

UNIVERSITEIT ANTWERPEN

FACULTEIT WETENSCHAPPEN

DEPARTEMENT TOEGEPASTE BIOLOGISCHE WETENSCHAPPEN

**Hyperaccumulatie in *Lolium perenne*:  
Milieutoxicologische evaluatie van het  
gebruik van grassen voor  
cadmiummonitoring en fyto-extractie**

Student: Maarten De Bock

Verhandeling voorgedragen tot het bekomen van  
de graad van Bio-Ingénieur in de Milieutechnologie

Promotor:  
Prof. Dr. Yves Guisez  
Copromotor:  
Dr. Geert Potters



## Voorwoord

Het gras groeit,  
de plant bloeit.

Nu weet iedereen die het las,  
deze thesis gaat over gras.

Een goede thesis kost veel bloed, zweet en tranen,  
maar veel mensen leidden het in goede banen.

Dankzij hen liep er niets mank,  
allen mijn welgemeende dank.

Dit gedichtje zou ik graag willen opdragen aan alle mensen die me geholpen hebben om deze thesis tot een goed einde te brengen. Vooreerst wil ik mijn promotor, prof. dr. Yves Guisez, bedanken voor het vertrouwen dat hij in mij heeft gesteld. Mijn copromotor, dr. Geert Potters, begeleidde deze thesis vanaf de eerste experimenten tot de laatste woorden, ik bedank hem, niet het minst om een heel jaar met mij te willen samenwerken. Ik bedank mijn medelezers, prof. dr. Han Asard en prof. dr. Piet Seuntjens, omdat ze dit reeds hebben gelezen, en wens ze nog veel succes met de verdere lectuur. Ik dank zeker alle assistentie die ik gehad heb in het labo, met name: ir. Raf Dewil, Marcel Selens en Hilde Vanderstappen. Aan mijn vriendin, een hele grote dank u, om mij tijdens deze thesis te steunen en mij te vergezellen bij de veldstudies. Mijn klasgenoten dank ik voor de gezellige jaren. Ook mijn ouders mogen in dit rijtje niet ontbreken, zij hebben mij de mogelijkheid gegeven om vele jaren te studeren, het behaalde resultaat is dan ook een "dank u" aan hun adres. Tot slot rest er mij enkel het gras te bedanken voor zijn wil om te groeien. Aan allen die ik mogelijk vergeten ben wens ik mij te verontschuldigen en hen alsnog te bedanken.

## Samenvatting

Cadmiumvervuiling is een belangrijk probleem in Vlaanderen, dat repercussies kan hebben op de volksgezondheid. Vermits enkel bodemanalyses geen volledig beeld geven van de impact van de vervuiling van een bepaald terrein (en met name de biobeschikbaarheid van het metaal niet aangeven), is het belangrijk te weten hoe planten reageren op deze vervuiling. In deze tekst wordt de impact van cadmium op grassen, toch een belangrijke soortengroep in verschillende ecosystemen, bestudeerd. In een reeks laboratoriumproeven werd *Lolium perenne* blootgesteld aan een reeks cadmiumconcentraties. Verschillende parameters werden bepaald om de tolerantie van *Lolium perenne* voor Cd te beschrijven. Een LD<sub>50</sub> van 2,78 mM werd vastgesteld. Wanneer het effect van ecologisch relevantere Cd-dosissen (0-20 µM) werd bestudeerd, bleek dat de groei van de planten werd geïnhibeerd vanaf een concentratie van 20 µM. Analyse van fluorescentie-quenchingparameters toonde aan dat zowel fotochemische quenching en niet-fotochemische quenching werden beïnvloed vanaf 10 µM.

Ten slotte werd, via atomic emission spectroscopie, de concentratie van Cd bepaald in de verschillende plantenweefsels. Aan de hand van deze metingen werd gevonden dat *Lolium perenne* beschouwd kan worden als hyperaccumulator. *Lolium perenne* blijkt slechts 4,5 jaar nodig te hebben om de cadmiumconcentratie in gesimuleerde vervuilde bodem te halveren. De hoge cadmiumconcentraties werden echter enkel in laboratoriumomstandigheden teruggevonden.

Verder werden de cadmiumconcentraties in grassen en bodems in de omgeving van Antwerpen onderzocht, met behulp van een elders beschreven gradiënt voor Cd-vervuiling langsheen de overheersende windrichting. De concentratie in bladeren en wortels bleek een goede maat voor de biobeschikbare fractie aan Cd in de bodem. In de parken Sorghvliedt en Schoonselhof werd de grootste vervuiling aangetroffen (tot 0,89 ppm biobeschikbaar Cd in de bodem). Het is hier zeker aangewezen om tot sanering van de bodem over te gaan.

De resultaten van deze verhandeling zullen ter publicatie worden aangeboden aan Environmental and Experimental Botany

## Inhoudsopgave

<a href="#">Voorwoord</a>	<a href="#">i</a>
<a href="#">Samenvatting</a>	<a href="#">ii</a>
<a href="#">Inhoudsopgave</a>	<a href="#">iii</a>
<a href="#">Lijst met tabellen</a>	<a href="#">v</a>
<a href="#">Lijst met figuren</a>	<a href="#">vi</a>
<a href="#">Lijst met gebruikte afkortingen</a>	<a href="#">viii</a>
<a href="#">1 Inleiding</a>	<a href="#">1</a>
<a href="#">1.1 Cadmium in het milieu</a>	<a href="#">1</a>
<a href="#">1.1.1 Wat is cadmium?</a>	<a href="#">2</a>
<a href="#">1.2.3 Cadmium en gezondheid</a>	<a href="#">2</a>
<a href="#">1.2.4 Cadmium in Vlaanderen</a>	<a href="#">3</a>
<a href="#">1.2.5 Bronnen van cadmium</a>	<a href="#">7</a>
<a href="#">1.2.6 Cadmiumaccumulatie</a>	<a href="#">10</a>
<a href="#">1.3 Cadmium in planten</a>	<a href="#">12</a>
<a href="#">1.2.1 Cadmiumopname door planten</a>	<a href="#">12</a>
<a href="#">1.3.3 Tolerantie en fysiologische gevolgen</a>	<a href="#">14</a>
<a href="#">1.4 Saneren van zware metalen in de bodem</a>	<a href="#">16</a>
<a href="#">1.3.1 In situ-technieken</a>	<a href="#">17</a>
<a href="#">1.4.3 Ex situ-behandeling</a>	<a href="#">18</a>
<a href="#">1.3.4 Waterbehandeling</a>	<a href="#">20</a>
<a href="#">1.4.4 Beheersingstechnieken</a>	<a href="#">20</a>
<a href="#">1.4.5 Haalbaarheid voor het saneren van zware metalen</a>	<a href="#">22</a>
<a href="#">1.5 Fytoremediatie</a>	<a href="#">23</a>
<a href="#">1.3.1 Fyto-extractie</a>	<a href="#">23</a>
<a href="#">1.5.3 Fytotransformatie</a>	<a href="#">25</a>
<a href="#">1.5.4 Fytostabilisatie</a>	<a href="#">25</a>
<a href="#">1.5.5 Evaluatie van fytoremediatietechnieken</a>	<a href="#">26</a>
<a href="#">1.6 Grassen</a>	<a href="#">27</a>
<a href="#">1.6.1 Anatomische kenmerken van echte grassen</a>	<a href="#">27</a>
<a href="#">1.4.2 Het gebruik van grassen</a>	<a href="#">30</a>
<a href="#">1.6.3 Enkele typische grassen uit de Vlaamse flora</a>	<a href="#">31</a>
<a href="#">1.7 Doelstellingen</a>	<a href="#">33</a>
<a href="#">2 Materiaal en methode</a>	<a href="#">35</a>
<a href="#">2.1 Het kweken van <i>Lolium perenne</i></a>	<a href="#">35</a>
<a href="#">2.1.1 De groeimedia voor het kweken van <i>Lolium perenne</i></a>	<a href="#">35</a>
<a href="#">2.2.3 Bepaling van de speciatie van cadmium in het groeimedium</a>	<a href="#">36</a>
<a href="#">2.2.4 Het kweken van planten voor korte termijn experimenten</a>	<a href="#">37</a>
<a href="#">2.2.5 Het kweken van planten voor middellange termijn experimenten</a>	<a href="#">37</a>
<a href="#">2.2.6 Het kweken van <i>Lolium</i> voor fyto-extractietesten</a>	<a href="#">38</a>
<a href="#">2.2.7 Het kweken van <i>Lolium</i> voor LD50 bepaling</a>	<a href="#">38</a>
<a href="#">2.3 Staalname in het veld</a>	<a href="#">39</a>
<a href="#">2.4 Samenstelling en eigenschappen van de bodem</a>	<a href="#">41</a>
<a href="#">2.5 Bepaling van de lengte van de verschillende delen van het gras</a>	<a href="#">42</a>
<a href="#">2.6 Bepaling van het cadmiumgehalte</a>	<a href="#">43</a>
<a href="#">2.5.1 Opstellen van een ijklijn voor de cadmiumelektrode</a>	<a href="#">43</a>
<a href="#">2.6.3 Destructie van grasstalen voor elementen analyse</a>	<a href="#">43</a>
<a href="#">2.6.4 Sequentiele extractie van bodemstalen</a>	<a href="#">43</a>
<a href="#">2.6.5 Atomaire emissie spectroscopie (AES)</a>	<a href="#">44</a>
<a href="#">2.7 Fluorescentie</a>	<a href="#">46</a>
<a href="#">3 Resultaten</a>	<a href="#">49</a>

3.1 De effecten van cadmium op <i>Lolium perenne</i> .....	49
3.1.1 Opname van cadmium door <i>Lolium perenne</i> .....	49
3.2.4 Invloed van cadmium op de fotosynthese in <i>Lolium perenne</i> .....	54
3.2.5 Invloed van cadmium op de groei van <i>Lolium perenne</i> .....	58
3.2.6 Bepaling van de haalbaarheid van fyto-remediatie.....	62
3.2.7 Acclimatisatie van <i>Lolium perenne</i> aan cadmium.....	65
3.2.8 Bepaling van de LD50 van <i>Lolium perenne</i> voor cadmium.....	66
3.3 Bepaling van de contaminatie van cadmium in grassen in de omgeving van Antwerpen.....	68
3.2.1 Cadmiumconcentratie in wortels en bladeren op 5 controlepunten.....	68
3.3.3 Concentratie cadmium in bodems rond Antwerpen.....	69
3.3.4 Bepaling van de biobeschikbare fracties.....	69
3.3.5 Samenstelling van de bodem.....	71
3.3.6 Verspreiding van cadmium via de lucht.....	71
3.3.7 Bepaling van de vervuiling in functie van de afstand.....	73
4 Discussie.....	74
4.1 <i>Lolium perenne</i> en cadmium: mogelijkheid tot fyto-extractie.....	74
4.1.1 Cadmiumtolerantie van <i>Lolium perenne</i> .....	74
4.2.3 Invloed op de groei.....	76
4.2.4 Acclimatisatie.....	76
4.2.5 Fotosynthese en fluorescentie	
77	
4.2.6 Opname van cadmium.....	80
4.2.7 Fyto-extractie.....	82
4.3 Cadmium in de omgeving van Antwerpen.....	85
4.2.1 Belang van onderzoek.....	85
4.3.3 Cadmiumgehalte in bodem en gras.....	85
4.4 Conclusie.....	91
Bibliografie.....	92

## Lijst met tabellen

tabel 1: Oplosbaarheidsproducten van verschillende cadmiumzouten (Skoog et al., 1996).....	2
tabel 2: Bodemsaneringsnormen in Vlaanderen (Vlaamse Overheid 1996).....	16
tabel 3: Enkele belangrijke technieken met elkaar vergeleken (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001, Baeyens en Everaert, 2004).....	22
tabel 4: Two way ANOVA uitgevoerd op het Cd-gehalte in stengels met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken.....	50
tabel 5: Two way ANOVA uitgevoerd op het Cd-gehalte in wortels met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken.....	51
tabel 6: Cadmium-speciatie in standaard groeimedium (zie materiaal en methode voor samenstelling) berekent met Visual MINTEQ (v 2.40b).....	52
tabel 7: Alle gemiddeldes voor de parameters Tau, Hill en Plat berekend voor verschillende tijden(dagen) en verschillende concentraties Cd in de voeding. Alle waarden weergegeven met standaard fout. (*: $P < 0,05$ ; **: $P < 0,01$ ).....	57
tabel 8: Two way ANOVA uitgevoerd op de bladlengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking op de cadmiumconcentratie in het groeimedium en "tijd" op de duur van de blootstelling.....	59
tabel 9: Two way ANOVA uitgevoerd op de wortellengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken.....	60
tabel 10: Two way ANOVA uitgevoerd op de totale lengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken.....	61
tabel 11: Biomassaproductie na toevoeging van chelatoren, gemeten na 6 weken in bakjes van 10 bij 20 cm.....	63
tabel 12: Cadmium-speciatie in MS-medium (zie materiaal en methode voor samenstelling) berekent met Visual MINTEQ.....	67
tabel 13: De verschillende mogelijke biobeschikbare fracties vergeleken.....	70
tabel 14: De samenstelling van de bodems waar staalname plaatsvond.....	71
tabel 15: De verschillende windtypes met hun dispersieparameters en hun percentage van voorkomen.....	72

## Lijst met figuren

figuur 1: Cadmiumgehalte in mosstalen uit heel Europa (UNECE ICP vegetation, 2003) 4	
figuur 2: Pissebedden zijn gekend om zware metalen te accumuleren, op vele plaatsen in Vlaanderen werden deze organismen gemeten en vergeleken met een referentiewaarde (MIRA-T 2005).....	5
figuur 3: De zinksmelter en de vervuilde gebieden rond Lommel (Nawrot et al., 2006)..	6
figuur 4: De regio ten zuiden van Antwerpen is vervuild met Cd (Tersago et al., 2004 en D'Havé et al., 2005) .....	6
figuur 5: Gehalte aan zware metalen in slib vergeleken met de Vlaamse normen (Zn: 900; Cu: 375; Pb: 300; Cr: 250; Cd: 6; Hg: 5 mg/kgDS) (naar Baeyens en Van De Steene, 2005).....	8
figuur 6: Overzicht van de voornaamste routes die Cd kan volgen met de emissies in België (naar Plasman en Verreest, 1992).....	10
figuur 7: De atoomstructuur van cadmium en calcium, beide atomen hebben 2 atomen op de buitenste schil.....	14
figuur 8: Schema van pump and treat (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001).....	17
figuur 9: Schema van elektroreclamatie (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001).....	18
figuur 10: Schema van een deepwell (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001).....	21
figuur 11: Stengelbasis van een jonge maïsscheut. De bladscheden zijn verwijderd. De kroonwortels zijn duidelijk zichtbaar.....	28
figuur 12: Platgeslagen korenveld. De halmen richten zich weer op.....	29
figuur 13: Verschillende bloeiwijzen. Van links naar rechts: Lolium perenne (aargras), Poa pratensis (pluimgras) en Dactylis glomerata (kroopaar).....	30
figuur 14: Lolium perenne (a) met bloeiwijzen (b en c).....	31
figuur 15: Poa pratensis (a) met bloeiwijze (b en c).....	32
figuur 16: Dactylis glomerata (a) met bloeiwijzen (b en c).....	32
figuur 17: Schema en foto van het hydrocultuursysteem, de vloeistof stroomt in wijzerzin.....	37
figuur 18: De staalname punten en hun ligging ten opzichte van enkele referentiepunten (a: non-ferro-industrie ; b: afvalverbrandingsoven; 1: Sorghvliedt; 2: Schoonselhof; 3: Nachtegalenpark; 4: Rivierenhof; 5: Gemeentepark Brasschaat).....	40
figuur 19: Voorbeeld van het verloop van een fluorescentiemeting.....	48
figuur 20: De opname van Cd in bladeren van Lolium perenne uitgezet voor verschillende concentraties Cd in het groeimedium, op 2 tijdstippen. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 4.....	49
figuur 21: De opname van Cd in wortels van Lolium perenne uitgezet voor verschillende concentraties Cd in het groeimedium en op 2 tijdstippen. Inzet: De opname van Cadmium in wortels van de ontwikkelende Lolium perenne vergeleken in de tijd en voor 2 concentraties (0 en 2 µM). Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 4.....	51
figuur 22: De verhouding tussen de concentratie Cd gemeten in wortels en de concentratie in bladeren (experimenten uitgevoerd in standaard groeimedium met 2; 10; 20 µM Cd) waarden weergegeven. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 12. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	52
figuur 23: Alle metingen van cadmiumconcentraties in bladeren uitgezet ten opzichte van de concentratie in het standaard groeimedium.....	53
figuur 24: Alle metingen van cadmiumconcentraties in wortels uitgezet ten opzichte van de concentratie in het standaard groeimedium.....	54
figuur 25: Metingen van de Fv/Fm in functie van de tijd van donkeradaptatie.....	55



figuur 26: De Fv/Fm-waarden in functie van de tijd, metingen gebeurden bij verschillende concentraties Cd in standaard groeimedium. Significanties werden getest ten opzichte van dezelfde concentratie bij het eerste tijdstip. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 10. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	55
figuur 27: De gemiddelde lengte van bladeren van Lolium perenne weergegeven voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 32. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	58
figuur 28: De gemiddelde lengte van wortels van Lolium perenne weergegeven met standaardfout voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 32. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	59
figuur 29: De gemiddelde totale lengte van Lolium perenne weergegeven met standaardfout voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 32. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	61
figuur 30: De totale productie op (200 cm <sup>2</sup> ) na 6 weken vergeleken met de som van de producties van telkens 2 weken. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	62
figuur 31: De invloed van de behandeling met chelatoren op de accumulatie van Cd in de bovengrondse delen m1, m2, m3 staan voor respectievelijk eerste, tweede en derde maaibeurt. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	63
figuur 32: De totale hoeveelheid Cd die men in 6 weken tijd uit de bodem kan halen in functie van de behandeling (m = tweewekelijks maaien, nm = niet maaien). Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001).....	64
figuur 33: De gemiddeldes van de 4 testgroepen. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 24. Een lichtgrijs balkje stelt de lengte voor van grassen die gedurende de eerste 2 weken geen Cd toegediend kregen, een donkergrijs balkje betekent een concentratie van 2 µM Cd in het groeimedium. De 2 linkse balkjes stellen grassen voor die geen Cd kregen in de derde week, de rechtse balkjes slaan op de grassen die 50 µM Cadmium kregen in week 3.....	65
figuur 34: Alle gemeten percentages en de gefitte logistische sigmoïde functie.....	66
figuur 35: De gemiddelde concentratie Cd in wortels en bladeren van grassen die voorkomen op 5 plaatsen rond Antwerpen met hun standaardfout.....	68
figuur 36: De gemiddelde concentratie in verschillende bodemfracties op plaatsen rond Antwerpen, met standaardfout.....	69
figuur 37: De bioaccumulatie in wortels vergeleken voor de verschillende parken.....	70
figuur 38: De bioaccumulatie in bladeren vergeleken voor de verschillende parken....	70
figuur 39: Dispersieberekening voor een uitstoot van 1 kg/u resultaten weergegeven µg/m <sup>3</sup> op dagbasis. Het gebied heeft een straal van 1 km.....	72
figuur 40: De afhankelijkheid van de vervuiling in wortels, bladeren en bodem ten opzichte van de afstand, weergegeven met standaardfout. Bladeren en wortelen zijn weergegeven op de linker Y-as; Het vrij Cd is weergegeven op de rechter-as (ook in µg/g).....	73
figuur 41: Berekening van de LD50 op basis van het ongebonden Cd <sup>2+</sup> .....	75

## Lijst met gebruikte afkortingen

AES	atomaire emissie spectrometrie
ASC	ascorbaat-anion
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BBT	best beschikbare techniek
BCF	bioconcentratiefactor
CEC	cation exchange capacity
ERM	environmental resources management
FC	fytochelatine
GSH	glutathion
ICP	inductive coupled plasma

# 1 Inleiding

*"Men kan moeilijk eigen wegen gaan zonder andermans gras plat te trappen."*

*(Julien de Valckenaere)*

## 1.1 Cadmium in het milieu

Een van de meer acute milieuproblemen in Vlaanderen (zie 1.2.4) betreft de aanwezigheid van zware metalen in de bodem, en dan met name arseen (As), cadmium (Cd), kwik (Hg), lood (Pb), koper (Cu), nikkel (Ni) en zink (Zn) (MIRA-T 2003). In dit werk komt enkel Cd als aan bod. Dat Cd nog steeds een belangrijk probleem vormt in België, bewijzen de vele krantenkoppen, zoals: "Cadmiumalarm in Noord-Limburg" (Het Nieuwsblad 16-01-2006); "Kanker door cadmium" (De Standaard 16-01-2006); "Umicore saneert Grâce-Hollogne" (De Standaard 18-01-2006); "Koolmezen fluiten toontje lager door cadmium in Hobokense bodem" (Het Belang van Limburg 19-01-2006) en "Waaals bedrijf loost massa cadmium in de Maas" (Het Nieuwsblad 27-05-2006). De voornaamste gevaren spelen zich af op het domein van onze gezondheid: doorheen de voedselketen worden mensen aan hoge en minder hoge dosissen blootgesteld.

