskasmetalleista arseenin konsentraatio lisääntyi selvästi maan arseenipitoisuuden kasvaessa. Kasveilla näyttäisi sen sijaan olevan raja kuinka paljon kasvi kykenee ottamaan kuparia. Raskasmetalleista kromin otto oli rajoitettua ja se näyttäisi haittaavan eniten kasvua.

Hamppu ja lupiini näyttäisivät soveltuvan fytoimediaatioon alueilla, joilla saastuneen maan konsentraatio on alle 200 mg kg⁻¹ maata. Viljelemällä kasveja CCA-aineilla pilaantuneilla mailla voitaisiin puhdistaa maata sekä käyttää kasvimateriaali bioenergian lähteenä sekä lisäksi vähentää raskasmetallien ja metalloidien huuhtoutumista estämällä eroosion muodostuminen.

Asiasanat: fytoimediaatio, biomassa, lupiini, hamppu, raskasmetallit, bioenergia

Johdanto

CCA (Chromated copper arsenate) on maailmalla laajasti käytetty puun kyllästysaine, joka on 1930-luvulta asti saastuttanut maa-alueita kuparilla, kromilla sekä arseenilla (Aceto & Fedele, 1994). Ongelma CCA:lla saastuneessa maassa on edellä mainittujen aineiden esiintyminen yhtäaikaaisesti, joka vaikeuttaa maan fysikaalis-kemiallista puhdistusta (Lombi ym. 2004). Fytoremediaatiomenetelmät näyttäisivätkin olevan paras vaihtoehto CCA:lla saastuneiden maiden puhdistamiseksi. Kuparin, kromin sekä arseenin vaikutuksia kasveissa sekä fytoremediaatiota on tutkittu erikseen, mutta niiden yhtäaikainen vaikutus on edelleen epäselvä.

Fytoremediaatio käsittää useita eri menetelmiä, joissa kasveja käytetään hyödyksi puhdistettaessa saastuneita maa-alueita, vesialueita ja ilmaa (Cunnigham ym. 1995). Kiinnostus fytoremediaatiotekniikoihin on ollut lisääntyvän mielenkiinnon kohteena sillä se sisältää suuria ekonomisia mahdollisuuksia. Menetelmät ovat huomattavasti halvempia verrattuna perinteisiin puhdistusmenetelmiin (Raskin ym. 1997). Yksi fytoremediaatiomenetelmistä on fytoekstraktio. Fytoekstraktiossa kasvit keräävät haitta-aineita korjattavaan kasvustoon. Tästä johtuen käytettävän kasvin tulee ottaa juuriston avulla saasteita maasta sekä siirtää ne versoon (Cunnigham ym. 1995). Ihanteellinen kasvi fytoekstraktioon kasvaa saastuneessa maassa tuottaen suuren biomassan sekä korkean raskasmetallipitoisuuden maanpäällisiin kasvinosiin (Cunnigham et al. 1995). Valitettavasti luonnossa tavattavat hyperakkumulaattorikasvit ovat usein hidaskasvuisia sekä tuottavat alhaisen vuotuisen biomassan (Khan. et al. 2001). Tästä johtuen fytoremediaatiossa voidaan keskittyä kasveihin, jotka tuottavat suuren biomassan, mutta kuuluva keskinkertaisiin saasteiden kerääjiin (Ebbs et al. 1997). Näin kyettäisiin poistamaan korkeampia pitoisuuksia haitta-aineita. Hamppu on nopeakasvuinen tuottaen suuren biomassan. Se sopeutuu helposti erilaisiin ympäristöolosuhteisiin ja omaan syvän juuriston (Small & Marcus 2002). Hampun on myös todettu keräävän kuparia, kadmiumia, lyijyä ja sinkkiä maasta (Angelova et al. 2004). Valkolupiinit selviytyvät matalassa pH:ssa ja alhaisessa ravinnepitoisuudessa. Niiden on myös todettu keräävän arseenia maasta (Vazquez et al. 2006).

Tutkimuksessa tutkittiin raskasmetallien kerääntymistä sekä jakautumista versossa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää hampujen ja lupiinien fytoremediaatiopotentiaali sekä soveltuvuus fytoremediaatioon sekä määrittää niiden toleranssi raskasmetalleja (kupari, kromi ja arseeni) vastaan. Lisäksi tutkitaan mahdollisuutta käyttää kasvimateriaali bioenergian raaka-aineeksi. Fytoremediaatiopotentiaali kertoo kasvin kyvystä puhdistaa saastunutta maata. Sitä voidaan arvioida, kun tiedetään eri kasvinosien biomassa sekä kasvinosien raskasmetallipitoisuudet.

Materiaalit ja menetelmät

Kuusi erillistä astiakoetta järjestettiin Helsingin yliopiston soveltavan biologian laitoksella vuosina 2007-2009. Kokeet järjestettiin täydellisesti satunnaistettuna kasvihuoneessa ja toistojen määrä oli 4-8.

Ensimmäisessä kokeessa käytettiin öljyhampua (*Cannabis sativa L.*), valkolupiinia (*Lupinus albus L.*) ja keltalupiinia (*Lupinus luteus L.*). Edellisten lisäksi toisessa kokeessa olivat mukana kuituhamppu (*Cannabis sativa L.*) ja sinilupiini (*Lupinus angustifolius*). Lopuissa kokeissa käytettiin ainoastaan valkolupiinia ja kuituhampua. Kasvit kylvettiin hiekkamaahan 7.5 L astioihin. Peruslannoituksena annettiin typpeä hampuille 150 mg N ja lupiineille 70 mg N kg⁻¹ sekä molemmille 40 mg P kg⁻¹ ja 100 mg K kg⁻¹ (KS, Puutarhan täyslannos ja MgS, Kemira Grow How). Astioihin lisättiin raskasmetalleja seuraavina pitoisuuksia: Cu:Cr:As 50:50:15, 100:100:5, 300:150:50, 200:300:100 ja 1000:1500:500 mg kg⁻¹. Kahdessa kokeessa kuituhampua ja valkolupiinia kasvatettiin ainoastaan yhdessä haitta-aineessa 1,0 L astioissa nousevina konsentraatioina Cu: 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800 ja 1000 mg kg⁻¹; Cr: 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 ja 1200 mg kg⁻¹; As: 5, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 ja 400 mg kg⁻¹. Vertailun vuoksi myös konsentraatiokokeessa oli mukana myös CCA pitoisuudet Cu:Cr:As 50:50:15 ja 100:100:5 mg/kg. Raskasmetallit lisättiin astioihin seuraavina yhdisteinä: Kupari CuSO₄, Kromi K₂Cr₂O₇ ja Arseni Na₂HAsO₄.

Siemenet kylvettiin astioihin ja kasvit harvennettiin 4-5 kasvia/astia noin kaksi viikkoa kylvöstä. Konsentraatiokokeessa astioissa kasvoi ainoastaan yksi kasvi. Kasvihuoneolosuhteet vakioitiin