De totale hoeveelheid Cd in het milieu is enerzijds te wijten aan natuurlijk aanwezige achtergrond. Deze concentratie is in sommige delen van de wereld afhankelijk van de aard van het moedermateriaal waar de bodem uit ontstaan is. Anderzijds is er ook een deel aanwezig afkomstig van menselijke activiteit. De tijd dat deze concentratie in de bodem gehandhaafd kan blijven, hangt af van het blijven bestaan van de bron, al dan niet van menselijke oorsprong en van de retentietijd van Cd in de bodem. In het geval van Cd en de meeste andere metalen is de verblijftijd een gevolg van het samenspel van sorptie, uitloging en opname door planten. Deze drie processen worden sterk gecontroleerd door enkele chemische en fysische parameters, zoals de korrelgrootteverdeling, de pH en de cation exchange capacity (CEC) van de bodem.

### 1.1.1 Wat is cadmium?

Cd als zuiver metaal komen we in het dagelijkse leven zelden tegen, enkel in sommige oplaadbare batterijen wordt nu nog Cd gebruikt. Als legering met onder andere zilver, indium en selenium bewijst het zijn nut als regelstaaf in elke kernreactor.

$\text{CdCO}_3$	$1.8 \cdot 10^{-14}$
$\text{Cd(OH)}_2$	$4.5 \cdot 10^{-15}$
$\text{CdC}_2\text{O}_4$	$9 \cdot 10^{-8}$
$\text{CdS}$	$1 \cdot 10^{-27}$

**tabel 1: Oplosbaarheidsproducten van verschillende cadmiumzouten (Skoog et al., 1996)**

Voor de rest vindt men Cd(II) terug in minerale zouten, en dit is ook de vorm waarin men Cd het meest in de natuur zal tegenkomen. Deze zouten zijn meestal zeer goed oplosbaar in water; enkel de zouten in tabel 1 hebben een oplosbaarheidsproduct (Skoog et al., 1996). In de lucht vindt men Cd dikwijls terug verbonden aan fijne stofdeeltjes. Cd heeft voor zover men weet geen herkenbare smaak of geur.

### 1.2.3 Cadmium en gezondheid

Mensen kunnen Cd opnemen door het inademen van lucht, tijdens het eten of drinken en doorheen de huid. De efficiëntie van de opname is sterk afhankelijk van de blootstellingsroute, en is het hoogst bij opname door de longen, namelijk ergens tussen de 30 en de 60% (ATSDR, 1999). Slechts 5% van het Cd in onze voeding wordt door ons spijsverteringsstelsel opgenomen. Deze opname-efficiëntie wordt sterk beïnvloed door een aantal factoren zoals de dosis en de aanwezigheid van andere kationen.

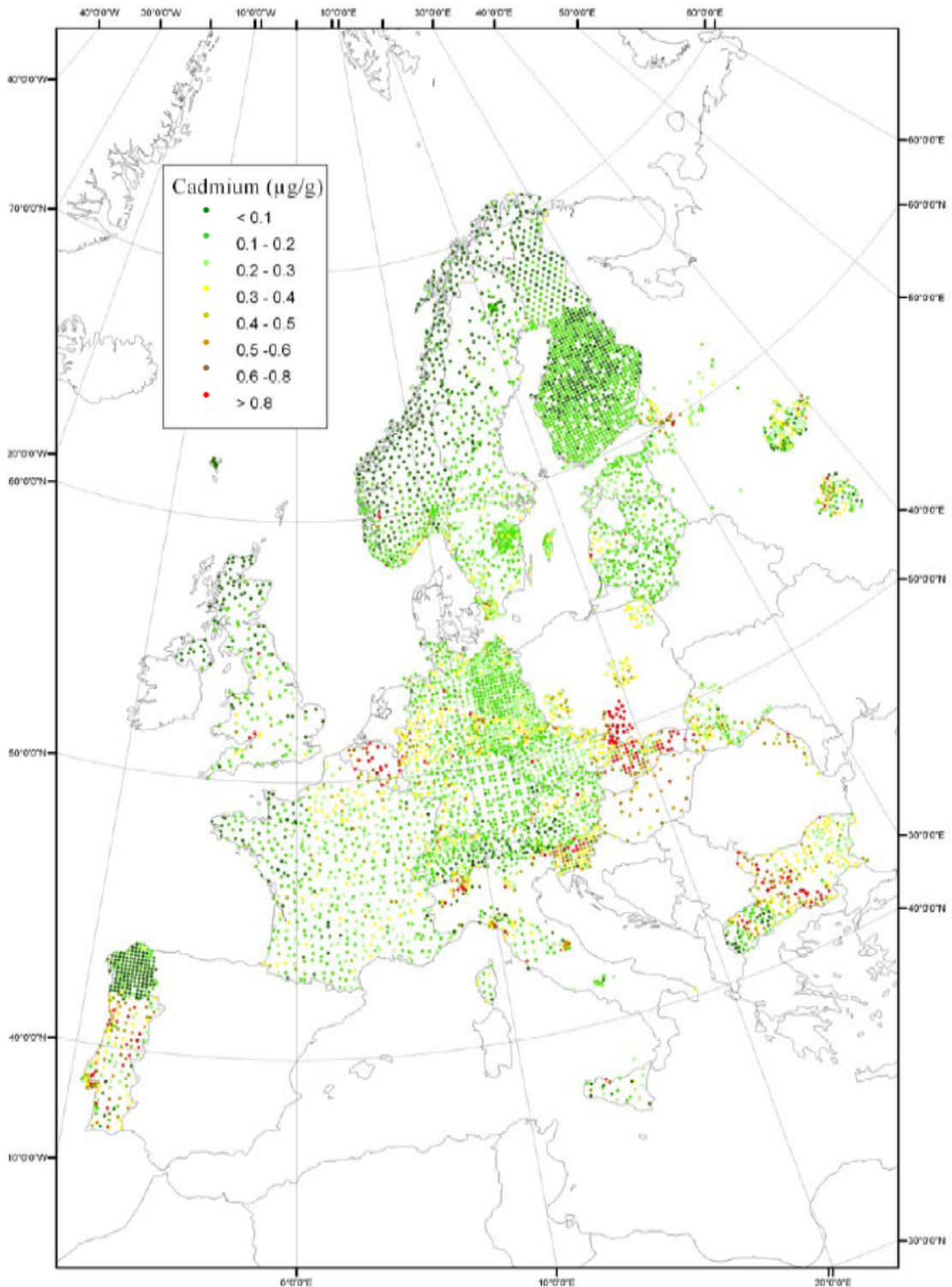
Na opname kan men Cd terugvinden in heel het menselijk lichaam. Het grootste deel komt echter voor in de nieren en de lever. Het Cd kan in de lever gebonden worden aan -SH-groepen van proteïnen. Deze complexen kunnen getransporteerd worden door de bloedstroom. Uiteindelijk verdwijnt Cd uit ons lichaam via de urine. De hoeveelheid Cd die zo het menselijk lichaam verlaat is een maat voor de totale hoeveelheid Cd die we tijdens ons leven hebben opgenomen (Staessen et al., 1999, Nawrot et al., 2006). Vanaf een dosis van 20 mg per kg lichaamsgewicht sterft de mens, al komt dit in de praktijk slechts zelden voor. De gevolgen van een acute vergiftiging merkt men na minder dan een uur en variëren tussen darmirritatie,

overgeven, buikkrampen, diarree, hoofdpijn, spierkrampen, uitputting en uiteindelijk dood. Vermits Cd in biologische systemen accumuleert (zgn. bioaccumulatie), worden vergelijkbare effecten vastgesteld als gevolg van lage dosissen op langere termijn. De effecten treden op wanneer de kritische dosis wordt overschreden (Wang en Foulkes, 1984).

Cd is toegevoegd aan de lijst met kankerverwekkende stoffen. Een recente studie uit Vlaanderen heeft aangetoond dat Cd één van de belangrijkste oorzaken van longkanker kan zijn. Deze studie betreft in een gebied waar de zinkverwerkende industrie er voor gezorgd heeft dat er veel Cd in de omgeving is vrijgekomen. De studie vergelijkt dit gebied met een gebied dat onvervuild gebied wat betreft Cd. Mensen zonder longkanker hadden 4,17 keer meer kans om 19 jaar later wel deze vorm van kanker te ontwikkelen in het vervuilde gebied (Nawrot et al., 2006)

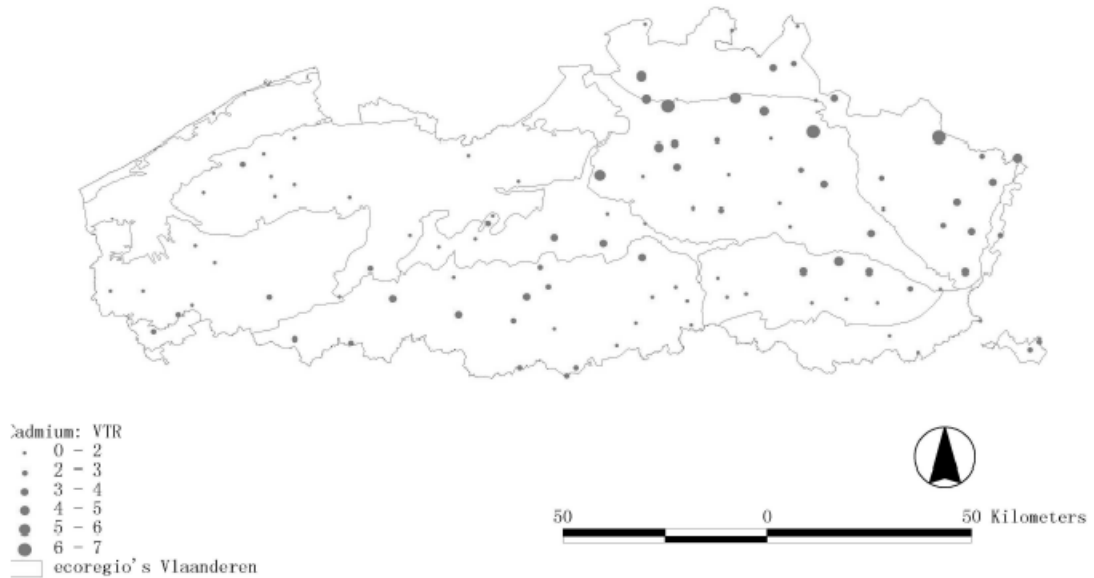
#### **1.2.4 Cadmium in Vlaanderen**

Als men de cadmiumvervuiling van Europa in kaart brengt aan de hand van de concentratie gemeten in mossen, merkt men een zwaar vervuilde gebied in België, zoals te zien in figuur 1. Andere sterk vervuilde gebieden zijn Slowakije en Bulgarije.



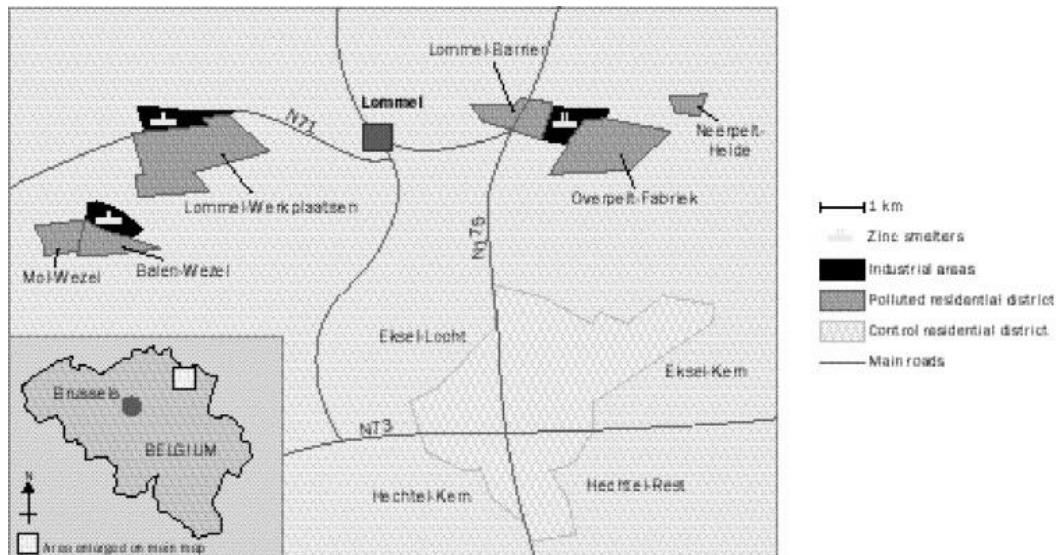
**figuur 1: Cadmiumgehalte in mosstalen uit heel Europa (UNECE ICP vegetation, 2003)**

De vervuiling in Vlaanderen werd in kaart gebracht door het MIRA, aan de hand van metingen van cadmiumgehalten in pissebedden. Deze kaart (figuur 2) laat duidelijk zien dat de Kempen vervuild zijn met Cd.



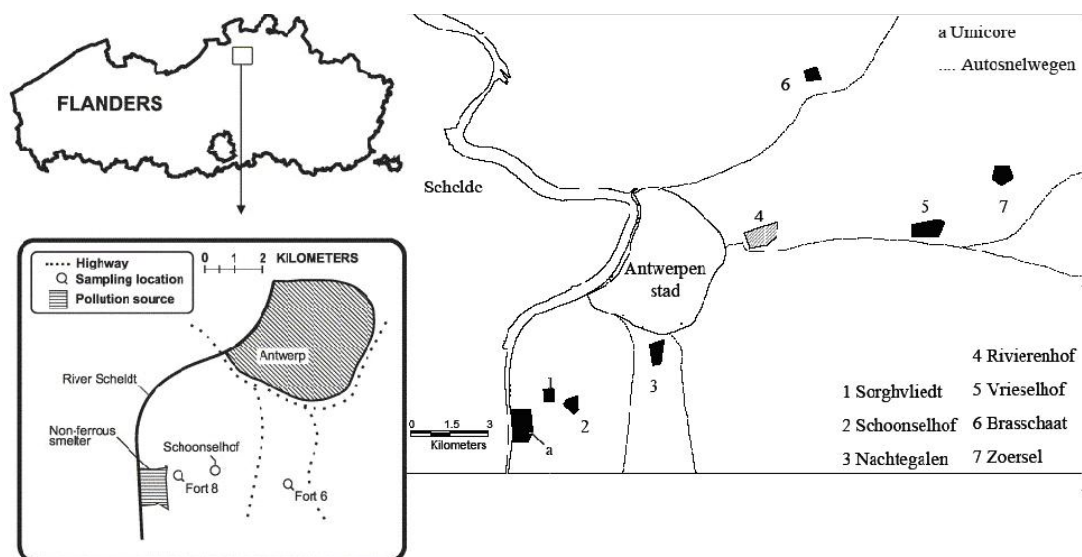
**figuur 2: Pissebedden zijn gekend om zware metalen te accumuleren, op vele plaatsen in Vlaanderen werden deze organismen gemeten en vergeleken met een referentiewaarde (MIRA-T 2005)**

Het best gekarakteriseerde gebied in Vlaanderen op het vlak van cadmiumvervuiling zijn de Noorderkempen (Vangronsveld et al., 1996). Deze zone is reeds jaren het onderwerp van fundamenteel en toegepast onderzoek. De vervuilde regio beslaat 6 delen van de gemeenten Balen, Lommel en Overpelt (figuur 3). De vervuiling in deze regio was afkomstig van een zinksmelter in Lommel. Deze smelter werd echter reeds gesloten in 1974. De productie van Cd in Balen is stopgezet in 1992, deze in Overpelt pas in 2002. Het is duidelijk dat het gebied rond de zware metaalindustrie, nog steeds dermate vervuild is, dat er een risico is voor de volksgezondheid (Staessen et al., 1999, Nawrot et al., 2006).



figuur 3: De zinksmelter en de vervuilde gebieden rond Lommel (Nawrot et al., 2006).

Een andere omgeving waar Cd in hoge mate wordt teruggevonden in de bodem, is de omgeving van Hoboken, nabij Antwerpen (figuur 4). De studies die in deze omgeving zijn uitgevoerd, zijn meestal uitgegaan van een gradiënt vertrekkende van de non-ferro-industrie in Hoboken. Niet ver van deze plaats staat, in Wilrijk, nog een afvalverbrandingsoven (Staessen et al., 2001). Bij bosmuizen werd aangetoond dat er naarmate de afstand tot de smelter afneemt, de concentratie Cd in de lever toeneemt. Ook werden effecten op het immuunsysteem gelinkt aan de hoeveelheid Cd bij deze muizen (Tersago et al., 2004).



figuur 4: De regio ten zuiden van Antwerpen is vervuild met Cd (Tersago et al., 2004 en D'Havé et al., 2005)



Koolmezen werden onderzocht op 4 plaatsen op verschillende afstand van de smelter in Hoboken. Het broedsucces bleek in sterke mate toe te nemen met de afstand tot de smelter (Janssens et al., 2003). Zo werd deze pollutiegradiënt ook gebruikt om een verband te leggen tussen de concentratie zware metalen in bodemstalen en de concentratie in haren en stekels van de Europese egel (D'Havé et al., 2005). Verdere studie heeft aangetoond dat de stekels een goede maat zijn voor het cadmiumgehalte in de lever, de spieren en de nieren van de Europese egel (D'Havé et al., 2006).

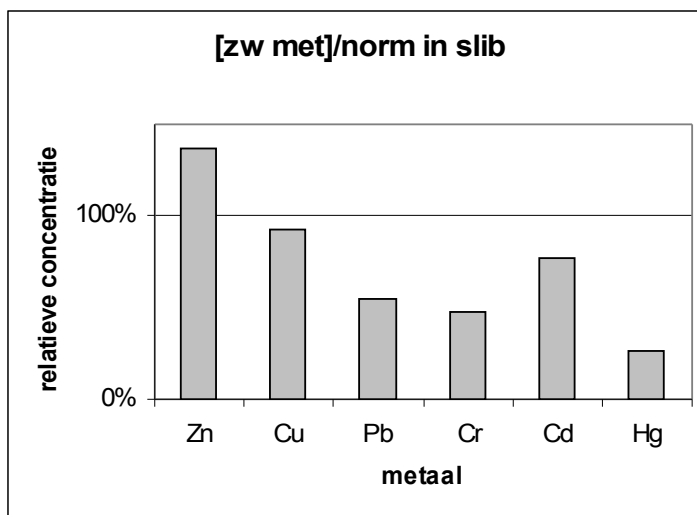
### **1.2.5 Bronnen van cadmium**

Geschat wordt dat er elk jaar tussen de 25 000 en de 30 000 ton aan Cd wordt vrijgegeven aan het milieu. Ongeveer de helft daarvan als gevolg van de erosie van rotsen door rivieren, deze Cd komt uiteindelijk in de oceanen terecht. Vulkaanuitbarstingen en grote bosbranden zorgen er mee voor dat er Cd in de lucht aanwezig is. Ook menselijke activiteiten hebben een zeer grote impact op de vrijgekomen hoeveelheid Cd. Tussen de 4 000 en de 13 000 ton zou immers uit menselijke activiteiten voorkomen. De voornaamste vervuiling is afkomstig van de mijnindustrie, het verkeer, de metaalverwerkende nijverheid, landbouw (Nriagu en Pacyna, 1988) en alle plaatsen waar men fossiele brandstoffen verbrandt, met inbegrip van de afvalverbrandingsovens (ATSDR 1999). De hoeveelheid Cd die in het milieu terecht komt door lozing van afvalwater is minimaal, gezien er hier strenge normen bestaan voor Cd.

De concentratie aan Cd in onvervuilde bodems neemt typische waarden aan tussen de 0,06 en de 1,1 mg per kg (McGrath et al., 1994). De belangrijkste bron die ervoor zorgt dat er Cd op en in de bodem aanwezig is, is de depositie vanuit de lucht. De concentratie aan Cd die we in de lucht aantreffen varieert tussen de 0,1 en de 4 ng per m<sup>3</sup> in landelijke gebieden, deze is hoger in steden met concentraties variërend tussen de 2 en de 150 ng/m<sup>3</sup>. De cadmiumhoudende partikels kunnen afhankelijk van de weersomstandigheden tot 4 weken in de lucht rondzweven. Cd zelf is chemisch gezien weinig reactief ten opzichte van de andere componenten en pollutanten in de lucht. De depositie van deze partikels op de bodem is sterk afhankelijk van enkele klimatologische parameters, zoals neerslag, windsnelheid en windrichting. Indien men de plaats van de bron weet, en rekening houdt met de verdeling van de windrichting en -snelheid, is het mogelijk om een goede schatting te maken van de

cadmiumconcentratie in de bodem rondom de bron. Deze dispersies kunnen eventueel gebruikt worden om terug te rekenen van de vervuiling naar de bron. Cd heeft de eigenschap om aan de kleinere partikels te binden en deze hebben de neiging om verder verspreid te worden.

De bodems kunnen ook op andere manieren vervuild geraken dan door partikels uit de atmosfeer. Cd kan immers als contaminant aanwezig zijn in meststoffen. Kunstmest op basis van fosfaat kan tot 300 µg Cd per g bevatten, die op basis van stikstof of kalium zijn doorgaans minder rijk aan Cd. De oorzaak ligt bij de rotsen die men gebruikt om de fosfaten te ontginnen (ERM 2000). In België was de inbreng aan Cd in 1998 door meststoffen op basis van fosfor gelijk aan 1,06 g per ha. De waarde was lager in de polders en hoger in de Condroz (Guns en Pussemier, 2000).