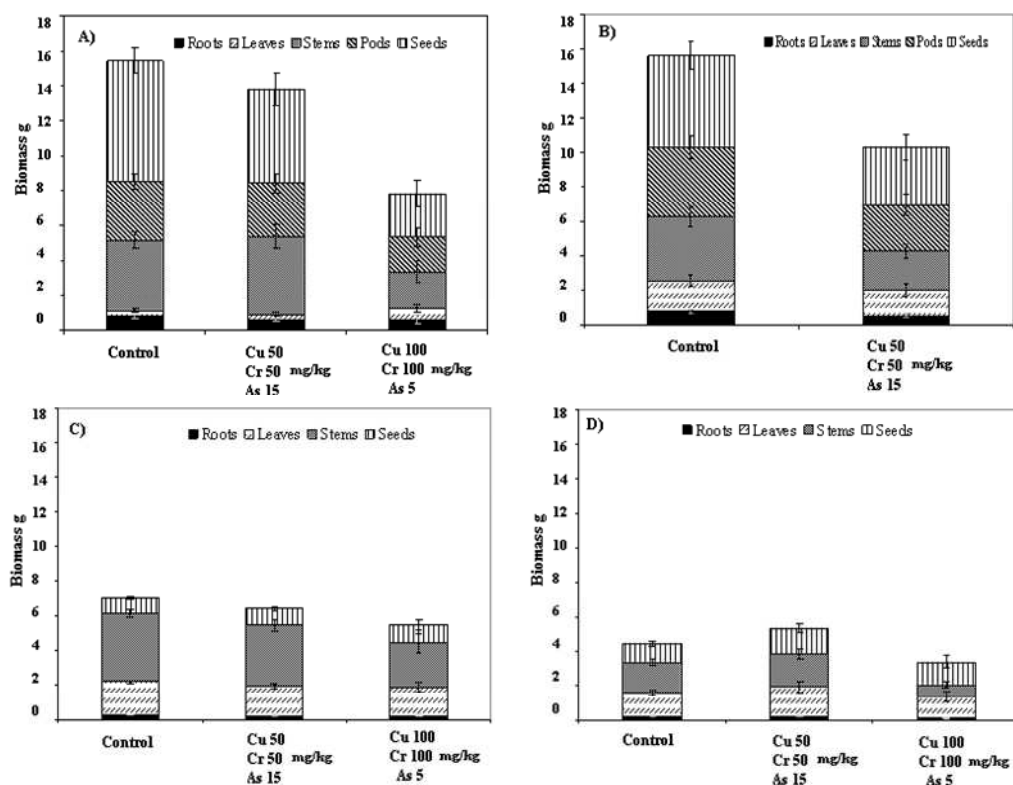
PRIVA- säätöautomaattikalla. Päivänpituus oli 16 h, PPFD noin 400 μmol ja lämpötila säädetty noin 21°C. Kasveista määritettiin biomassan muodostuminen eri kasvinosista (lehdet, juuret, korret, siemenet ja palot) sekä lehtiala (LI-3000-A Licor Inc. USA) viisi kertaa kasvukauden aikana. Konsentraatiokokeessa biomassa mitattiin ainoastaan kokeen lopussa. Näytteitä kuivattiin uunissa 80 °C:ssa kahden vuorokauden ajan, jonka jälkeen niiden kuivapaino punnittiin. Kuivat näytteet jauhettiin raskasmetallipitoisuuden määrittämistä varten. Raskasmetallit analysoitiin ICP:lla (Thermo Jarrel Ash, IRIS Advantage). Kromin ja Kuparin määrittämiseen käytettiin laitetta ICP-OES ja Arseenin ICP-MS.

Tulokset ja tulosten tarkastelu

Biomassa

Kaksi suurinta CCA- raskasmetallitasoa olivat liian korkeita kasvien kasvulle. Suurimmassa (Cu:Cr:AS 1000:1500:500) tasossa siemenet eivät itäneet. Toiseksi korkeimmassa tasossa (Cu:Cr:As) 200:300:100 kasvien kasvu pysähtyi kasvien ollessa noin 30 cm:n pituisia. Sen sijaan muissa käytetyissä konsentraatioissa kasvit selviytyivät. Raskasmetallitasoissa kasvien kasvu oli tosin epätasaisempaa verrattuna kontrollikasveihin sekä alhaisimpaan CCA-tasoon (Cu:Cr:As 50:50:15), mutta kasvit tuottivat kuitenkin hyvän biomassasadon. Öljyhamppu tuotti jopa suuremman biomassa alhaisimmassa tasossa (50:50:15) verrattuna kontrollikasveihin. Myös konsentraatiokokeessa kasvit tuottivat suuremman biomassan kasvaessaan lievästi saastuneessa maassa. Tämä ilmeni käytettäessä niin arseenia, kuparia kuin kromiakin (Taulukko 2).

Kasvihuoneessa lupiinit tuottivat noin kolme kertaa suuremman kokonaisbiomassan verrattuna hamppukasveihin (Kuva 1). Tämä johtui lähinnä palkojen suuresta painosta, jotka käsittivät noin 60-70% lupiinikasvien biomassasta. Konsentraatiokokeessa sadonkorjuu suoritettiin viiden viikon kuluttua itämisestä. Tällöin hamppujen biomassa oli vielä suurempi kuin lupiinien. Hamppujen biomassasta suurin osa oli korsissa. Valkolupiinin ja Keltalupiinin kontrollitason biomassoissa ei havaittu eroja, mutta keltalupiinin sato reagoi herkemmin maan raskasmetallipitoisuuden alentaen satoa. Sinilupiini oli kestävä raskasmetalleja vastaan, mutta tuottivat noin 75 % alhaisemman biomassan verrattuna muihin lupiinilajeihin. Kuituhamppu taas tuotti öljyhamppua suuremman biomassan.



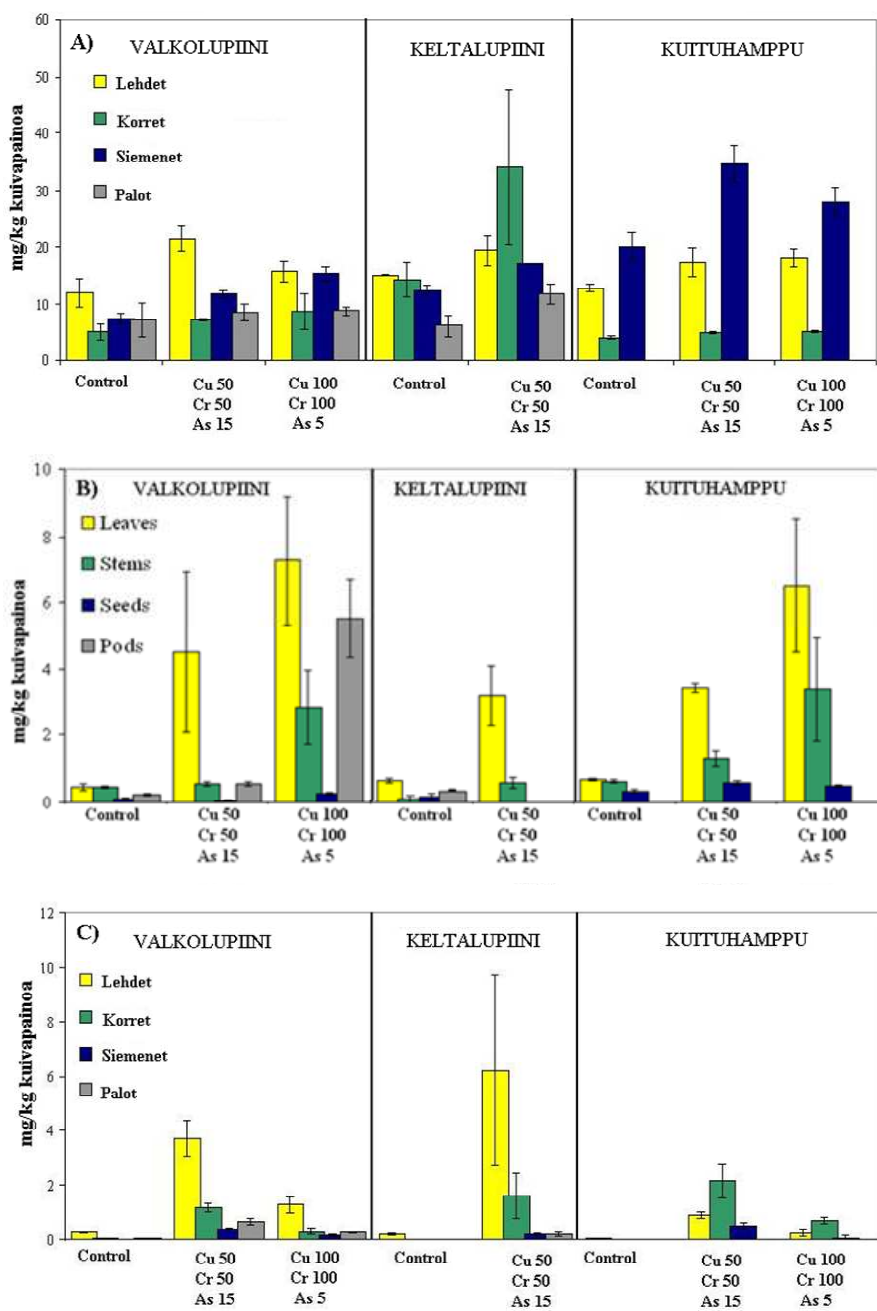
Kuva 1. Kontrollimaassa sekä kuparilla, kromilla ja arsenilla saastuneessa maassa kasvaneiden A) valkolupiinin, B) keltalupiinin, C) kuituhampun ja D) öljyhampun kasvosien kuivapaino. Tulokset ovat kahdeksan kerranteen keskiarvoja, \pm SE, $n=19-40$