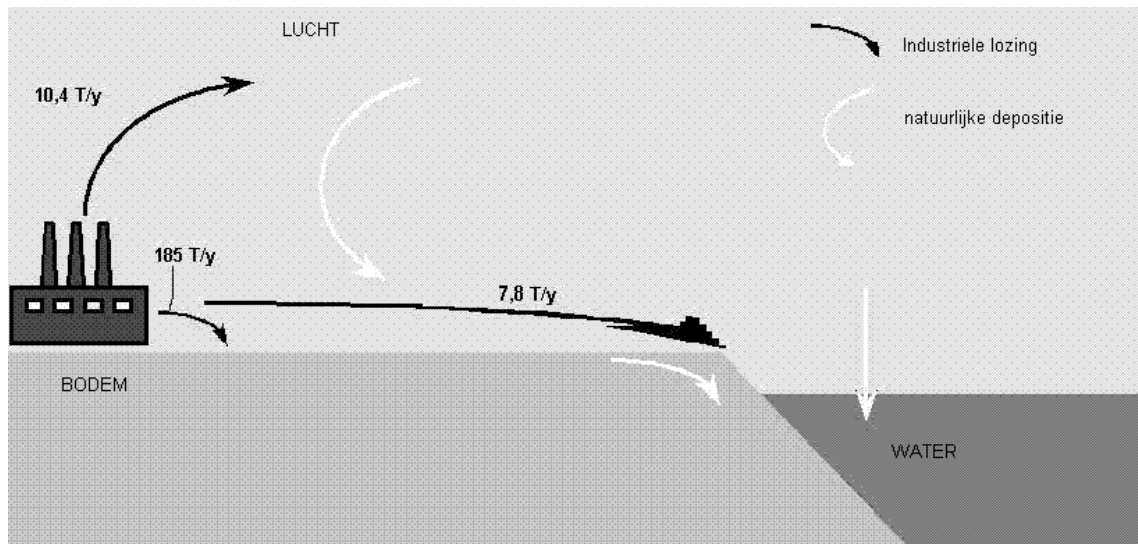
**figuur 5: Gehalte aan zware metalen in slib vergeleken met de Vlaamse normen (Zn: 900; Cu: 375; Pb: 300; Cr: 250; Cd: 6; Hg: 5 mg/kgDS) (naar Baeyens en Van De Steene, 2005)**

Ook slib uit waterzuiveringsinstallaties bevat een hoge cadmiumbelasting. Slib werd vroeger zeer veel toegepast als bodemverbeteraar. Door de unieke samenstelling ervan worden de nutriënten slechts zeer geleidelijk afgegeven aan het milieu en problemen van vermisting kunnen zo vermeden worden. Bijkomend voordeel is dat er zeer veel slib wordt gevormd en het dus een zeer goedkope meststof is. Er is echter één belangrijk nadeel; bij de behandeling van afvalwater wordt gestreefd naar zo laag mogelijke effluentconcentraties voor alle stoffen. Deze vervuiling moet wel ergens naar toe, en vooral de zware metalen worden in het slib mee opgenomen zoals men kan zien in figuur 5 (Vlaamse overheid 1997, Dewil et al., 2005). Cd kan op veel manieren in het afvalwater terecht komen: door industriële processen, door gebruik van cosmetische producten (crème) in het huishouden en door regen die het Cd van de

bodem afspoelt naar de riolen. Tegenwoordig zijn de normen voor slib dat men wil gebruiken op landbouwgronden zo strikt, dat er bijna geen slib meer wordt verwerkt op deze methode. De cadmiuminput via deze weg is verwaarloosbaar geworden: in 1998 was deze al kleiner dan 0,01 g per ha (Guns en Pussemier, 2000). Voor de slibverwerking moet men op zoek naar alternatieven, zoals verbranding of verwerking. Deze processen moeten echter ook nauwgezet worden nagekeken, want anders komt het Cd alsnog via een andere blootstellingsroute in het milieu terecht.

De afzet van slib naar de landbouw kan in de nabije toekomst terug stijgen. Recent onderzoek heeft immers aangetoond dat verschillende technieken er voor zorgen dat het slib minder zware metalen bevat. Thermische hydrolyse en Fenton's peroxidatie zorgen ervoor dat de zware metalen minder in gebonden toestand voorkomen. De vraag is of deze methoden economisch haalbaar zijn, maar ze bieden ook enkele bijkomende voordelen, zoals vergemakkelijking van het drogen en het afscheiden van de zware metalen. Deze laatste komen terecht in het filtraat, behandeling hiervan geeft een reductie van de hoeveelheid zwaar vervuild slib (Dewil et al., 2005).

Het gebruik van mest van dierlijke oorsprong levert nog steeds een bijdrage aan de bodemvervuiling. De dieren krijgen Cd binnen via de voeding, en de fecaliën komen al dan niet als dierlijke mest op de bodem terecht. De totale hoeveelheid die via deze weg de bodem bereikt was in 1998 1,32 g per ha.



**figuur 6: Overzicht van de voornaamste routes die Cd kan volgen met de emissies in België (naar Plasman en Verreert, 1992)**

### 1.2.6 Cadmiumaccumulatie

In waterige omstandigheden is Cd, in vergelijking tot andere zware metalen zeer mobiel, zoals men kan afleiden uit de oplosbaarheidsproducten in tabel 1. De biobeschikbare fractie cadmium (het deel dat in het betrokken biologisch systeem kan worden opgenomen) is dan ook zeer groot. Cd die niet biobeschikbaar is, kan niet worden opgenomen door planten, micro-organismen en dieren en is ook niet toxisch voor het organisme.

Verskillende factoren beïnvloeden de biobeschikbaarheid van Cd, en dus ook het ongebonden voorkomen van Cd. Ten eerste de pH, in minder zure milieu's daalt de biobeschikbaarheid. Uiteraard speelt zure regen hierin een belangrijke rol. Ten tweede kan de aanwezigheid van organische componenten de biobeschikbaarheid doen dalen. Deze sorptie-eigenschappen zijn niet altijd even simpel te karakteriseren, omdat ze vooral afhankelijk zijn van de aard van het organisch materiaal. Het neergeslagen en het geadsorbeerde Cd zijn niet onschadelijk, vermits deze processen reversibel zijn.

De organische verbindingen blijken beter in staat om het Cd blijvend vast te houden. De beschikbaarheid voor biologische activiteit kan dus zeer laag blijken.

Ook de speciatie van Cd is een zeer belangrijk gegeven, dit is de verdeling tussen alle mogelijke verbindingen die Cd kan aangaan in het milieu, en in welke mate Cd gebonden is aan andere elementen. De mobiliteit van metalen is immers sterk afhankelijk van deze vorm van voorkomen in de bodem. Dit kan zijn: vrij, gebonden aan de mineralen, organisch gebonden, neergeslagen of verwerkt in de basisstructuur van silicaatmineralen. Het evenwicht tussen de vormen wordt vooral beïnvloed door de pH en de redoxpotentiaal. Het is voornamelijk ongebonden Cd dat efficiënt door planten kan worden opgenomen en dus de voedselketen zal binnendringen. Bovendien blijft 90% van het Cd in bodems achter in de eerste 15 cm van de bodem(ATSDR, 1999). Dit is juist de wortelzone van vele planten.

“De onderkant van het gras bekijken.”

(R.W. Calis)

### **1.3 Cadmium in planten**

Dat Cd toxische effecten heeft op planten en andere organismen is niet nieuw (Das et al., 1997). Er is reeds veel werk verricht om de opname bij verschillende planten te meten. De productie van fytochelatines (zie 1.2.1), die mogelijk een rol spelen in de tolerantie ten aanzien van Cd is een belangrijk aandachtspunt. Verder wordt ook onderzoek verricht naar andere invloeden van Cd op planten: belangrijk om te vermelden zijn de inhibitie van de groei, de invloed op de anti-oxidantia, de invloed op de fotosynthese en de mogelijke aanwezigheid van bepaalde eiwitten die een invloed kunnen uitoefenen op de cadmiumhuishouding.

#### **1.2.1 Cadmiumopname door planten**

Een studie in Vojvodina (Servië) toont aan dat er een verband bestaat tussen de hoeveelheid Cd in de lucht en de hoeveelheid Cd die men meet doorheen de voedselketen (bodem, veevoeder, melk) (Vidovic et al., 2005). In Brazilië werden verschillende kruiden die voor geneeskundige doelen worden gebruikt, getest op gehalte aan bepaalde zware metalen. Voor Cd werd de norm nergens overschreden (Caldas et al., 2004). Zo werden er nog regioafhankelijke studies opgezet. Het Cadmiumgehalte werd onderzocht in rijst, bestemd voor consumptie, uit verschillende delen van de wereld. De gehalten varieerden van 0,88 ng/g tot 133,2 ng/g (Watanabe et al., 1996).

De opname van de planten doorheen hun wortels is functie van de biobeschikbaarheid van de stof. De opname gebeurt zowel via een symplastische als apoplastische weg en meestal in competitie met essentiële metaalionen. Planten kunnen de opname regelen door het afscheiden van chelerende moleculen zoals fytochiderofofen, metallothionines of fytochelatines. Avenine is een fotosydeerofoor dat afgescheiden wordt door grassen om koper, zink en mangaan uit de bodem op te nemen in geval van een tekort hieraan. Methallothionines zijn eiwitten die metalen kunnen binden. Fytochelatines worden gesynthetiseerd met de aminozuren Glutamyl (Glu) en cysteïne (Cys), de structuur heeft de volgende vorm:  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  met n tussen 2 en 11 (Cobbett, 2000). Planten kunnen ook metaalreducerende enzymen aanmaken. Er is reeds aangetoond

dat planten met een ijzertekort de onmiddellijke omgeving zal kunnen aanzuren (Crowley et al., 1991).

Cd zal voornamelijk met het water mee getransporteerd worden doorheen de plant, zoals andere ionen. De opname van Cd kan gebeuren via de calciumkanalen (White, 2000), omdat de twee elementen opvallende chemische gelijkenissen vertonen zoals men kan zien in figuur 7. De covalente straal -dit is de gemiddelde halve afstand van een atoom tot aan ander atoom in een verbinding- van Cd en Calcium (Ca) zijn respectievelijk 141,3 pm en 173,6 pm. Het Cd kan zo gemakkelijk de cel binnendringen met als gevolg dat de cel Ca zal afgeven, In huidmondjes kan deze lagere calciumconcentratie voor een sluiting van de mondjes zorgen (Perfus-Barbeoch et al., 2002). De CO<sub>2</sub> -opname in de planten zal dalen, bijgevolg dus ook de koolstofassimilatie.

Cadmiumopname werd onderzocht in verschillende plantensoorten. Er blijkt een verschil te zijn tussen *Triticum turgidum* (durum) en *Triticum aestivum* (brood). De tweede bleek meer Cd te accumuleren, en dit zou te wijten zijn aan een verschil in apoplastische bindingscapaciteiten. De opname in de symplast bleek via een carriër te verlopen:  $K_M$  20-40 nM en  $V_{max}$  26-29 nmol/gFW/h (Hart et al., 1998). Bij *Thlaspi caerulescens* werd aangetoond dat Cd in de wortels zowel in de cel als in de apoplast voorkomt, terwijl men in bovengrondse delen het metaal enkel terugvond in de vacuolen (Wójcik et al., 2005b). Er is ook fysiologisch bewijs geleverd dat er een Cd transporter aanwezig zou zijn in sommige ecotypes van *Thlaspi caerulescens* (Lombi et al., 2000).

De normen voor Cd in voedsel zijn vastgelegd in een koninklijk besluit van 2 december 1991. Granen mogen slechts 0,15 ppm Cd bevatten, bladgroenten 0,2 ppm en plantaardig dierenvoeding 1 ppm. Voor verschillende voedselgewassen werden correlaties vastgesteld tussen de bodemconcentraties en de concentratie die men terugvindt in de planten (Seuntjens, Vanderborght, 2004). De bioconcentratiefactor (BCF) of bioaccumulatiecoëfficiënt kan als volgt bepaald worden:

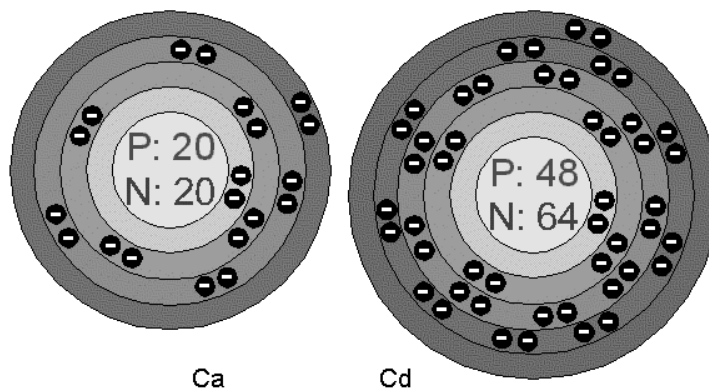
$$\log(BCF_{Cd(aardappel)}) = -0,57 - 0,72 \log(Cd(bodem))$$

$$\log(BCF_{Cd(wortel)}) = 0,54 - 0,75 \log(Cd(bodem)) - 0,12 pH(KCl)$$

$$\log(BCF_{Cd(sla)}) = 1,53 - 0,44 \log(Cd(bodem)) - 0,19 pH(KCl)$$

$$\log(BCF_{Cd(selder)}) = 1,30 - 0,50 \log(Cd(bodem)) - 0,20 pH(KCl)$$

De accumulatie in rijst werd gecontroleerd op interactie met nutriënten. Positief gecorreleerde opnames werden gevonden in combinatie met ammonium, Fe, Zn en Cu (Chien et al., 2000, Liu et al., 2003).



figuur 7: De atoomstructuur van cadmium en calcium, beide atomen hebben 2 atomen op de buitenste schil

### 1.3.3 Tolerantie en fysiologische gevolgen

Net zoals cadmium gevolgen heeft voor de fysiologie van mens en dier, zal het ook invloed uitoefenen op deze van planten. In *Pisum sativum* werd vastgesteld dat Cd **oxidatieve stress** veroorzaakt, een verhoogd gehalte aan waterstofperoxide werd gemeten in zowel wortels als stengels na een behandeling van 4 en 40  $\mu\text{M}$  Cd (Dixit et al., 2001). De effecten worden onder andere toegewezen aan een vermindering in catalase activiteit (Sandalo et al., 2001). Ook in *pinus sylvestris* werden soortgelijke effecten vastgesteld. De toename van waterstofperoxide in dit systeem zou te wijten zijn aan een inhibitie van het antioxidatieve systeem (Schützendübel et al., 2001). Deze effecten worden ook waargenomen in rijst, al werd evenwel een toename in catalase-activiteit waargenomen bij een behandeling met 100  $\mu\text{M}$  Cd, tegenover een afname bij 500  $\mu\text{M}$  (Shah et al., 2001). Bij *Phragmites australis* werd reeds een reductie in de activiteit van de enzymen die instaan voor de antioxidatieve respons vastgesteld bij 50  $\mu\text{M}$  en na 21 dagen (Iannelli et al., 2002). Bij deze antioxidatieve respons zijn twee moleculen van groot belang, namelijk ascorbaat (ASC) en



gluthathion (GSH) (May en Leaver, 1993, Horemans et al., 2000, De Bock, 2004), deze moleculen moeten reactieve zuurstof species onschadelijk maken. ASC wordt vooral geregenereerd met behulp van GSH (Foyer en Halliwell, 1976, Noctor en Foyer, 1998), maar dit is niet de enige mogelijkheid voor ASC-reductie (Potters et al., 2004).

Cd kan ook problemen veroorzaken ten nadele van de werking van de **fotosynthese** (Clijsters en Van Assche, 1985). Bij *Phaseolus coccineus* daalt de activiteit van fotosysteem II meer naarmate de blootgestelde plant ouder was, wanneer deze werd blootgesteld aan Cd. In *Phragmites australis* werd, weer bij 50  $\mu\text{M}$  Cd, het chlorofylgehalte gemeten. Dit daalde met 30 %, wat men ook terugvond in de fotosyntheseactiviteit (Pietrini et al., 2003). Bij *Pisum sativum* werden soortgelijke effecten vastgesteld, evenredig met de concentratie Cd die hier werd aangebracht na één maand, namelijk van 0 tot 10 mM Cd. Indien men deze stress langer aanhield zag men nog een extra afname van het chlorofylgehalte en de fotosyntheseactiviteit. Bij lagere dosissen van 0,1 mM zag men enkel een invloed op fotosysteem II, terwijl de hogere dosissen ook een invloed hadden op fotosysteem I (Kumar Chugh en Kumar Sawhney, 1999).

Vele plantensoorten hebben een methode om deze Cd onschadelijk te maken met behulp van **fytochelatines (FC)**. De complexen die gevormd worden tussen Cd en FC kunnen op een efficiënte manier naar de vacuole getransporteerd worden, waar het Cd onschadelijk is voor de plant (Ortiz et al., 1995). *Vigna angularis* is een hypergevoelige plant en is niet in staat om zelf FC te produceren (Inouhe et al., 2000). De extreem tolerante *Thlaspi caerulescens* is een plant die op het gebied van zware metalen veel is onderzocht. Er werd aangetoond dat Cd, de fytochelatineproductie kan beïnvloeden, maar deze bevindingen werden niet teruggevonden in veldstudies. De bijdrage van FC ten aanzien van de tolerantie in *Thlaspi caerulescens* is dus gering (Wójcik et al., 200ba). Dit GSH is een basismolecule voor de productie van FC (Rauser, 1995), stijging van de concentratie FC heeft een daling van de concentratie GSH tot gevolg, bijgevolg wordt het antioxidatieve systeem verzwakt.

"Het is vaak heerlijk rusten in het gras dat je ergens over hebt laten groeien."  
(Cees Buddingh)

## 1.4 Saneren van zware metalen in de bodem

Het is interessant om na te gaan welke technieken er reeds aangewend worden met het oog op het saneren van bodems. Belangrijke parameters om de technieken onderling te vergelijken zijn uiteraard de kostprijs, de tijdsduur, en het rendement. Een hoger rendement betekent in dit geval een lagere hoeveelheid van de aanwezige zware metalen die nog achterblijft in de vervuilde bodem. Belangrijk is ook om te weten hoe laag men kan gaan in absolute concentratie. Men zal merken dat het voor bepaalde technieken zeer lastig is om de normen voor Cd te halen omdat, hoewel dit een zwaar metaal is, de normen hiervoor zeer streng zijn in vergelijking met sommige andere zware metalen. Dit is uiteraard omdat Cd in veel lagere concentraties toxisch is gebleken.

Normen		Arseen	Cadmium	Chroom	Koper	Kwik	Lood	Nikkel	Zink
Achtergrondwaarden		19	0,8	37	17	0,55	40	9	62
Grondverzet toegestaan in type I	klasse 1								
Grondverzet toegestaan in type I, II, III, IV, V	klasse 2	27	1,2	78	109	1,5	120	55	300
Bodemsaneringsnormen voor									
type I of II	klasse 3	45	2	130	200	10	200	100	600
type III	klasse 4	110	6	300	400	15	700	470	1000
type IV	klasse 5	200	15	500	500	20	1500	550	1000
type V	klasse 6	300	30	800	800	30	2500	700	3000

*Hoofdfuncties voor de bestemmingstypen: Type I = natuur/bos/vallei/groen of kwetsbaar voor grondwater; type II = landbouw; type III = bebouwing; type IV = recreatie; type V = industrie. Een volledige lijst is terug te vinden in OVAM, 2002.*

**tabel 2: Bodemsaneringsnormen in Vlaanderen (Vlaamse Overheid 1996)**

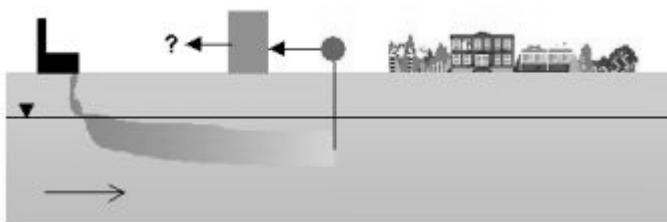
Hieronder volgt een algemeen overzicht van de bodemsaneringstechnieken met de nadruk op de technieken die kunnen worden toegepast voor zware metalen (De Lembre 1999; Geuens 2002).

Men maakt een onderscheid tussen enerzijds technieken die tot doel hebben de verontreiniging te verwijderen of te vernietigen, en anderzijds de technieken die de verspreiding van de verontreiniging proberen tegen te gaan of alleszins te beperken. De technieken kunnen zich beperken tot het aanpakken van enkel de verontreinigingsbron, kunnen de vervuilde bodem als geheel aanpakken (zowel in situ

als ex situ) of kunnen beogen om de bron te isoleren van de rest van het milieu. De keuze van de beste techniek hangt in grote mate af van verschillende eigenschappen van de pollutant: de vluchtigheid, de oplosbaarheid, de adsorptie-eigenschappen, de biodegradeerbaarheid, de chemische afbraakmogelijkheden. Uiteraard is het type bodem dat moet gesaneerd worden ook van groot belang. De belangrijkste parameters zijn hier de pH, de CEC, het gehalte organisch materiaal en de korrelgrootteverdeling. Ook kunnen de combinatie van vervuilingen, of het voorkomen van gebouwen van grote invloed zijn. De eerste optie waarnaar wordt gestreefd is uiteraard steeds het definitief verwijderen van de verontreiniging. Wanneer dit niet mogelijk blijkt, zal men naar immobilisatietechnieken overstappen. Verder dient te worden bepaald of er in situ gewerkt kan worden, of men zal moeten afgraven.