Raskasmetallipitoisuus

Sekä kasvilaji että raskasmetalli vaikuttivat mihin kasvinosaan raskasmetallit kerääntyivät (Kuva 2). Kupari kerääntyi eniten valko- ja sinilupiinin lehtiin, keltalupiinin korsiin sekä hampun lehtiin ja siemeniin. Kuituhampun korsien kuparipitoisuus oli korkeampi aikaisemmin kasvukaudella. Myöhemmin kasvukaudella hamput siirsivät kuparin kuitenkin siemeniin. Kasvit myös sietivät hyvin maan kuparipitoisuutta. Kasvu hidastui vasta kun maan pitoisuus oli n. 600-800 mg/kg. Kasveilla näyttäisi olevan raja kuinka paljon kasvi kykenee ottamaan kuparia. Tosin kun maan kuparikonsentraatio oli tarpeeksi korkea (600-1000 mg/kg) kasvien kuparipitoisuus nousi osalla kasveilla korkeaksi, mutta hajonta oli suurta (Taulukko 2).

Arseeni kerääntyi suurimmaksi osaksi lupiinien lehtiin sekä hampun korsiin, mutta sitä löydettiin huomattavasti kohonneina pitoisuuksina jokaisesta kasvinosasta. Raskasmetalleista arseenin konsentraatio lisääntyi selvästi maan arseenipitoisuuden kasvaessa. Tämä huomattiin myös konsentraatiokokeessa, jossa kasvit sietivät hyvin maan arseenipitoisuutta 100-300 mg/kg asti (Taulukko 2). Arseenin pitoisuus kasvissa lisääntyi kasvukauden edetessä. Suurimmat pitoisuudet löytyivät valkolupiinin lehdistä. Valkolupiinin tulisikin antaa kasvaa mahdollisimman pitkään, mutta kerätä sato ennen kuin lehdet ehtivät putoamaan.

Kromi kerääntyi lehtiin ja korsiin. Korkeimmat pitoisuudet löytyivät kuitenkin valkolupiinin paloista, mutta siemeniin kromi ei kulkeutunut yhtään. Kromin määrä kuituhampulla ja valkolupiinilla lisääntyi kasvukauden edetessä ja kasvit siirsivät kromin tehokkaasti korsista lehtiin. Tosin sadonkorjuussa myös korsien kromipitoisuus lisääntyi, varsinkin kasvatettaessa korkeammassa kromitasoissa. Raskasmetalleista kromin otto oli rajoitettua ja se näyttäisi haittaavan eniten kasvua. Kasvien kasvu häiriintyi jo maan kromitason ollessa 100- 200 mg/kg. Tätä korkeammassa pitoisuudessa kasvaneet kasvit kuolivat muutamassa päivässä.