### 1.3.1 In situ-technieken

Bij **pump and treat** komt het erop neer dat er vervuild grondwater zal opgepompt worden. Het doel kan zijn om de microbiële activiteit, die er voor zorgt dat organische vervuilingen worden omgezet, te stimuleren door de circulatie, maar het wordt ook als extractieprocedure zeer vaak toegepast. De methode kan gebruikt worden voor alle wateroplosbare verontreinigingen. Zware metalen kan men enkel extraheren, want deze zijn uiteraard niet biodegradeerbaar. Indien men niet enkel water onttrekt, maar ook water infiltreert, kan de procedure versneld worden, zeker als men aan het infiltratiewater ook nog chemicaliën (zuur, basen, chelatoren) toevoegt, die er voor zorgen dat de oplosbaarheid van bijvoorbeeld de zware metalen wordt verhoogd.

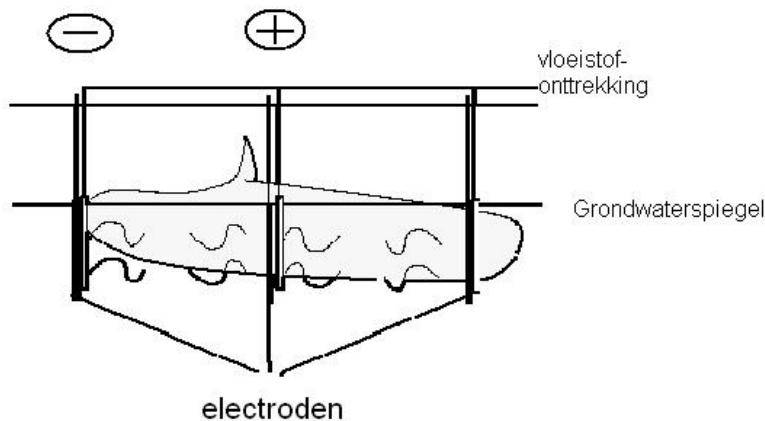


figuur 8: Schema van pump and treat (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001)

Men gebruikt ook technieken op basis van lucht of stoom. De voornaamste is **bodemluchtextractie** of ook wel luchtstrippen. Men richt zich vooral op de vluchtige componenten. Door toevoer van lucht worden ook de aëroob afbreekbare pollutanten aangepakt. Door gebruik te maken van stoom kan men ook minder vluchtige componenten verwijderen. De onttrokken damp moet achteraf nog behandeld worden.

Bij het vergelijkbare **Bioventing** wordt extra zuurstof in de bodem geblazen, waardoor opnieuw microbiële activiteit wordt gestimuleerd. Deze techniek wordt enkel toegepast voor het verwijderen van biologisch afbreekbare componenten. Voor de verwijdering van zware metalen komen deze technieken echter niet in aanmerking

**Elektroreclamatie** komt wel in aanmerking voor het verwijderen van zware metalen. De techniek is zelfs toepasbaar in slecht doorlaatbare bodems. Voorwaarde is dat de vervuiling als ion voorkomt in de bodem. Er wordt een spanningsveld in de bodem aangelegd, geladen deeltjes worden nu naar een van de twee polen getrokken. Het bodem water met de daarin opgeloste deeltjes wordt rond de elektroden geconcentreerd en kan worden afgevoerd om behandeld te worden. Zuren kunnen de mobiliteit nog verder bevorderen.



figuur 9: Schema van elektroreclamatie (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001)

**Fytoremediatie** maakt gebruik van hogere planten om de vervuiling te reduceren. Hierbij gaan de planten de pollutanten opnemen, omzetten of immobiliseren. De techniek kan zowel in situ als ex situ worden toegepast. Deze methode is geschikt voor zware metalen omdat sommige planten deze kunnen accumuleren. In het volgende hoofdstuk gaan we dieper in op alle mogelijkheden. De methode is uiteraard enkel toepasbaar wanneer de intensiteit van de vervuiling niet toxisch is voor de plant.

### 1.4.3 Ex situ-behandeling

Deze techniek gaat in principe steeds samen met het afgraven van de bodem. Men kan dan wel de keuze maken om de afgegraven grond on site te behandelen, dit wil zeggen ter plaats of deze grond eerst af te voeren naar gespecialiseerde behandelingseenheden. In het laatste geval spreekt men van off site technieken.

Bij **Drijf laagverwijdering** komt het erop neer dat men de grond afgraaft tot op de watertafel en dan de drijf laag, die nu bloot ligt, afvoert. De methode komt niet in aanmerking voor het verwijderen van zware metalen.

**Grondverwerking** is toepasbaar wanneer de vervuiling zich in de afgegraven grond bevindt. Deze techniek is uiteraard nog verder op te splitsen. Bij thermische reiniging zal men de grond na zeven verwarmen tot 600 °C. De gassen die nu ontsnappen, worden nog verder behandeld op 1200 °C. De kostprijs van de thermische behandeling kan hoog oplopen door de hoge energiekosten. De methode is geschikt voor organische pollutie. Zware metalen kunnen niet op deze wijze behandeld worden

*Extractieve reiniging* is net zoals de in situ variant voor vele verontreinigingen toepasbaar, onder andere zware metalen. Het voordeel van deze techniek hier is de mogelijkheid om de bodem intensief in contact te brengen met het extractiemiddel, meestal water. De bodem kan nadien ontwaterd worden volgens de traditionele methodes uit de waterzuivering en de slibbehandeling. Het is nu het water dat verder behandeld zal moeten worden.

De afgegraven grond kan ook dankzij microbiële activiteit gereinigd worden, al komen uiteraard enkel biologisch afbreekbare componenten hier voor in aanmerking. Een veelvuldig toegepaste methode is *land farming* waarbij men de micro-organismen stimuleert door omwoelen van de grond.

*Immobilisatie* is een techniek waarbij men chemische en/of fysische methoden gaat gebruiken om ervoor te zorgen dat de verontreiniging zich niet meer kan verplaatsen. Afgegraven grond die zo behandeld wordt kan achteraf gestort worden. Het is mogelijk om zware metalen te immobiliseren. *Vitrificatie* is een behandeling waarbij de temperatuur wordt opgedreven tot boven de 1500 °C. Bij deze temperatuur wordt zand omgezet tot glas, de bodem zal dus een glasachtige structuur krijgen. Bijgevolg heeft men nu een chemisch stabiel product.

Fytoremediatie is ook toepasbaar op afgegraven grond, maar de techniek komt in een volgend hoofdstuk nog uitgebreid aan bod. De laatst mogelijke uitweg voor afgegraven grond is deze rechtstreeks te gaan storten, belangrijk is dat men deze stortplaats isoleert. Zo mag er geen uitloging plaatsvinden, eveneens moet men de gevormde gassen opvangen en behandelen.

### 1.3.4 Waterbehandeling

De behandeling van opgepompt grondwater kent geen grote verschillen met de behandelingen die we kennen in de waterzuiveringsinstallaties van bedrijven of de rioolwaterzuiveringsinstallaties van Aquafin. We gaan niet verder in hoe men organische of vluchtige pollutanten zal behandelen in de grondwaterbehandeling. Zware metalen kunnen niet biologisch verwijderd worden. Men heeft dus andere technieken nodig. De techniek die meestal wordt toegepast is gebaseerd op de oplosbaarheid van zware metalen. Bij hogere pH zullen immers metaalhydroxides gevormd worden. Deze hebben geen lading en zullen neerslaan. De achtergebleven vloeistof kan zo aan een hoog rendement gezuiverd worden. Bij sommige zware metalen zoals chroom en zink kan bij een te hoge pH de oplosbaarheid terug toenemen door vorming van negatieve geladen moleculen. Naast toevoegen van hydroxideionen met sterke basen, kan men ook andere stoffen zoals fosfaten en zelfs sulfiden aan het water toevoegen om zo specifieker of beter bepaalde metalen te verwijderen.

### 1.4.4 Beheersingstechnieken

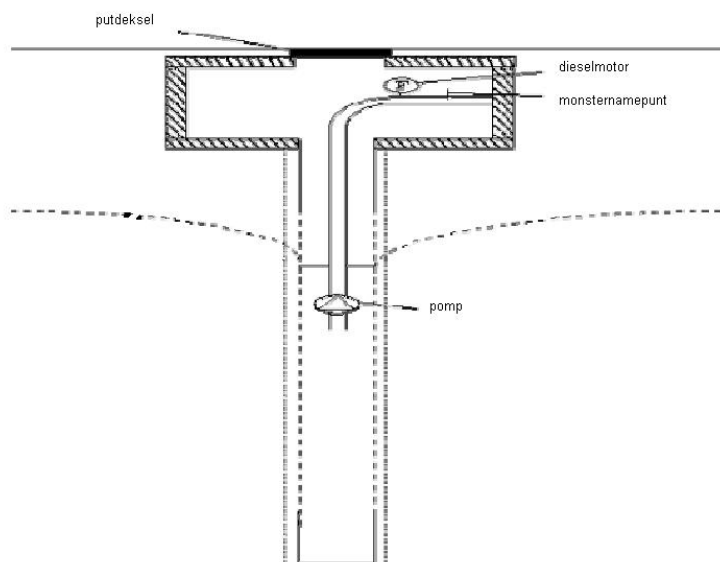
Beheersingstechnieken hebben nooit tot doel de verwijdering onmiddellijk weg te nemen. Ze zijn er op gebaseerd om de schade voor het milieu binnen de perken te houden.

**Active wall** is een techniek waarbij er een scherm wordt aangelegd loodrecht op de grondwatertafel. In dit scherm is een opening voorzien waardoorheen alle stroming geconcentreerd wordt. Deze stroming kan op verschillende mogelijke wijzen behandeld worden. Met een wateronttrekkingssysteem kan de procedure nog versneld worden. Deze techniek is toepasbaar voor zware metalen. De verspreiding van de vervuiling wordt gecontroleerd.

**Civiltechnische beheersing** kan op verschillende manieren worden toegepast. Men onderscheidt horizontale afdichtingslagen en verticale wanden. De eerste zorgen ervoor dat er geen infiltratie naar het grondwater kan plaatsvinden, en ook kwel, stroming van beneden naar boven, wordt tegen gehouden. Men spuit een mengsel,

voornamelijk bentoniet en cement, eventueel gemengd met polymeren, onder de verontreiniging. Waardoor de korrelstructuur van de bodem wijzigt en de doorlaatbaarheid aanzienlijk daalt. Verticale wanden kunnen uit verschillende materialen vervaardigd worden. Het kritische punt is de koppeling van de wand aan een dieper in de bodem gelegen slecht doorlatende grondlaag. Indien er geen slecht doorlatende laag aanwezig is, of wanneer er nog een speling is tussen de verticale wand en deze laag heeft deze techniek weinig effect.

Met **hydrogeologische beheersing** bedoelt men het onttrekken van water met deepwell's, drains of vacuümfilters. Een deepwell is een vertikaal boorgat waarin een stijgbuis, onderaan geperforeerd en voorzien van filtermateriaal, wordt gestoken. In de stijgbuis bevindt zich een onderwaterpomp. De drain is gelijkaardig aan de deepwell, alleen wordt deze horizontaal in de bodem geplaatst. De drain kan ook gebruikt worden voor bodemluchtextractie. Vacuümpompen worden gebruikt om een onderdruk aan te leggen en het grondwater doorheen het filtermateriaal te trekken. Bij het saneren kan er voor gekozen worden om water te herinfiltreren. Het risico op schade door droogte wordt tegengegaan. De bodem kan op deze manier ook sneller worden doorspoeld. De infiltratie kan met bovengenoemde systemen, maar dan in omgedraaide richting. Besproeiing van de oppervlakte of het aanleggen van infiltratievijvers zijn ook mogelijkheden.



**figuur 10: Schema van een deepwell (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001)**

Als men **immobilisatie** wil toepassen zal men uithardende stoffen laten infiltreren. Deze techniek is vooral geschikt voor anorganische verbindingen zoals zware metalen.

Meestal wordt er cement gedoseerd aan de bodem. Deze technieken moeten achteraf nauwkeurig gecontroleerd worden om zeker te zijn dat er geen uitloging meer plaatsvindt. Immobilisatie kan ook toegepast worden door in situ-vitrificatie. Deze is toepasbaar voor alle soorten vervuiling. De hoge temperaturen veranderen de structuur van bodem in meer glasachtige vezels. Aan de hand van elektroden in de bodem kan men de gewenste smelttemperatuur bereiken.

#### 1.4.5 Haalbaarheid voor het saneren van zware metalen

De verschillende systemen die mogelijk zijn voor het saneren van zware metalen hebben elk hun voor- en nadelen. Pump and treat systemen worden veel gebruikt maar deze techniek kan redelijk lang duren. De mogelijkheid tot fyto-remediatie zal nog uitvoerig besproken worden. Het is echter nu al duidelijk dat ook hier duidelijke beperkingen aan verbonden zijn. Elektroreclamatie is een snellere techniek, maar deze techniek is redelijk nieuw en wordt nog niet veel toegepast. Technieken waarbij de grond wordt afgegraven geven zeker een goede reiniging, maar zijn altijd duur. Beheersingstechnieken zijn in vele gevallen maar een verplaatsing in tijd.

Techniek	Kost (\$/ton)	Polluenten	Duur	Bodemtype	ontwikkeling
Land farming	50-150	Organische	Gemiddeld	Grof	meest gebruik
Verbranding	200-1500	Breed	Snel	Breed	veel gebruikt
Fyto-remediatie	15-50	Breed	Traag	Breed	in ontwikkeling
Bodemluchtextractie	20-200	Vluchtige	gemiddeld	Grof	veel gebruikt
Civieltechnische beheersing	250-350	lage concentraties	Snel	Breed	gebruikt

**tabel 3: Enkele belangrijke technieken met elkaar vergeleken (BBT-kenniscentrum, VITO, 2001, Baeyens en Everaert, 2004)**



“Angst hoort het gras groeien en de stenen wenen.”

(Hans Kudszus)

## **1.5 Fytoremediatie**

Men kan fytoremediatie omschrijven als het gebruik van planten voor het verwijderen, afbreken of vastleggen van contaminanten. De planten kunnen op verschillende manieren hun toepasbaarheid bewijzen. Men maakt onderscheid tussen fyto-extractie, fytotransformatie en fytostabilisatie.

### **1.3.1 Fyto-extractie**

Men gaat de vervuiling uit de bodem proberen te verwijderen door opname van de pollutant via de wortels van de planten. De uiteindelijke verwijdering gebeurt dan door de planten te oogsten. Hierbij krijgen planten die de vervuiling transporteren naar de delen die zich boven de grond bevinden de voorkeur: deze delen zijn immers gemakkelijker te oogsten. Voor enkele edelmetalen kan men deze zelfs recupereren na de oogst, de concentratie kan immers hoger oplopen dan in sommige ertsen (Cunningham et al., 1996). Fyto-extractie kan zeker toegepast worden, zoals werd aangetoond voor lood. Twee oogsten van *Brassica juncea* kunnen de concentratie in de bodem doen dalen van 2000 ppm naar 400 ppm (Watanabe et al., 1997).

Het dient gezegd te worden dat sommige planten voorkomen in bodems met zeer hoge concentraties aan zware metalen. De reden van deze tolerantie heeft twee mogelijke oorzaken. Sommige planten kunnen er voor zorgen dat de zware metalen niet naar binnen kunnen dringen, terwijl anderen juist het tegenovergestelde doen (de accumulatoren). Deze hebben de mogelijkheid om de metalen in de cel onschadelijk te maken. Men spreekt ook nog over hyperaccumulatoren, deze accumuleren meer dan 100 ppm Cd in de plant. Voor andere metalen zoals nikkel en lood is de grens 1000 ppm (Baker et al., 1994). Een hyperaccumulator voor lood is bijvoorbeeld het Engels gras, *Armenia maritima*. *Thlaspi caerulescens* is de bekendste voor Zink. Deze laatste accumuleert ook tot 2000 ppm Cd.

Hyperaccumulatoren zijn echter pas bruikbaar om aan extractie te doen als aan nog enkele bijkomende voorwaarden voldaan zijn. De accumulatiesnelheid moet voldoende

hoog zijn, ook bij lage bodemconcentraties. Hoe hoger de productie aan biomassa hoe meer contaminant er opgeslagen kan worden. De biomassa moet best gemakkelijk te oogsten zijn, en zich dus niet grotendeels ondergronds te bevinden.

Zoals reeds gezegd is de accumulatie ook sterk soortafhankelijk. Dit wordt uitgedrukt in de bioaccumulatiecoëfficiënt als de verhouding tussen concentratie in de plant tot de concentratie in oplossing, deze eenheid is dimensieloos (Moreno-Jiménez et al., 2005). De waarden kunnen sterk uiteenliggen; de scheuten van *Brassica juncea* hebben coëfficiënten van  $175 \pm 16$  voor Cd en in de wortels zelfs  $20574 \pm 4295$ . *Thlaspi caerulescens* accumuleert minder Cd maar de coëfficiënten in scheuten en wortels voor nikkel zijn respectievelijk  $2739 \pm 383$  en  $8425 \pm 4220$ . De laatste neemt ook meer lood op: coëfficiënten zijn hier respectievelijk  $29 \pm 23$  en  $7011 \pm 3616$  voor scheuten en wortels (Baeyens en Everaert, 2004). Men merkt dikwijls grote verschillen in concentraties tussen wortels en bladeren. Binnengedrongen metalen moeten immers nog getransporteerd worden naar de hoger gelegen bladeren. Enkel voor *Thlaspi caerulescens* werd voor zink, nikkel en mangaan een hogere concentratie in de bovengrondse delen gemeten. Dit kan een belangrijke beperkende factor van fyto-extractie zijn indien men bepaalde andere planten wil gebruiken.

Vele planten werden onderzocht naar hun potentieel voor fyto-extractie van Cd. *Cannabis sativa* werd onderzocht met een dubbel doel. Enerzijds heeft men de accumulatie in deze plant bepaald en alzo de mogelijkheid voor fyto-remediatie onderzocht. Anderzijds heeft men gekeken of de plant nog te gebruiken was door de vezelkwaliteit te controleren. Elke vegetatieperiode zou men 126 g Cd per hectare uit de bodem kunnen halen, terwijl de vezels nog niet aan kwaliteit hebben ingeboet, enkel aan kwantiteit (Linger et al., 2002). Voor Chinese kool (*Brassica pekinensis*) werd onderzocht dat Cd sneller werd geaccumuleerd wanneer men polypropreen of polyethyleen afdekkingen oplegt, door de verbeterde thermische omstandigheden. Dit kan potentieel een gevaar zijn bij commerciële teelt, maar kan een voordeel bieden bij fyto-extractie (Moreno et al., 2001). Ook andere planten van deze familie zijn regelmatig onderzocht. Zo werd in koolzaad (*Brassica napus*) vastgesteld dat de hoge concentraties die werden opgenomen in de bladeren, niet automatisch leiden tot zware toxiciteit voor de plant, als gevolg van een stockage in de vacuolen en de celwand, dus de minder actieve compartimenten van de cel of plant (Carrier et al., 2003). Transport naar de vacuole werd ook vastgesteld in *Arabidopsis thaliana* (Desbrosses-Fonrouge et al., 2005). Ook Indische mosterd (*Brassica juncea*) werd reeds onderzocht als mogelijke plant voor fyto-remediatie van Cd (Qadir et al., 2004). Het nadeel dat in vele

studies naar voor komt is de lange tijd die soms nodig is om een bodem volledig te saneren met behulp van planten.

De efficiëntie van fytoextractie moet verhoogd worden om deze techniek rendabel te maken. Men kan proberen op de biobeschikbaarheid van in de bodem in te spelen of de accumulatie van de planten aan te passen. Toevoegen van een licht zure compost verhoogt de biobeschikbaarheid. Een belangrijke manier om in te spelen op de biobeschikbaarheid is door zelf complexerende stoffen toe te voegen. Het effect is afhankelijk van de chelator. Zeer goede resultaten werden bekomen door toevoeging van EDTA. Deze hebben bijkomend voordeel dat ook het transport van de wortelen naar de bovengrondse delen wordt bevorderd. De opname kan verhoogd worden door genetische manipulatie (Kärenlampi et al., 2000), maar deze techniek werd nog niet toegepast. Door verhoging van de biomassa productie kan het extractiepotentieel ook verhoogd worden.

### **1.5.3 Fytotransformatie**

De bedoeling van fytotransformatie is dat planten de contaminanten in het grondwater of uit het water opnemen en dan omzetten tot minder toxische of onschadelijke verbindingen. Indien deze nieuwe verbindingen vluchtig zijn spreekt men van fytovolatilisatie. De transformatie kan ook uitgevoerd worden door micro-organismen die zich in de rhizosfeer bevinden (rhizosfeerbioremediatie). (Erickson et al., 1994). De techniek werd wel reeds nuttig toegepast voor het saneren van verschillende soorten olie (Kim 1996), maar kan echter niet toegepast worden voor het saneren van zware metalen.

### **1.5.4 Fytostabilisatie**

Deze techniek maakt gebruik van planten om de contaminatie in de bodem vast te leggen en zo de biobeschikbaarheid te verlagen. Het doel is de verspreiding van de vervuiling via lucht of grondwater tegen te gaan. Op zwaar vervuilde gronden groeien meestal weinig planten. Dit kan erosie tot gevolg hebben, waardoor de vervuiling sneller verspreid kan worden. Metaaltolerante planten kunnen hier een oplossing bieden. Planten die wel veel metalen vastleggen, maar niet in de bovengrondse delen komen hier in het bijzonder voor in aanmerking (Salt et al 1995). De verspreiding kan

verder worden tegengegaan door het immobiliseren met behulp van exudaten die door de wortels of de geassocieerde micro-organismen worden afgegeven. Er werd aangetoond dat een plantendeck de contaminantconcentratie in percolerend water aanzienlijk kan terugdringen (Salt et al., 1995).

### **1.5.5 Evaluatie van fyto-remediatietechnieken**

Fyto-remediatie is een nieuwe bodemsaneringstechniek, er dient nog veel onderzoek verricht te worden om deze techniek te optimaliseren. Desalniettemin werd de techniek reeds commercieel toegepast voor de fyto-extractie en fytostabilisatie van metalen. Ook de andere mogelijkheden lijken praktisch haalbaar (Baeyens en Everaert, 2004). Een belangrijke parameter is uiteraard de kostprijs van deze technieken in vergelijking met de traditionele bodemsaneringstechnieken. Volgens verschillende bronnen (Salt et al., 1995, Baeyens en Everaert, 2004) blijken technieken op basis van planten tot 10 keer goedkoper te zijn dan de traditionele. Een ander in het oog springend voordeel is het esthetische aspect. Er zijn ook enkele nadelen aan verbonden. Fyto-remediatie is niet toepasbaar voor diepere verontreinigingen. Er zullen dikwijls vele oogsten nodig zijn vooraleer een voldoende rendement bereikt wordt.

*"Het meeste verkeer komt voort uit de angst om alleen te zijn. Indien de mens erin slaagde te berusten in zijn eenzaamheid, zou het gras tussen de straatstenen groeien."  
(Godfried Bomans)*

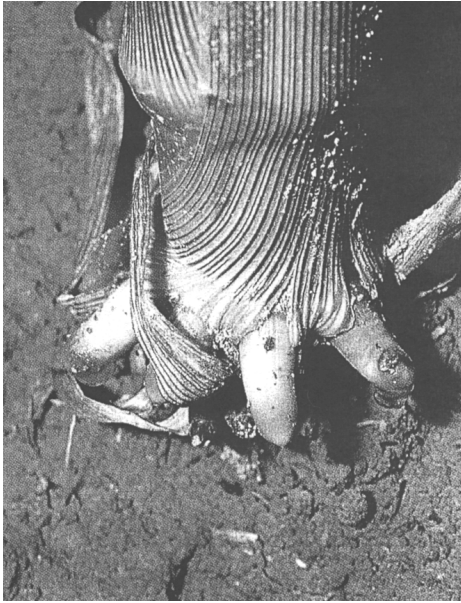
## **1.6Grassen**

Grassen behoren tot het rijk der planten, fylum Spermatophyta, in de onderafdeling Angiospermae of bedektzadigen. Ze behoren verder tot de klasse der Monocotyledoneae (eenzaadlobbigen), de orde van de Poales en de familie van de Poaceae (De Langhe et al., 1988). Typische grassen hebben holle stengels en knopen. Bladeren vertrekken van de knoop, zijn lang smal en parallelnervig. Ze hebben een verspreide en afwisselende bladstand. Het eerste deel van het blad vormt een koker rond de stengel, dit deel noemt men schede.

### **1.6.1Anatomische kenmerken van echte grassen**

Het eerste wat men met het blote oog van de scheut van een kiemend gras kan zien is de kiemschede of coleoptiel. Echte grassen kunnen aan de hand van hun halm van andere op gras lijkende planten onderscheiden worden. De halm is rond en geled, dit wil zeggen met knopen en internodia. Deze laatste zijn meestal hol, in de knopen bevinden zich meestal dwarswandjes. Er komen echter grassoorten voor waarbij de holle internodiën duidelijk of minder duidelijk met merg gevuld zijn (maïs). Bij grassen zorgen de collenchymcellen voor de fysieke weerbaarheid van grassen, ze zijn zeer rekbaar. Samen met de sclerenchymvezels, dode maar extreem stevige cellen, zorgen deze voor de stevigheid van de grashalm.

Als **ondergrondse delen** onderscheidt men de rhizomen en de wortels. De beworteling van een gras is bijzonder. Het beginnende kiemworteltje is omgeven door een voor grassen kenmerkend omhulsel, de coleorhiza. De kiemwortel is in staat om onvertakte zijworteltjes te vormen. Toch zal hij net zoals bij de meeste eenzaadlobbige planten, nooit uitgroeien tot een hoofd- of penwortel met vertakte zijwortels. Bij typische grassen wordt de jonge scheut sterk in groei geremd.



**figuur 11: Stengelbasis van een jonge maïsscheut. De bladscheden zijn verwijderd. De kroonwortels zijn duidelijk zichtbaar**

Vanuit elke knoop op de rhizomen ontstaan dan kroonwortels. Deze wortels worden niet bijzonder lang. Enkel bij vrijstaande graanplanten worden soms wortels van 1 meter gemeten. Ze zijn echter wel meestal erg vertakt, waardoor het totale wortelstelsel opgeteld een zeer grote lengte kan hebben. Dit is noodzakelijk want het kleine kiemworteltje zou niet in staat zijn om de grassen met hun slanke halmen en soms naar verhouding zware vruchtrossen van voldoende water en zouten te voorzien. De kroonwortels zorgen voor een stevige verankering in de bodem. Omdat deze wortels echter niet erg diep in de bodem groeien, kunnen grassen best overleven in gebieden waar veel neerslag valt.

Vanop de rhizoom kunnen ook uitlopers groeien, die zelfs als afzonderlijke plant kunnen verder leven. Dit is een belangrijke eigenschap met het oog op verspreiding. Het rhizoom is gedeeltelijk omgeven door scheden met vliezige bladeren, die van bouw overeenkomen met de bovengrondse bladeren. Er kunnen ook zijscheuten ontstaan. Sommige grassen vormen zijscheuten die gedurende lange tijd ondergronds blijven verder groeien. Wanneer er opnieuw kroonwortels worden gevormd richt de plant zich naar de bovengrond. Dikwijls gaat nu de verbinding met de moederplant verloren. De zijscheuten kunnen zich ook na slechts een korte periode wortelen en oprichten. De verbinding blijft bestaan, men spreekt nu van zodevormers. Een typisch voorbeeld hiervan is het Engels raaigras (*Lolium perenne*) dat dankzij deze eigenschap in bijna alle gazonmengsels voorkomt. Polvormers zijn grassen waarvan de scheuten zich

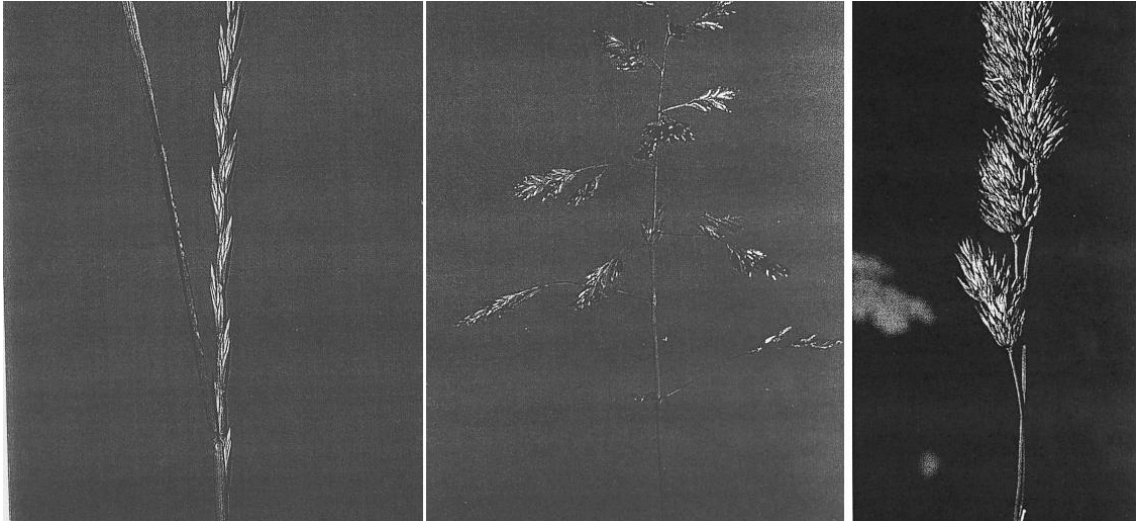
onmiddellijk oprichten. Indien de zijscheuten niet doorheen de scheden heen kunnen groeien, worden hele dichte pollen gevormd. De hoofdas wordt in zijn groei belemmerd, waardoor de nieuwe scheuten uiteindelijk even lang zullen uitgroeien en gelijktijdig tot bloei zullen komen.

De **bovengrondse delen** vertonen een knopvormige verdikking onderaan de ronde halm. De wijze waarop de bladeren zijn ingeplant op de echte grassen is ook typerend: ze staan slechts aan twee tegenoverliggende zijden van de halm. De stengels en de bladeren van grassen zijn voor alle soorten zeer gelijkaardig en het zijn slechts enkele eigenaardige kenmerken die ons tot de mogelijk stellen om de grassen, die niet in bloei staan van elkaar te onderscheiden. De bladeren zijn de productieorganen van de plant, dit is de plaats waar de fotosynthese doorgaat. Enkel de stengeldelen kunnen bladeren vormen. In principe kunnen de jonge bladeren de vegetatiekegel in de knop op twee manieren omringen: opgerold of geplooid.



**figuur 12: Platgeslagen korenveld. De halmen richten zich weer op.**

De belangrijkste kenmerken om grassen te determineren zijn echter de voortplantingsorganen. Zo heb je de aargrassen zoals *Lolium perenne* en de aarpluimgrassen zoals *Poa pratensis*, bij deze laatste groeien de aartjes op steeltjes. Maar uiteraard zijn er nog vele ander bloeiwijzen mogelijk zoals de *Dactylis glomerata* of kropbaar, hier merkt men zelfs zeer duidelijk dat de bloeiwijze verandert tijdens de bloeiperiode.



figuur 13: Verschillende bloeiwijzen. Van links naar rechts: *Lolium perenne* (aargras), *Poa pratensis* (pluimgras) en *Dactylis glomerata* (kropaar)

#### 1.4.2 Het gebruik van grassen

Alle nuttige toepassingen van grassen opsommen past niet in het kader van deze tekst, maar zelfs een vluchtige blik op het dagelijkse leven leert alvast dat grassen onmisbaar zijn in onze maatschappij. Meel, bier, rietsuiker, graanjenever worden allen bereid uit grassoorten, bovendien is de functie van gras als voedergewas voor runderen van zeer groot belang. Grassen worden niet alleen gebruikt als voedsel, ook als bouw materiaal en grondstof voor papier.

Als cultuurgewassen kent men vooral tarwe, rogge, haver, gerst, maïs, rijst, suikerriet en gierst. Hieronder worden er enkel besproken.

Tarwe werd zeker al in cultuur gebracht 6000 jaar VC in de Nijldelta. Het is dan ook het belangrijkste broodgraan ter wereld, ongeveer 1 % van het aardoppervlak wordt ingenomen door tarwe.

Rijst is het tweede belangrijkste graangewas. Op 1 300 000 km<sup>2</sup> wordt ongeveer 350 miljoen ton gekweekt. Rijst vereist hoge temperaturen en ook een hoge vochtigheid. Oorspronkelijk was de wilde vorm een moerasplant. In China kweekt men deze plant al bijna 5000 jaar.



Maïs is graansoort nummer 3 op de ladder qua beteelde oppervlakte en opbrengst na tarwe en rijst. Ongeveer 1 100 000 km<sup>2</sup> is bedekt met maïs, Dit brengt ca. 335 miljoen ton maïs op per jaar. Europa kwam voor de eerste keer in aanraking toen Columbus in aanraking kwam met het inheemse mahiz. Maïs is bijzonder omdat het de enige graansoort is waarbij de mannelijke en vrouwelijke bloemen in gescheiden bloeiwijzen staan.

### 1.6.3 Enkele typische grassen uit de Vlaamse flora

*Lolium perenne* of Engels raaigras heeft een echte aar, waarvan de aartjes in twee rijen staan, met de smalle kant naar de hoofdas gekeerd. Op het laatste aartje na hebben de aartjes slechts één schutkafje dat duidelijk korter is dan de aartjes zelf. Het gras zelf wordt 20 tot 60 cm hoog, de bladschijf is ongeveer 4 à 6 mm breed. De aartjes worden 1 cm lang. Het Engels raaigras komt zowel in cultuur als in het wild voor. Men vindt het terug over de hele wereld.



figuur 14: *Lolium perenne* (a) met bloeiwijzen (b en c)

*Poa pratensis* of weidebeemdgras vormt pluimaartjes. Het gras kan 10 tot 60 cm hoog worden. De bladschijf kan soms heel smal zijn, namelijk 1 tot 6 mm breed. Ook hier zijn de schutkafjes korter dan het aartje. Ze komen heel algemeen voor van het laagland tot de alpen, in weilanden en grasvelden, langs wegen en ook in lichte bossen of struikgewas.



figuur 15: *Poa pratensis* (a) met bloeiwijze (b en c)

**Dactylis glomerata** of kropbaar wordt 30 tot 100 cm hoog, met bladscheden van 3 tot 10 mm breed. De aartjes worden 7 à 8 mm lang, de schut- en dekkafjes zijn gestekeld en half zo lang als het aartje. Komt voor van het laagland tot in het gebergte en heeft net zoals *Poa pratensis* een stikstofhoudende bodem nodig. Het is een voedselrijk gewas, en wordt dan ook als voedergras gebruikt.



figuur 16: *Dactylis glomerata* (a) met bloeiwijzen (b en c)

“te veel hooi op de vork nemen”  
(gezegde)

## 1.7 Doelstellingen

Cadmium is een probleem, niet alleen in de Kempen, maar ook in andere regio's en er is zelfs gevaar voor de gezondheid van de mens. Omdat in de eerste plaats planten in contact komen met de vervuilde bodems wordt het onderzoek hierop toegespitst.

In een eerste deel wordt gewerkt met *Lolium perenne*. Dit is een interessante plant om te bestuderen, vooral omdat dit gras, zoals vele grassen, zeer gemakkelijk te kweken is. Grassen hebben een hoge biomassa-productie en de biomassa is op een eenvoudige manier van de bodem te verwijderen. Er zal worden bestudeerd of deze plant geschikt is voor fyto-extractie van Cd. Er dienen twee eigenschappen van *Lolium perenne* te worden getest, enerzijds moeten nagegaan worden of de planten voldoende tolerant zijn voor de cadmiumconcentraties in de vervuilde bodems in Vlaanderen en anderzijds moeten de planten in staat zijn om voldoende Cd op te nemen in hun bladeren.

Tolerantie zal worden getest door te kijken naar de ontkieming, aan de hand hiervan kan men een LD<sub>50</sub> opstellen. De groei van de planten zal worden bekeken als maat voor de gezondheid. Er zal getracht worden te achterhalen in welke stadia van de groei de planten meer invloed ondervinden van Cd in de bodem. Als alternatieve maat voor de gezondheid van de planten zal worden bekeken of de fotosynthese van planten nog optimaal verloopt. Aan de hand van fluorescentiemetingen kan men een inschatting maken van de fotosynthetische activiteit.

De opname van Cd in *Lolium perenne* zal worden gemeten en vergeleken met de toegediende hoeveelheid, Er zal een onderscheid gemaakt worden tussen de wortels en bladeren. De mogelijkheid om *Lolium perenne* te gebruiken voor fyto-extractie zal getest worden in een simulatie met vervuilde grond. Aan deze grond zullen ook chelatoren worden toegevoegd om de opname te bevorderen.

In een tweede deel zal aan de hand van metingen op het veld een inschatting kunnen gemaakt worden van de cadmium vervuiling rond Antwerpen. Metingen van het cadmiumgehalte in bodem zullen vergeleken worden met metingen in wortels en

bladeren van verschillende grassen. Er zullen metingen verricht worden op verschillende afstanden in noordoostelijke richting van de non-ferro-industrie ten zuiden van Antwerpen. Naast deze milieutoxicologische studie, zal worden bekeken of de grassen geschikt zijn als indicator voor de vervuiling van de bodem waarin ze gekweekt worden, door een vergelijking te maken met de resultaten die in het laboratorium voor *Lolium perenne* gevonden werden.

## 2 Materiaal en methode

*“Gras groeit niet door aan de sprieten te trekken, maar door de wortels water te geven.”*

*(onbekend)*

### 2.1 Het kweken van *Lolium perenne*

#### 2.1.1 De groeimedia voor het kweken van *Lolium perenne*

Er werden 2 soorten media gebruikt in de verschillende experimenten.

- Murashige & Skoog (MS; Murashige & Skoog 1962) Dit werd kant en klaar aangekocht bij Duchefa; hiervan werd 4,331 g opgelost per liter gedestilleerd water, dit levert volgende concentraties op:
  - 20,6 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$
  - 3 mM  $\text{CaCl}_2$
  - 1,5 mM  $\text{MgSO}_4$
  - 18,8 mM  $\text{KNO}_3$
  - 1,25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 0,1 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$
  - 0,2  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$
  - 0,16  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$
  - 0,16 mM  $\text{FeSO}_4$
  - 0,1 mM  $\text{MnSO}_4$
  - 0,08 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$
  - 1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$
  - 5  $\mu\text{M}$   $\text{KI}$
  - 30  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$

De pH van de oplossing was 5,8.

- Standaard groeimedium
  - 5 mM KNO<sub>3</sub>
  - 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 2 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  - 0,049 mM FeSO<sub>4</sub> + 0,045 mM EDTA (eerst wordt de EDTA oplossing gekookt, dan het ijzerzout toegevoegd)
  - Microelementen:
    - 70 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
    - 14 μM MnCl<sub>2</sub>
    - 0,5 μM CuSO<sub>4</sub>
    - 1 μM ZnSO<sub>4</sub>
    - 0,2 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>
    - 10 μM NaCl
    - 0,1 μM CoCl<sub>2</sub>

De pH bedroeg 5,6.

Deze media werden telkens gesupplementeerd met een bepaalde hoeveelheid cadmium om de gewenste blootstelling voor de experimenten te bekomen

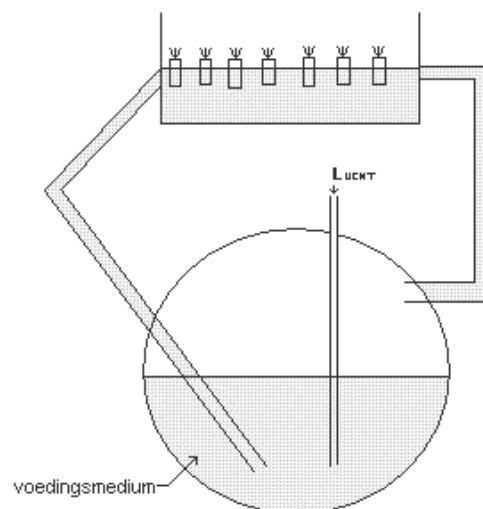
### **2.2.3 Bepaling van de speciatie van cadmium in het groeimedium**

De speciatie is de verdeling van een ion over de verschillende mogelijke chemische vormen of complexen afhankelijk van de omstandigheden of het milieu dat het zich bevindt. Aan de hand van computersimulatie kan men de speciatie bepalen. In de computer zijn de meeste chemische evenwichten geprogrammeerd. Men las de concentraties van de verschillende nutriënten in en rekende het chemisch evenwicht uit. De berekeningen werden gedaan met de hulp van "Visual MINTEQ" (v 2.40b). Ter controle worden alle resultaten nagerekend met "PHREEQC" (versie 1).

### 2.2.4 Het kweken van planten voor korte termijn experimenten.

De planten werden opgekweekt in vloeibaar medium waaraan perliet werd toegevoegd als steun voor de planten. Zaaïen gebeurde bij een dichtheid van ongeveer 1g zaden/80 cm<sup>2</sup>. De zaadjes van *Lolium* ontkiemen na ongeveer 5 dagen en na 1 week waren de planten voldoende groot voor de eerste metingen. De planten werden gekweekt bij een 16 uur licht/8 h donker lichtregime ( $54 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), een relatieve vochtigheid van 70 % en een temperatuur van 23 °C.