Kuva 2. Valkolupiinin, keltalupiinin sekä kuituhampun A) kuparin, B) kromin sekä C) arseenin maanpäällisten kasvinosien raskasmetallipitoisuudet (mg/kg kuivapainosta) eri raskasmetallitasoissa. Tulokset ovat kolmesta kerranteesta \pm SE, n = 4-8.

<i>konsentraatio maassa mg/kg</i>	<i>As mg/kg/kasvi</i>	<i>Biomassa g</i>		
Valkolupiini				
Control	0,15±0,04	3,94±0,89		
As 5	1,13±0,17	4,30±0,99		
As 15	2,71±0,08	3,91±0,42		
As 100	14,30±15,98	2,84±1,48		
Kuituhamppu				
Control	0,13±0,01	6,57±0,85		
As 5	2,90±0,38	4,13±0,91		
As 15	4,68±0,89	4,32±2,03		
As 300	22,83±5,48	1,63±0,62		
<i>konsentraatio maassa mg/kg</i>	<i>Cu mg/kg/kasvi</i>	<i>Biomassa g</i>		
Valkolupiini				
Control	5,53±1,74	3,94±0,89		
Cu 50	6,70±0,70	4,35±0,29		
Cu 100	7,10±0,82	4,36±0,26		
Cu 600	23,00±12,00	1,94±1,75		
Cu 1000	206,33±172,97	0,86±1,32		
Kuituhamppu				
Control	6,70±2,36	6,57±0,85		
Cu 50	7,13±0,81	7,64±0,54		
Cu 100	7,90±0,20	8,36±0,87		
Cu 600	62,67±84,32	3,93±4,12		
<i>konsentraatio maassa mg/kg</i>	<i>Cr mg/kg/kasvi</i>	<i>Biomassa g</i>		
Valkolupiini				
Control	0,13±0,23	3,94±0,89		
Cr 50	1,10±0,10	4,42±0,28		
Cr 100	3,50±3,55	1,93±1,75		
<i>konsentraatio maassa mg/kg</i>	<i>As mg/kg/kasvi</i>	<i>Cr mg/kg/kasvi</i>	<i>Cu mg/kg/kasvi</i>	<i>Biomassa g</i>
Valkolupiini				
Control	0,15±0,04	0,13±0,01	5,53±1,74	3,94±0,89
CCA 50:50:15	0,87±0,21	1,57±0,90	6,57±1,03	3,93±0,29
CCA 100:100:5	0,34±0,15	3,23±1,64	6,90±0,75	3,66±0,88
Kuituhamppu				
Control	0,13±0,01	0,47±0,15	6,70±2,36	6,57±0,85
CCA 50:50:15	1,02±0,35	0,90±0,62	12,37±4,98	5,73±0,00
CCA 100:100:5	0,51±0,19	1,07±0,90	8,10±1,71	6,12±2,01

Taulukko 2. Eri arseeni, kupari ja kromi konsentraatioissa sekä niiden yhdistelmissä kasvaneiden valkolupiinin ja kuituhampun arseenipitoisuudet (mg/kg/kasvi) sekä biomassa(g) viiden viikon jälkeen kylvöstä. raskasmetallipitoisuudet: kolme kerrannetta, ±STD,n=3. Biomassa: neljä kerrannetta, ±STD,n=4.