### 2.2.5 Het kweken van planten voor middellange termijn experimenten.



figuur 17: Schema en foto van het hydrocultuursysteem, de vloeistof stroomt in wijzerzin

Er werd een hydrocultuursysteem ontworpen waarin grote hoeveelheden groeimedium kunnen circuleren. Onderaan worden vaten van 50 L geplaatst met hierin een beluchtingsysteem. Deze vaten worden met donkere verf beschilderd om geen licht binnen te laten. Met een kleine vijverpomp wordt het water naar een hoger liggende waterdichte bak gepompt. In deze bak bevinden zich proefbuisrekjes. In deze rekjes kan men halve falcontubes hangen, deze tubes zijn geperforeerd en gevuld met

filterwatten. Aan de andere kant van de bak bevindt zich een overloop die er voor zorgt dat de vloeistof terug naar het reservoir stroomt. Het hele doorstroomsysteem werd eerst gedurende één week gespoeld met een oplossing van 3 % waterstofperoxide als reiniging en sterilisatie. Ongeveer 20 zaadjes van *Lolium* worden op de filterwatten in de falcontubes aangebracht, en de reservoirs werden gevuld met het standaard groeimedium (zie 2.1). planten werden gekweekt bij een 16 uur licht/8 h donker lichtregime ( $54 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), een relatieve vochtigheid van 70 % en een temperatuur van 23 °C. De concentratie Cd en nutriënten kunnen gemeten worden met een cadmiumelektrode en geschat met een conductiviteitsmeter.

### **2.2.6 Het kweken van *Lolium* voor fyto-extractietesten.**

Om de natuurlijke omgeving meer te benaderen werd gebruik gemaakt van potgrond (STOP, Brico) zonder meststoffen. De planten werden gekweekt in bakjes gevuld met 1 L potgrond. Deze potgrond werd verzadigd met 0,5 L 20  $\mu\text{M}$  Cd. Afhankelijk van het experiment werden hier verschillende dosissen van chelatoren aan toegevoegd. De controle-experimenten werden uitgevoerd met enkel Cd, daarnaast werd er gewerkt met bijkomend 10, 20 en 40  $\mu\text{M}$  natriumcitraat of 10, 20 en 40  $\mu\text{M}$  EDTA.

Dit experiment liep zes weken vanaf het zaaien ( $1\text{g}/80 \text{ cm}^2$ ). De helft van de bakken werd elke twee weken gemaaid, de andere helft niet. Dit maaien gebeurde door de grassen met een schaar af te knippen tot op 1 cm boven de potgrond. De totale biomassaproductie werd gemeten alsook de concentratie Cd in de bovengrondse grassdelen. De stalen werden eerst 24 uur gedroogd op 70 °C alvorens ze verder verwerkt werden. De biomassa werd zowel via vers- als via drooggewicht bepaald.

### **2.2.7 Het kweken van *Lolium* voor LD<sub>50</sub> bepaling**

2 filters (Wattman 3) werden boven elkaar in een petrischaal gelegd, en hieraan werd 3 mL MS-medium met verschillende concentraties aan Cd toegevoegd. Deze concentraties werden zo gekozen dat er duidelijke verschillen geobserveerd werden tussen de verschillende petrischalen. Er werden telkens ongeveer 10 zaadjes aangebracht op de filters in elke petrischaal. Na 1 week werd het aantal zaadjes dat al dan niet ontkiemd was, bepaald. Er werd een sigmoïde gefit op de metingen om de LD<sub>50</sub> te bepalen.



*“It is very hard for me to switch from clay to grass.”  
(Marat Safin)*

### **2.3 Staalname in het veld**

Grasstalen werden genomen in het veld op verschillende locaties op de te onderzoeken gradiënt vertrekkende van Hoboken en verder zo veel mogelijk in noordoostelijke richting. Er werden 5 parken of grotere grasvelden geselecteerd waar deze staalnames konden gebeuren: park Sorghvliedt(Hoboken), Schoonselhof(Wilrijk), Nachtegalenpark(Wilrijk), Rivierenhof(Deurne), Gemeentepark(Brasschaat). De kaart hieronder toont naast de ligging van de punten waar stalen werden genomen ook de locatie van de non-ferro-industrie in Hoboken, de afvalverbrandingsoven in Wilrijk, de voornaamste autosnelwegen en de ligging van de Schelde in Antwerpen. De kaart is in ArcGis gemaakt en met dit programma werden ook de afstanden tot de non-ferro-industrie gemeten.

De grassen werden per bundel uit de grond verwijderd met extra aandacht voor de wortels. De achterblijvende grond werd met water verwijderd. De stalen werden gedroogd gedurende 24 h bij 70 °C. Op dezelfde locaties werden ook bodemstalen verzameld. Deze stalen werden genomen uit de bovenste laag van de bodem. Er werd voor gezorgd dat telkens een homogene laag grond uit de eerste 4 centimeter van de bodem werd genomen. Deze stalen werden ook gedroogd gedurende 24 u bij 70 °C.



**figuur 18: De stalname punten en hun ligging ten opzichte van enkele referentiepunten (a: non-ferro-industrie ; b: afvalverbrandingsoven; 1: Sorghvliedt; 2: Schoonselhof; 3: Nachtegalenpark; 4: Rivierenhof; 5: Gemeentepark Brasschaat)**

*"Het meeste verkeer komt voort uit de angst om alleen te zijn. Indien de mens erin slaagde te berusten in zijn eenzaamheid, zou het gras tussen de straatstenen groeien."*

*(Godfried Bomans)*

## **2.4 Samenstelling en eigenschappen van de bodem**

Voor het bepalen van de zuurtegraad van de bodem werd 1 deel luchtgedroogde bodem bij 5 delen van een 1 M KCl oplossing gevoegd. Na 2 uur werd de pH gecontroleerd. De pH werd opnieuw gemeten 1 uur later, wanneer deze niet meer wijzigde in de loop der tijd was de pH gekend.

Voor het meten en het verwijderen van het organische gehalte werd een hoeveelheid waterstofperoxide (30%) toegevoegd aan de gedroogde bodem (20 g), de organische koolstof werd zo omgezet tot CO<sub>2</sub>. Om de reactie te versnellen werd de beker in een waterbad (80 °C) geplaatst. Extra waterstofperoxide werd toegevoegd in stappen met kleine hoeveelheden totdat het mengsel niet meer bruiste, en er dus geen organisch materiaal meer aanwezig is. Men laat nu ook de waterstofperoxide wegreacteren. Het staal werd gedroogd en gewogen, zodanig dat het gehalte organisch materiaal kon berekend worden.

Met een bezinkproef kon men de gehalten zand, leem en klei bepalen. Het zand werd eerst apart bepaald. Volgens de wet van Stokes bezinkt het zand 5 cm in 15 seconden. Men voegde 5 cm gedestilleerd water toe aan een maatcilinder die ongeveer 10 cm hoog is en laat het zand 15 seconden bezinken en de bovenstaande vloeistof werd gerecupereerd in een andere maatcilinder (1000 mL), deze stap moest herhaald worden tot de maatcilinder met het zand helder werd na 15 seconden, dan was de leem en de klei volledig afgescheiden en overgebracht naar de andere maatcilinder. Het gehalte zand kon worden gedroogd en gewogen. De kleileemfractie werd nu aangelengd in een maatcilinder met water tot 1000 mL. Men zorgde voor een homogeen mengsel en pipetteerde 20 mL water op een diepte van 10 cm deze fractie bevatte zowel klei en leem. 8 uur later pipetteerde men nogmaals 20 mL op dezelfde diepte. De tweede fractie bezat enkel de klei in dezelfde concentratie als deze in de gehele cilinder. De beide fracties werden gedroogd en gewogen (Geuens en Torfs, 2004).

*"Geschiedenis kun je niet zien, evenmin als je het gras kunt zien groeien."*

*(Boris Pasternak)*

## **2.5 Bepaling van de lengte van de verschillende delen van het gras**

Een bepaalde tijd na het zaaien van de planten in de perliet werden at random een aantal grassprietten verwijderd, dit met inbegrip van de wortel. Eventueel perliet werd eerst verwijderd met behulp van water, vervolgens werden de individuele planten gesplitst in wortel en stengel. De lengte van deze onderdelen werden bepaald met een meetlat met een nauwkeurigheid van 1 mm. Lengtes werden bepaald van grassen opgekweekt in perliet met groeimedium in combinatie met 0  $\mu\text{M}$ , 2 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$  en 20 $\mu\text{M}$  Cd. Er werden grassen gemeten gedurende 3 weken vanaf het zaaien, met een interval van 1 week. Voor de planten die zijn opgekweekt volgens het systeem voor middellange termijn experimenten (zie punt 2.2.5) kunnen de wortels niet worden afgezonderd. Deze zaten namelijk verweven in het filtermateriaal. De andere plantendelen konden nog steeds worden verwijderd en op bovenstaande manier worden gemeten.

*"Niet eeuwig kan men genieten van rust en vrede, en toch betekenen ongeluk en verstering niet het einde. Als het gras door vuur verwoest is, komt het 's zomers toch weer op."*  
(Onbekend)

## **2.6 Bepaling van het cadmiumgehalte**

### **2.5.1 Opstellen van een ijklijn voor de cadmiumelektrode**

De cadmiumelektrode (Fisher Bioblock scientific) werd gebruikt om de concentratie aan cadmium te kunnen meten bij lange termijn experimenten. Men meet eerst de geleidbaarheid van het standaard groeimedium. Er werden 8 oplossingen klaargemaakt met standaard groeimedium en respectievelijk 0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 35  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  en 100  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ . De conductiviteit werd gecontroleerd in al deze oplossingen. De spanning die de cadmiumelektrode genereert is een maat voor de concentratie.

### **2.6.3 Destructie van grasstalen voor elementen analyse**

Ongeveer 100 mg staal (wortel of gras) werd opgelost of ondergedompeld in 2 mL (of 3 mL indien nodig) 65 %  $\text{HNO}_3$ . Men laat de stalen nu 24 uur op kamertemperatuur reageren. Vervolgens werden ze gedurende 5 minuten in een microgolf onder gesloten atmosfeer op 90 Watt geplaatst. Deze stap werd 4 maal herhaald met telkens een verhoging van het vermogen van de microgolfoven met 90 Watt (Blust et al., 1988, Dewil et al., In druk). Er werd MilliQ-water toegevoegd tot een totaal van 10 mL. De stalen worden nog 3 maal (of 4 maal) verdund zodat de resterende salpeterzuurconcentratie lager dan 5 % bedraagt. Er worden ook blanco's gemeten die de gehele procedure doorliepen.

### **2.6.4 Sequentiele extractie van bodemstalen**

Deze methode gaat, aan de hand van telkens sterkere extractiemedia, steeds steviger gebonden cadmium van de bodem losweken (Chen en Ma, 1998). Men krijgt zo verschillende fracties. Er werd ongeveer 1 g bodem gebruikt. Hieraan werd 10 mL

toegevoegd van een 0,11 M azijnzuuroplossing. Deze oplossing werd goed gemengd met een vortex. De stalen werden gecentrifugeerd na 16 uur gedurende 20 minuten op 3000 g. De bovenstaande vloeistof is de analyse oplossing voor de eerste fractie. De onderste fractie werd gewassen met Milli-Q water. Het water werd verwijderd door te centrifugeren (20 min, 3000 g). De tweede extractieoplossing werd steeds vers bereid. Deze bestond uit 0,5 M hydroxylamine hydrochloride en 0,23 % (v/v) salpeterzuur. De extractie met hydroxylamine hydrochloride verliep volledig analoog aan deze met azijnzuur. Men verkreeg nu een tweede fractie. Aan de resterende fractie bodem werd nu 5 mL 31 % waterstofperoxide toegevoegd. Er werd gedurende 1 uur regelmatig gemengd. De stalen reageerden vervolgens verder op 85 °C, waarbij gedurende een half uur de stalen terug regelmatig gemengd werden. Er werd verder ingedampt tot minder dan 3 mL vloeistof overbleef. Dan werd 5 mL waterstofperoxide toegevoegd, zodat men de procedure met waterstofperoxide kon herhalen. Er werd nu wel verder ingedampt tot ongeveer 200 µL. Vervolgens werd er 10 mL ammoniumacetaatoplossing (1 M) toegevoegd. Er werd gedurende 16 uur gemengd, en vervolgens gecentrifugeerd zoals hierboven beschreven. De bovenstaande vloeistof is de derde fractie die geanalyseerd dient te worden. Er werden steeds enkele blanco's meegenomen die de gehele procedure doorliepen.

### **2.6.5 Atomaire emissie spectroscopie (AES)**

Voor het meten van het cadmiumgehalte werd gebruik gemaakt van een inductive coupled plasma (ICP) AES. AES maakt gebruik van zeer hoge temperaturen om enkele elektronen van de buitenste schil van een atoom te exciteren naar een hogere schil. Wanneer de elektronen terugvallen naar hun basisniveau, zullen deze een elektromagnetische golf uitzenden, die evenredig is met het energieverval tussen de twee niveaus. Omdat in deze techniek wordt gebruik gemaakt van individuele atomen die straling uitzenden bekomt men smalle pieken in het spectrum die afhankelijk van de atoomsoort op een andere golflengte zullen liggen. De hoogte van de piek is een maat voor de concentratie in de oplossing. Deze techniek is zeer gevoelig en zorgt ervoor dat zeer lage concentraties van bepaalde elementen in mengsels toch kunnen gemeten worden. Voor Cd worden de emissies gemeten bij een golflengte van 280 nm. Het grootste onderscheid tussen verschillende toestellen voor AES is de manier waarop de hoge temperaturen worden bereikt. Bij de oude technieken werd gebruik gemaakt van een vlam om de atomen te exciteren. Inductive coupled plasma (ICP) is een andere techniek die gebruikt kan worden als atomizer. Plasma is een geleidende

gasvormige toestand met een grote hoeveelheid kationen en elektronen. De ICP bestaat uit drie concentrische quartzbuisjes. In de binnenste stroomt het staal onder begeleiding van argon, in de buitenste stroomt gewoon argon. Bovenaan deze buisjes zijn er wikkelingen van een spoel voorzien, die na de ionisatie de elektronen en kationen in beweging houden. De ionisatie komt tot stand door een vonk van een Tesla spoel. De beweging van de kationen en de elektronen zorgen voor een opwarming zoals deze tot stand komt in een Ohmse weerstand. Er worden zo temperaturen bereikt van rond de 7000 °C (Skoog et al., 1996).

De bodemfracties en grasstalen werden geanalyseerd op hun cadmiumgehalte. Het toestel werd gecalibreerd met een standaard oplossing van Cd. De gemeten emissie werd verminderd met de emissie van de blankostalen. Het toestel heeft aan één concentratie voldoende om een ijklijn op te stellen, omdat bij lage concentratie de emissie als lineair te beschouwen valt in relatie tot de concentratie.

*"I believe a leaf of grass is no less than the journey-work of the stars."  
(Walt Whitman)*

## 2.7 Fluorescentie

chlorofylfluorescentie quenching analyse werd uitgevoerd met een Fluorescentiemeter van Hansatech (U.K.) volgens vroeger beschreven protocols (D'haese et al., 2004, Potters et al., ingediend). Het minimale fluorescentieniveau ( $F_0$ ) werd gemeten aan de hand van gemoduleerd licht van een zeer lage intensiteit, bij bladeren die gedurende voldoende tijd zijn aangepast aan het donker. Vervolgens wordt de initiële maximale fluorescentie ( $F_m$ ) bepaald door een puls verzadigend licht van  $2000 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  te gebruiken die 0,85 seconden duurt. De fotosysteem II efficiëntie bedraagt ongeveer 0,832 voor gezonde planten en wordt gegeven door:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Deze parameter werd gebruikt om te controleren hoeveel tijd de planten nodig hebben om zich aan het donker aan te passen. De waarde mag niet meer stijgen in functie van de tijd. In de volgende stap wordt actinisch licht gebruikt van  $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , waarna elke 25 seconden een puls zal gegeven worden zoals hierboven werd beschreven. In functie van de tijd worden nu nieuwe maximale fluorescenties ( $F'_m$ ) gemeten. Tussen de pulsen wordt de fluorescentie ook gemeten ( $F_s$ ). Op het einde van de metingen zakt deze tot op een nieuwe minimaal fluorescentieniveau ( $F'_0$ ). Uit deze metingen kunnen op elk tijdstip vier parameters berekend worden (Maxwell en Johnson, 2000):

- De fotochemische quenching geeft weer hoeveel reactiecentra van fotosysteem II open zijn, dus energie kunnen ontvangen, de waarde wordt 1 wanneer alle centra open zijn.

$$qP = \frac{F'_m - F_s}{F'_m - F'_0}$$



- De niet-fotochemische quenching is een maat voor de opgenomen lichtenergie die niet op fotochemische weg kan behandeld worden en dus op alternatieve wijze zal moeten worden afgevoerd, zoals door warmteafgifte, de NPQ kan theoretisch oneindig groot worden, de qNP geeft minder verschillen voor zeer hoge waarden van de niet-fotochemische quenching, omdat deze zijn teruggebracht in een schaal van 0 tot 1

$$qNP = 1 - \frac{F_m - F'_m}{F_m - F_0}$$

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$$

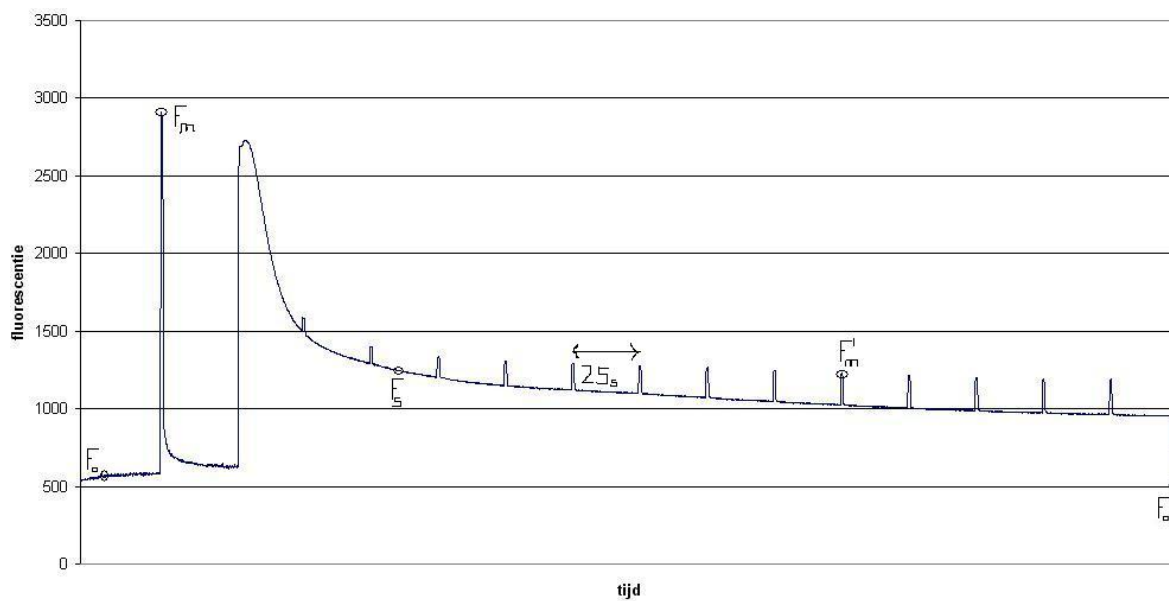
- Quantumopbrengst van niet cyclische electronentransport doorheen fotosysteem II is de proportie van het licht geabsorbeerd door chlorofyl dat wordt gebruikt voor fotochemie.

$$\phi PSII = 1 - \frac{F_s}{F'_m}$$

Hieronder staat een figuur, die het verloop van een typisch experiment toont (figuur 19). De parameters veranderen in functie van de tijd en kunnen allen volgens een zelfde kinetiek beschreven worden. De sigmoïde van Hill blijkt een geschikt model (D' Haese et al., 2004).

$$y = \frac{Plat * x^{Hill}}{Tau^{Hill} + x^{Hill}}$$

Er kan nu worden nagegaan of er een verschil bestaat in de parameters van de sigmoïde, afhankelijk van leeftijd en blootstelling van de plant. De berekening gebeurt afzonderlijk voor elk experiment. Er wordt telkens bepaald wat de beste waarden zijn voor Tau, Hill en Plat (zie 2.5); door iteratie wordt de afwijking van de gefitte curve tot de gemeten waarden zo klein mogelijk gemaakt. Vervolgens worden de gemiddeldes berekend voor metingen met plantjes die even oud zijn en zijn gekweekt met dezelfde concentratie aan Cd in het standaard groeimedum



figuur 19: Voorbeeld van het verloop van een fluorescentiemeting

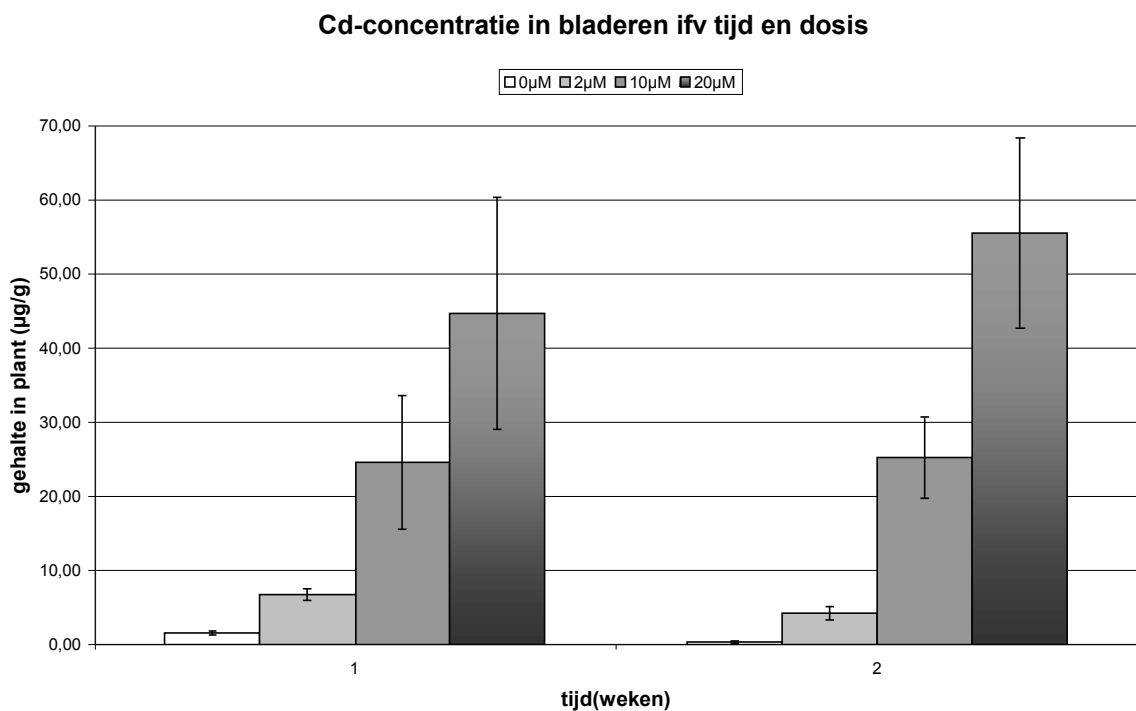
### 3 Resultaten

#### 3.1 De effecten van cadmium op *Lolium perenne*

##### 3.1.1 Opname van cadmium door *Lolium perenne*

##### 3.2.3.1 Opname door bladeren

Op figuur 20 onderscheidt men duidelijk dat hoe hoger de concentratie Cd in het standaard groeimedium is, hoe hoger de concentratie in de bovengrondse delen wordt. Metingen werden verricht op planten van één en twee weken oud. De concentraties Cd die werden toegediend waren 0  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  en 20  $\mu\text{M}$ .



figuur 20: De opname van Cd in bladeren van *Lolium perenne* uitgezet voor verschillende concentraties Cd in het groeimedium, op 2 tijdstippen. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 4$

Het effect van de tijd is ook zichtbaar op figuur 20. Voor de lage concentraties tot 10  $\mu\text{M}$  merkt men dat er al een evenwicht bereikt is na de eerste groeiweek voor de concentraties tot en met 10  $\mu\text{M}$ , wanneer de concentratie toeneemt tot 20  $\mu\text{M}$  bereikt men ogenschijnlijk nog geen evenwicht.

De resultaten van dit experiment werden geanalyseerd via een 'two way analyse of variance' (ANOVA), zoals weergegeven in tabel 4.

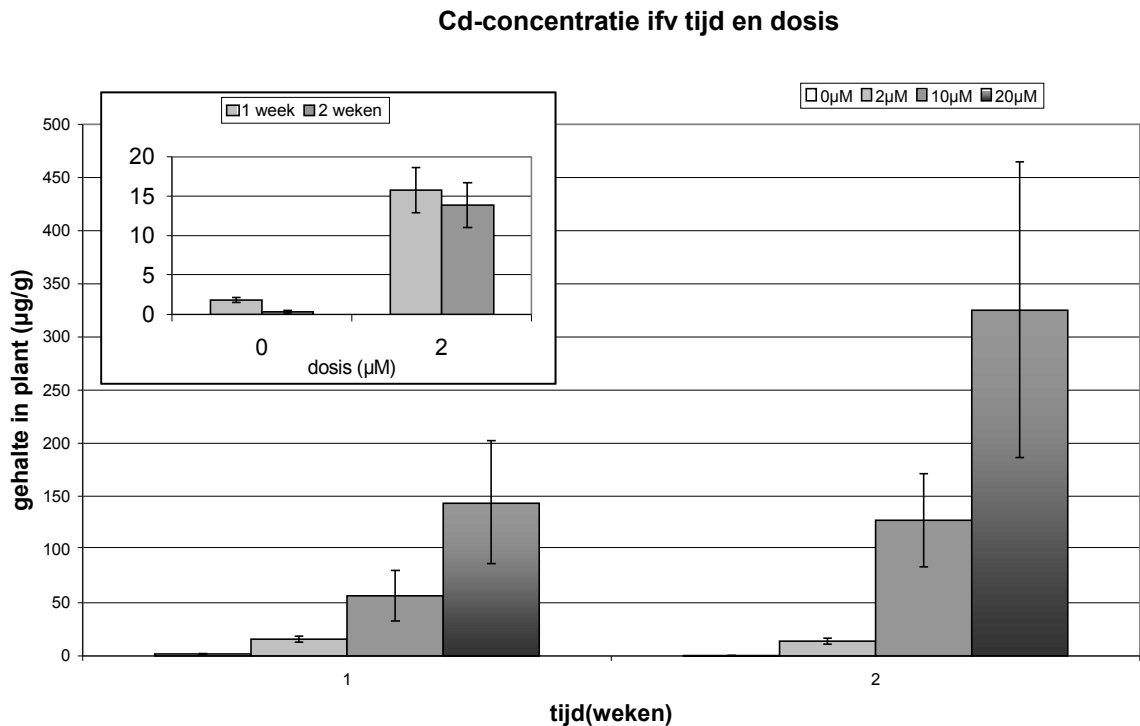
ANOVA					
Response: Cd					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tijd	1	101.3	101.3	0.5655	0.4586
conc	1	11372.2	11372.2	634.924	1,45E-05 ***
tijd:conc	1	176.5	176.5	0.9852	0.3297
Residuals	27	4836.0	179.1		

**tabel 4: Two way ANOVA uitgevoerd op het Cd-gehalte in stengels met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken**

Uit deze metingen kan dus enkel afgeleid worden dat er een significant effect is van de concentratie aan Cd in het groeimedium op de concentratie die gemeten is in de bladeren. Er is geen significant effect gemeten van de tijdsduur op de concentratie en er kan dus ook geen interactie tussen de twee effecten zijn.

### 3.2.3.2 Opname door wortels

Op figuur 21 staat weergegeven hoe de concentratie in wortels varieert in functie van de concentratie aanwezig in het groeimedium. De metingen hieronder geven deze variatie weer 1 week en 2 weken na het zaaien. Het gaat hier om dezelfde planten als deze uit het vorige experiment



**figuur 21:** De opname van Cd in wortels van *Lolium perenne* uitgezet voor verschillende concentraties Cd in het groeimedium en op 2 tijdstippen. Inzet: De opname van Cadmium in wortels van de ontwikkelende *Lolium perenne* vergeleken in de tijd en voor 2 concentraties (0 en 2 µM). Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 4

Er dient opgemerkt te worden dat de dalende trend in functie van de tijd bij de lagere concentraties niet werd gemeten bij de hogere concentraties. Ook voor de concentratie in de wortels wordt best een ANOVA uitgevoerd, zoals hierboven beschreven.

ANOVA						
Response: Cdw						
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tijd	1	45145	45145	38.761	0.0597240	.
conc	1	245006	245006	210.360	0.0001001	***
tijd:conc	1	42906	42906	36.838	0.0659804	.
Residuals	26	302822	11647			

**tabel 5:** Two way ANOVA uitgevoerd op het Cd-gehalte in wortels met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken

In tabel 5 wordt een significante invloed getoond van de concentratie in het groeimedium op het gemeten cadmiumgehalte in de wortels. Er kan echter geen invloed worden vastgesteld van de tijd op de concentratie in de wortels, en bijgevolg ook geen interactie. Hieronder wordt in de tabel vermeld hoe Cd zich gedraagt

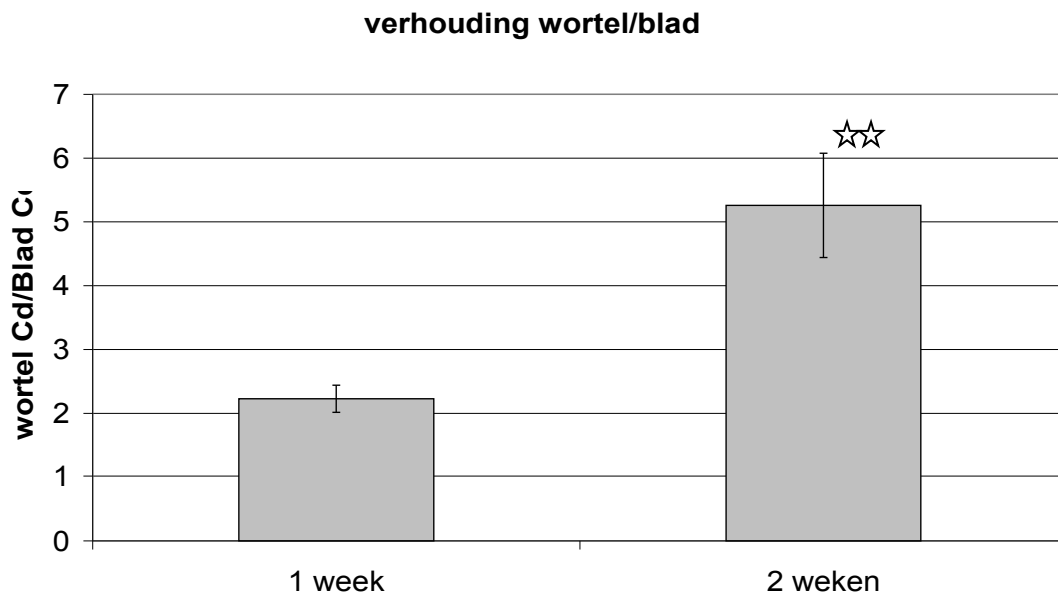
wanneer het in de verschillende concentraties wordt toegediend aan het standaard groeimedium.

totaal Cd ( $\mu\text{M}$ )	2	10	20	50
verbinding	%	%	%	%
$\text{CdEDTA}^{2-}$	99,55	99,29	98,72	82,66
$\text{CdHPO}_4$ (aq)	0,25	0,40	0,73	9,90
$\text{Cd}^{2+}$	0,16	0,26	0,47	6,46
$\text{CdSO}_4$ (aq)	0,02	0,03	0,06	0,82
$\text{CdNO}_3^+$	0,00	0,00	0,00	0,11
$\text{Cd}(\text{SO}_4)_2^{2-}$	0,00	0,00	0,00	0,02
$\text{CdCl}^+$	0,00	0,00	0,00	0,01
$\text{CdHEDTA}^-$	0,01	0,01	0,01	0,01

**tabel 6: Cadmium-speciatie in standaard groeimedium (zie materiaal en methode voor samenstelling) berekent met Visual MINTEQ (v 2.40b)**

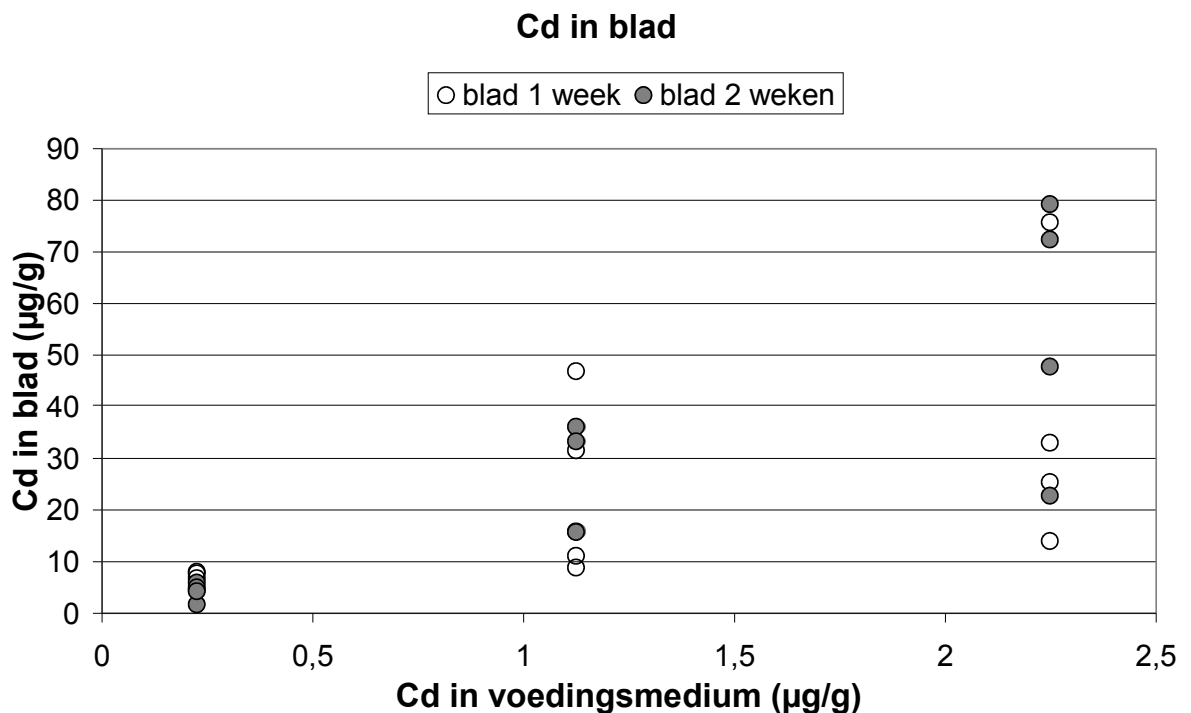
### 3.2.3.3 Vergelijking tussen medium, wortel en bladstengel

Belangrijk om na te gaan is de verhouding van het cadmiumgehalte tussen blad en wortel onderling, en de verhouding van deze twee tot de concentratie in het groeimedium.

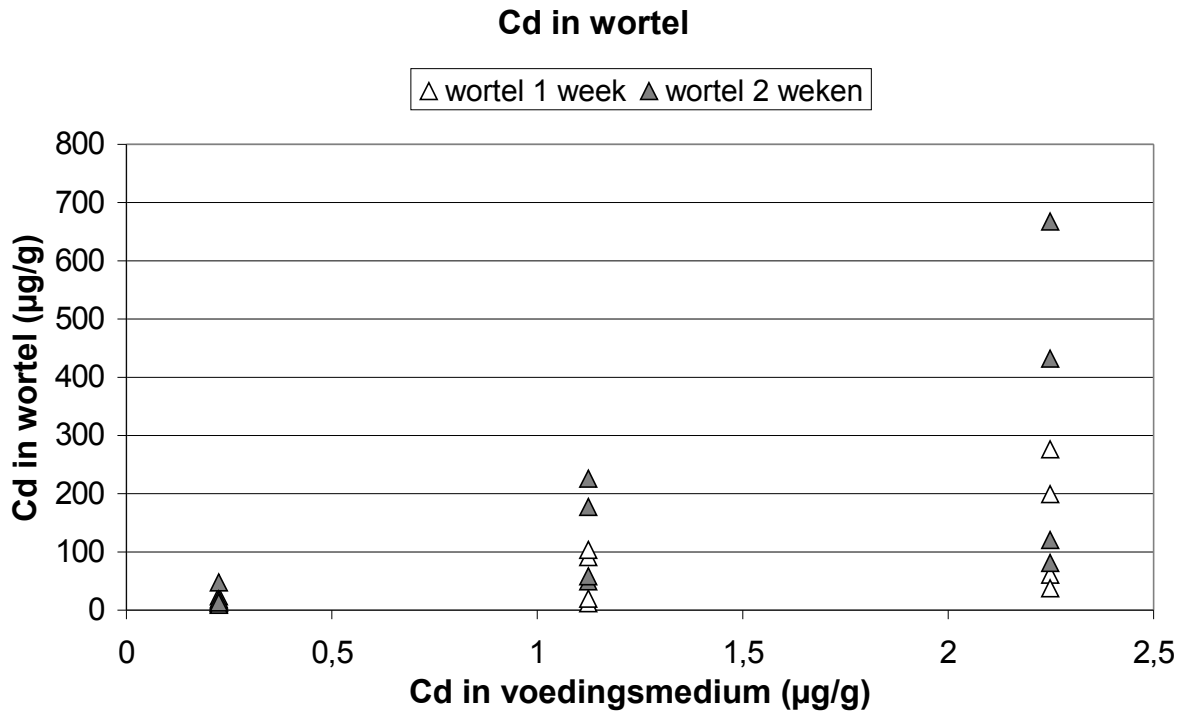


**figuur 22: De verhouding tussen de concentratie Cd gemeten in wortels en de concentratie in bladeren (experimenten uitgevoerd in standaard groeimedium met 2; 10; 20  $\mu\text{M}$  Cd) waarden weergegeven. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 12$ . (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ )**

Er werden geen significante verschillen gemeten als gevolg van een verschil in cadmiumconcentratie in het groeimedium. De verhouding tussen de wortel- en de bladconcentratie was na 2 weken significant groter dan deze na 1 week ( $p = 0,0017$ ). Wanneer men de bioaccumulatie nagaat, meet men enkel een significant verschil tussen de accumulatie in wortels ten nadele van de accumulatie in de bovengrondse plantendelen. Er werd geen verschil gemeten tussen planten van één en twee weken oud, of tussen planten die werden opgekweekt bij hogere concentraties groeimedium. De accumulatie, dit is de verhouding tussen opgenomen concentratie en beschikbare concentratie, in wortels bedraagt  $89 \pm 16$ , deze in stengels en bladeren bedraagt  $22 \pm 2$ . Deze waarden zijn dimensieloos, omdat men twee getallen met dezelfde eenheid door elkaar deelt. De figuren hieronder geven een duidelijk beeld van de metingen. De schaal op de verticale as is verschillend voor de 2 figuren.



**figuur 23: Alle metingen van cadmiumconcentraties in bladeren uitgezet ten opzichte van de concentratie in het standaard groeimedium**



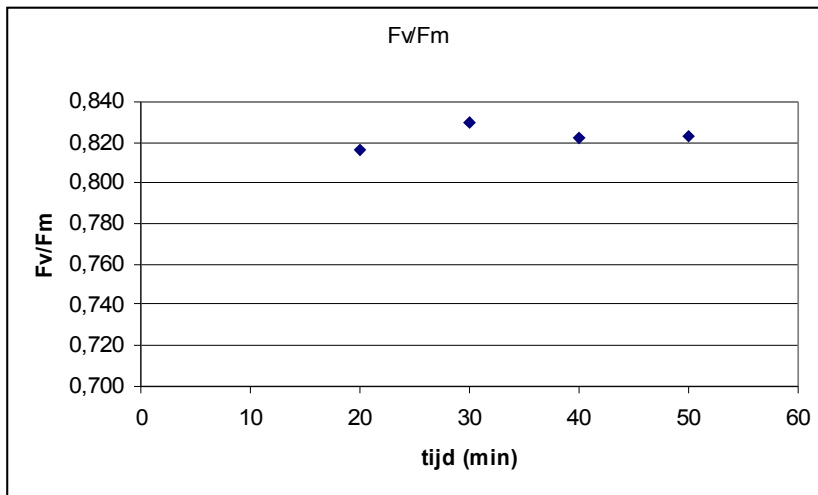
figuur 24: Alle metingen van cadmiumconcentraties in wortels uitgezet ten opzichte van de concentratie in het standaard groeimedium

### 3.2.4 Invloed van cadmium op de fotosynthese in *Lolium perenne*

#### 3.2.4.1 Bepaling van de tijd nodig voor donkeradaptatie

Aan de hand van de  $F_v/F_m$ - waarde kan worden afgeleid hoe lang de planten nodig hebben om zich aan te passen aan het donker. Er werden metingen gedaan na 10 tot 50 minuten. In figuur 25 wordt duidelijk getoond dat er geen verdere stijging meer plaatsvindt na 30 minuten.