<i>mg/kg</i>	<i>FYTOREMEDIAATIO POTENTIAALI $\mu\text{g}/\text{kasvi}$</i>		
	<i>Valkolupiini</i>	<i>Keltalupiini</i>	<i>Kuituhamppu</i>
KUPARI			
Kontrolli	98,3	122,5	57,5
Cu50, Cr5, As 15	127,5	194,7	79,5
Cu100, Cr100, As5	82,8	ei mitattu	70,5
KROMI			
Kontrolli	3,3	3,6	3,9
Cu50, Cr5, As 15	5,4	6,1	10,9
Cu100, Cr100, As5	21,7	ei mitattu	19,5
ARSEENI			
Kontrolli	0,7	0,6	0,3
Cu50, Cr5, As 15	10,7	14,4	9,5
Cu100, Cr100, As5	8,6	ei mitattu	2,3

Taulukko 1. Valkolupiinin, keltalupiinin sekä kuituhampun fytoimediaatiopotentiaali ($\mu\text{g}/\text{kasvi}$) puhdistettaessa kuparilla, kromilla ja arseenilla saastunutta maata. Potentiaali on laskettu kasvinosien kuivapainon sekä niiden raskasmetallipitoisuuksien avulla.

Johtopäätökset

Hamppu ja lupiini näyttäisivät soveltuvan fytoimediaatioon alueilla, joilla saastuneen maan konsentraatio on alle 200 mg kg^{-1} maata. Hamput ja lupiini sietävät melko korkeitakin kupari- ja arseenipitoisuuksia, mutta kromi haittaa selvästi kasvien kasvua. Keltalupiinilla oli suurin fytoimediaatiopotentiaali kuparin ja arseenin osalta. Valitettavasti se reagoi muita kasveja herkemmin kromiin. Valkolupiini sekä kuituhamppu osoittivat suurempaa stabiilisuutta kaikkia lisättyjä haitta-aineita vastaan. Viljelemällä kasveja CCA-aineilla pilaantuneilla mailla voitaisiin puhdistaa maata sekä käyttää kasvimateriaali bioenergian lähteenä sekä lisäksi vähentää haitta-aineiden huuhtoutumista estämällä eroosion muodostuminen.

Fytoimediaatio vie enemmän aikaa kuin muut puhdistusmenetelmät, sillä käsittelyt on yleensä uusittava useaan kertaan, että saadaan maan haitta-ainepitoisuus toivotulle tasolle. Tästä johtuen fytoekstraktio soveltuukin parhaiten laajoille, mutta ei niin vakavasti saastuneille alueille. Saasteiden poistossa voidaan käyttää hyväkseen eri kasvien erilaista kykyä puhdistaa maata. Tällä on merkitystä puhdistettaessa alueita, jotka ovat saastuneet useammalla kuin yhdellä haitta-aineella.

Kirjallisuus

- Aceto M, Fedele A.** (1994). Rain water effect on the release of arsenic chromium and copper from treated wood. *Fresenius Environ. Bull.* 3:389-394.
- Angelova V.** (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax cotton and hemp). *Ind. Crops Prod.* 19: 197-205.
- Cunningham SC, Berti WR, Huang JW.** (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *TIBTECH* 13:393-397.
- Ebbs SD, Lasat MM, Brady DJ, Cornish J, Gordon R & Kochian LV.** 1997. Phytoextraction of Cadmium and Zinc from a Contaminated Soil." *Journal of Environmental Quality* 26, 1424-1430.
- Khan AG, Kuek C, Chaudry TM, Khoo CS & Hayes WJ.** 2000. The role of plants, mycorrhizae, and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation *Chemosphere* 41, 197-207.
- Li C-X, Feng S-L, Shao Y, Jiang L-N, Lu X-Y, Hou X-L** (2007). Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *J. Environ. Sci.* 19:725-732.
- Lombi E, Hamon RE, Wieshammer G, McLaughlin MJ & McGrath SP.** 2004. Assessment of the use of industrial by-products to remediate a copper/arsenic contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 33, 902-910.
- Raskin, I., Smih, R.RD., Salt, D.** 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current opinion in Biotechnology* 8:221-226.
- Small, E., Marcus, D.** 2002. Trends in new crops and new uses (Eds. Janick, J., Whipkey, A.) Pp. 284-326.
- Vazquez S, Agha R, Granado A, Sarro MJ, Esteban E, Penalosa JM & Carpena RO.** 2006. Use of white lupin plant for phyto-stabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 177, 349-365.