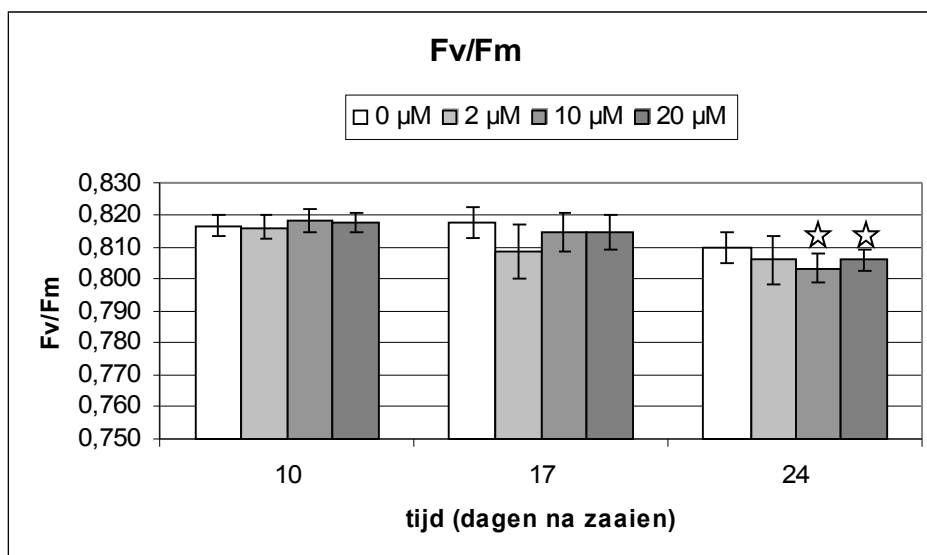




figuur 25: Metingen van de Fv/Fm in functie van de tijd van donkeradaptatie

### 3.2.4.2 Invloed van cadmium op de Fv/Fm-verhouding

De Fv/Fm-verhouding kan gebruikt worden als indicator voor de gezondheidstoestand van een plant. In figuur 26 wordt duidelijk dat er geen significante verschillen kunnen gevonden worden wanneer planten bij deze verschillende concentraties worden gekweekt. Er wordt wel vastgesteld dat er een significante daling van de Fv/Fm plaatsvindt bij 10 en 20  $\mu\text{M}$ , als men tijdstip 1 vergelijkt met tijdstip 3. Tijdstip 1 is 10 dagen na het zaaien, dan zijn de planten voldoende groot voor de metingen.



figuur 26: De Fv/Fm-waarden in functie van de tijd, metingen gebeurden bij verschillende concentraties Cd in standaard groeimedium. Significanties werden getest ten opzichte van dezelfde concentratie bij het eerste tijdstip. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 10$ . (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ )

### **3.2.4.3 Bepaling Tau, Hill en Plat voor $\Phi_{PSII}$ , qP, qNP en NPQ**

In onderstaande tabel staan alle parameters voor alle gemeten tijdstippen uitgerekend. Er werden geen significante verschillen tussen de parameters gevonden, als men twee opeenvolgende concentraties vergelijkt. Enkele trends worden wel vastgesteld. De belangrijkste geven een significante stijging of daling ten opzichte van de controleplantjes (0  $\mu\text{M}$ ) en zijn weergegeven in vet.

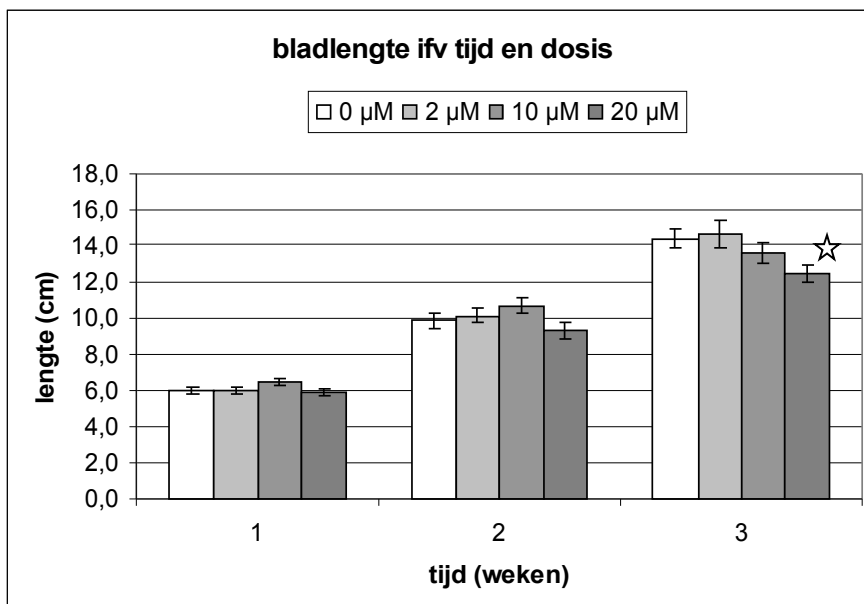
concentratie		0 $\mu$ M		2 $\mu$ M		10 $\mu$ M		20 $\mu$ M		
		mean	error	mean	error	mean	error	mean	error	
$\Phi$ PSII	tijd = 10	TAU	2,27	0,20	3,04	0,75	2,63	0,40	3,57	0,88
		PLAT	0,36	0,05	0,41	0,07	0,31	0,03	0,37	0,05
		HILL	1,12	0,04	1,06	0,04	1,03	0,02	1,04	0,02
	tijd = 17	TAU	3,29	0,76	3,07	1,15	2,05	0,22	2,14	0,23
		PLAT	0,43	0,08	0,40	0,12	0,29	0,05	0,29	0,04
		HILL	1,10	0,04	1,14	0,07	1,29	0,12	1,16	0,08
	tijd = 24	TAU	2,41	0,26	2,69	0,24	2,80	0,35	2,87	0,53
		PLAT	0,26	0,03	0,28	0,05	0,24	0,03	0,25	0,03
		HILL	1,12	0,05	1,14	0,06	1,07	0,04	1,13	0,03
qP	tijd = 10	TAU	2,60	0,20	2,94	0,36	3,66	0,41	<b>3,88</b>	<b>0,32**</b>
		PLAT	0,77	0,08	0,80	0,07	0,80	0,07	0,85	0,05
		HILL	1,25	0,09	1,26	0,11	1,14	0,04	1,19	0,07
	tijd = 17	TAU	2,66	0,22	2,44	0,15	2,14	0,18	2,25	0,12
		PLAT	0,77	0,08	0,66	0,09	<b>0,52</b>	<b>0,06*</b>	0,55	0,05
		HILL	1,28	0,08	1,32	0,14	1,39	0,15	1,14	0,08
	tijd = 24	TAU	2,55	0,25	2,84	0,17	3,05	0,34	3,97	0,84
		PLAT	0,57	0,08	0,63	0,11	0,48	0,06	0,57	0,08
		HILL	1,34	0,08	1,32	0,06	1,20	0,06	1,22	0,07
qNP	tijd = 10	TAU	0,17	0,01	0,19	0,01	0,22	0,03	<b>0,23</b>	<b>0,02**</b>
		PLAT	0,84	0,02	0,83	0,02	0,85	0,02	0,86	0,02
		HILL	1,01	0,01	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
	tijd = 17	TAU	0,22	0,02	0,20	0,03	0,25	0,03	0,23	0,03
		PLAT	0,84	0,02	0,81	0,03	<b>0,77</b>	<b>0,01*</b>	0,77	0,02
		HILL	1,17	0,10	1,04	0,04	1,98	0,53	1,30	0,20
	tijd = 24	TAU	0,22	0,02	0,23	0,02	0,24	0,03	0,22	0,03
		PLAT	0,82	0,02	0,85	0,02	0,80	0,02	0,77	0,02
		HILL	1,16	0,07	1,03	0,03	1,08	0,07	1,23	0,14
NPQ	tijd = 10	TAU	0,51	0,03	0,65	0,08	0,81	0,15	<b>0,87</b>	<b>0,11*</b>
		PLAT	2,14	0,14	2,17	0,18	2,37	0,20	2,49	0,17
		HILL	1,06	0,05	1,00	0,00	1,01	0,00	1,01	0,01
	tijd = 17	TAU	0,61	0,06	0,51	0,08	0,49	0,03	0,50	0,08
		PLAT	2,23	0,14	1,88	0,25	<b>1,72</b>	<b>0,10*</b>	1,74	0,17
		HILL	1,17	0,07	1,20	0,08	1,82	0,37	1,30	0,19
	tijd = 24	TAU	0,57	0,03	0,67	0,07	0,59	0,08	0,53	0,10
		PLAT	2,06	0,16	2,18	0,21	1,73	0,09	1,71	0,18
		HILL	1,31	0,21	1,12	0,07	1,12	0,07	1,22	0,20

tabel 7: Alle gemiddeldes voor de parameters Tau, Hill en Plat berekend voor verschillende tijden(dagen) en verschillende concentraties Cd in de voeding. Alle waarden weergegeven met standaard fout. (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ )

### 3.2.5 Invloed van cadmium op de groei van *Lolium perenne*

#### 3.2.5.1 Invloed van cadmium op de groei van bladeren

Een andere belangrijke parameter die de gezondheid van een plant beschrijft is de groei. We gaan na of Cd een inhiberende werking heeft op de groei van *Lolium perenne*. De metingen vinden plaats op planten van respectievelijk 1, 2 en 3 weken oud. Deze werden opgekweekt in standaard groeimedium met Cd-concentraties van 0  $\mu\text{M}$  tot 20  $\mu\text{M}$ . Voor de bovengrondse delen worden de metingen weergegeven in figuur 27.



figuur 27: De gemiddelde lengte van bladeren van *Lolium perenne* weergegeven voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding.

Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 32$ . (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ )

De significanties werden getest door de metingen bij hogere concentraties te vergelijken met experimenten zonder Cd en planten van dezelfde leeftijd, na 3 weken zijn bladeren gekweekt met 20  $\mu\text{M}$  Cd kleiner dan controlebladeren (\*:  $P < 0,05$ ). Om ook het effect van tijd in rekening te brengen dient te worden overgestapt naar een ANOVA. Men bekijkt nu het effect van de concentratie in het algemeen, het effect van tijd in het algemeen en of deze parameters elkaar beïnvloeden. tabel 8 geeft een samenvatting van deze analyse.

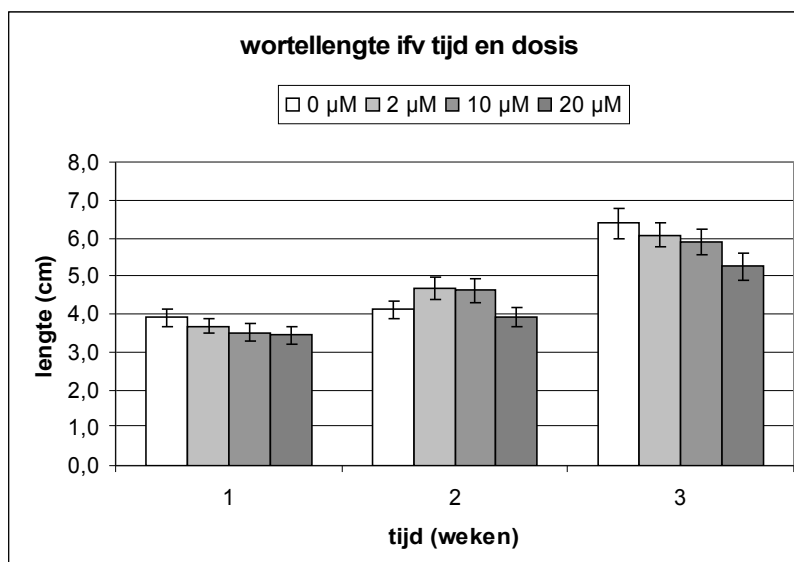
ANOVA						
Response:	blad					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
conc	1	47.7	47.7	80.108	0.004897	**
tijd	1	3784.6	3784.6	6.354.217	<2.2e-16	***
conc:tijd	1	46.5	46.5	78.055	0.005472	**
Residuals	380	2263.3	6.0			
---						
Signif. codes:	****	p < 0.001		***	p < 0.01	

**tabel 8: Two way ANOVA uitgevoerd op de bladlengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking op de cadmiumconcentratie in het groeimedium en "tijd" op de duur van de blootstelling**

Men bemerkt nu dat er een algemene invloed van de concentratie op de bladlengte kan worden vastgesteld, evenals een invloed van de tijd op de bladlengte. Men meet ook een significante interactie tussen deze twee parameters. Dit wil concreet zeggen dat de factor tijd de metingen in functie van de factor concentratie beïnvloedt.

### 3.2.5.2 Invloed van cadmium op de groei van wortels

Van alle hierboven beschreven planten werd ook de lengte van de wortels bepaald. De resultaten zijn weergegeven in figuur 28.



**figuur 28: De gemiddelde lengte van wortels van *Lolium perenne* weergegeven met standaardfout voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 32. (\*: P < 0,05; \*\*: P < 0,01; \*\*\*: P < 0,001)**

Er werden geen significante verschillen tussen twee afzonderlijke gemiddeldes gevonden, wanneer men de verschillende concentraties vergelijkt voor een vast tijds punt. We voeren weer een two way ANOVA uit (zie tabel 9) om een algemeen overzicht te krijgen.

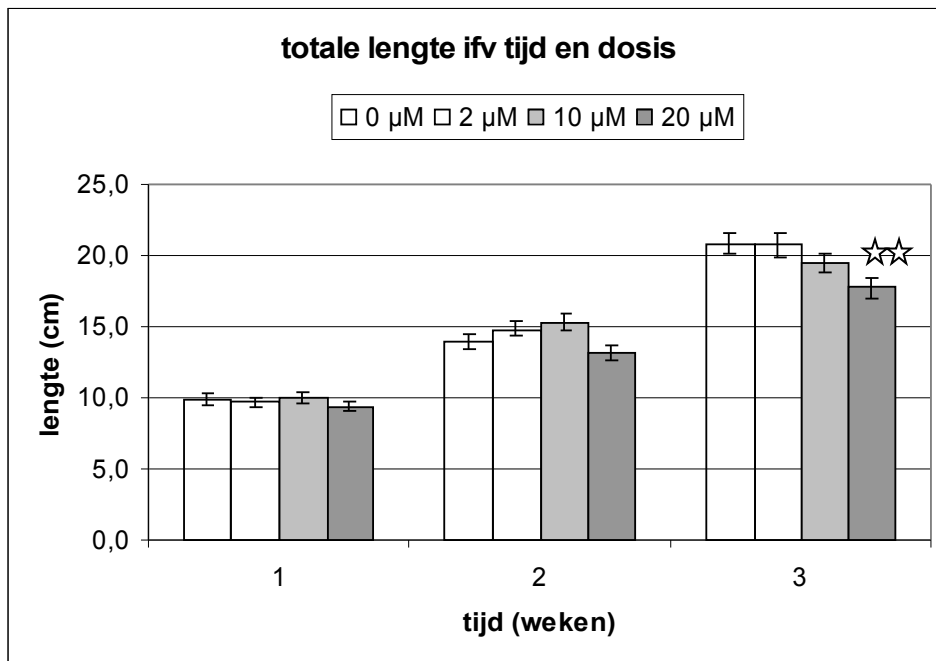
ANOVA						
Response:	wortel					
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
conc	1	21.86	21.86	80.083	0.004904	**
tijd	1	330.56	330.56	1.211.039	<2.2e-16	***
conc:tijd	1	3.83	3.83	14.037	0.236850	
Residuals	380	1037.22	2.73			
---						
Signif.		p <				
codes:	****	0.001		***	p < 0.01	

**tabel 9: Two way ANOVA uitgevoerd op de wortellengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken**

Uit deze analyse blijkt dat er wel een effect is van de concentratie in het groeimedium op de gemeten wortellengte. Men stelt ook een effect van de tijd op de lengte vast. Deze twee effecten zijn wel afzonderlijk van elkaar en beïnvloeden elkaar dus niet, er is geen significante interactie.

### 3.2.5.3 Invloed van cadmium op de totale lengte

Een ongebruikelijke parameter om de gezondheid van de plant na te gaan is de totale lengte. Deze bekomen we door elke keer de lengte van de gemeten wortel en de lengte van het gemeten blad op te tellen. Minieme verschillen in lengte worden zo groter en het effect van Cd kan duidelijker worden bekeken. Onderstaande figuur toont de resultaten.



figuur 29: De gemiddelde totale lengte van *Lolium perenne* weergegeven met standaardfout voor verschillende tijdstippen en verschillende concentraties Cd in de voeding.

Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 32$ . (\*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ )

De significanties werden getest ten opzichte van de controleplanten met dezelfde leeftijd. Er werd een significant verschil ontdekt na 3 weken: planten gekweekt in standaard groeimedium van 20  $\mu\text{M}$  hebben een kleinere totale lengte in vergelijking met de controleplanten (\*\*:  $P < 0,01$ ). Een two way ANOVA geeft het volgende resultaat:

ANOVA					
Response:	som				
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
conc	1	134.2	134.2	121.409	0.0005508 ***
tijd	1	6352.1	6352.1	5.748.386	<2.2e-16 ***
conc:tijd	1	77.0	77.0	69.694	0.0086333 **
Residuals	380	4199.1	11.1		
---					
Signif.					
codes:		**** p < 0.001		*** p < 0.01	

tabel 10: Two way ANOVA uitgevoerd op de totale lengte met R 2.0.1 "conc" heeft betrekking tot het groeimedium en "tijd" tot het aantal weken

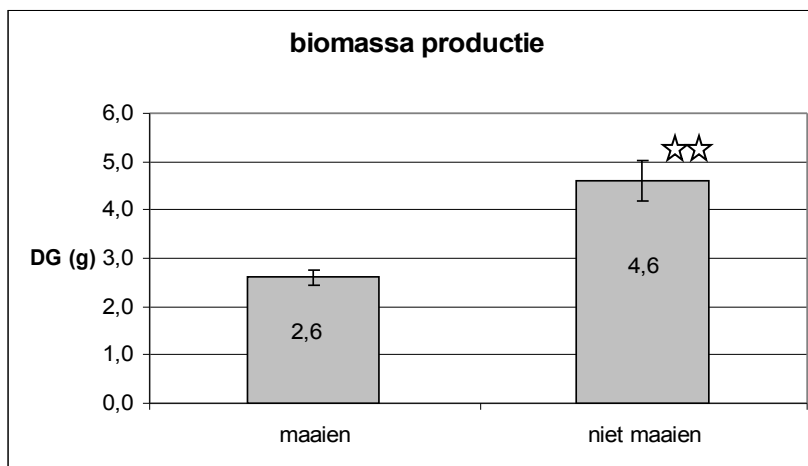
tabel 10 toont duidelijke effecten van tijd en concentratie op de totale lengte. Er werd ook significante interactie van deze twee effecten gemeten.

### 3.2.6 Bepaling van de haalbaarheid van fyto-remediatie

De bedoeling is dat de planten er voor zorgen dat vervuilde bodems gereinigd worden door het verwijderen van de pollutant, in dit geval Cd. Fyto-remediatie of beter fyto-extractie is haalbaar wanneer planten voldoende Cd transporteren naar hun bovengrondse delen. Het is afhankelijk van twee factoren, enerzijds de concentratie in de bovengrondse delen en anderzijds de totale biomassa per eenheid oppervlakte van deze delen.

#### 3.2.6.1 Biomassaproductie

De grassen worden voor deze experimenten gekweekt in potgrond. Men vergelijkt de totale productie na 6 weken wanneer men al dan niet om de 2 weken het gras heeft gemaaid.



**figuur 30: De totale productie op (200 cm<sup>2</sup>) na 6 weken vergeleken met de som van de producties van telkens 2 weken. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (\*: P < 0,05; \*\*: P < 0,01; \*\*\*: P < 0,001)**

Men kan duidelijk zien in figuur 30 dat grassen die niet gemaaid worden een hogere productie aan biomassa kunnen bereiken (\*\*: p < 0,001). Het volgende experiment bekijkt de afzonderlijke biomassaproductie wanneer er niet gemaaid wordt. Er werden verschillende chelatoren aan het medium toegevoegd. EDTA en citraat worden toegevoegd aan de potgrond in equimolaire verhouding ten opzichte van het Cd, de helft daarvan en het dubbel daarvan. De verkregen biomassa wordt weergegeven in tabel 11.

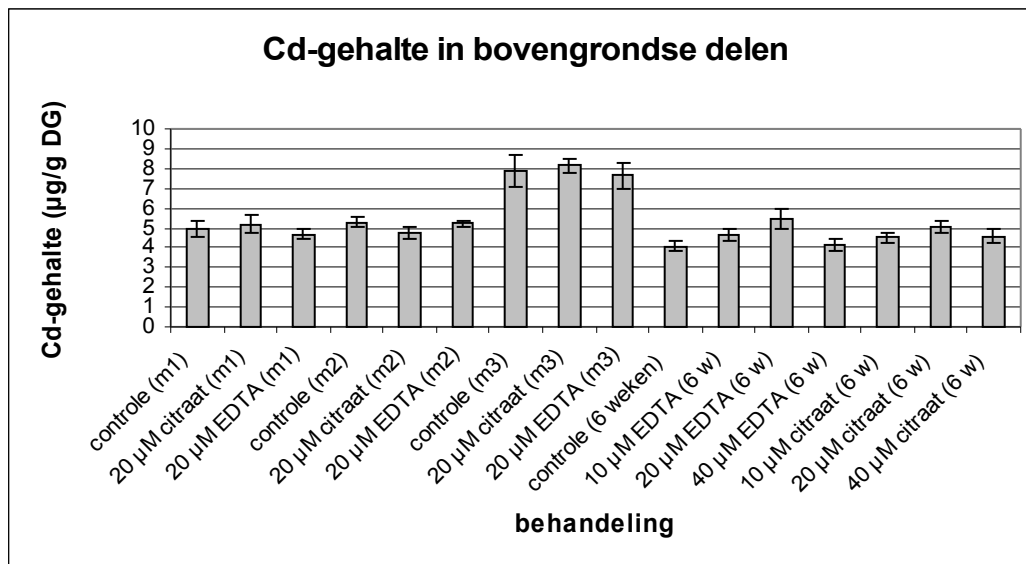


	Drooggewicht (g)
Controle	3,85
10 $\mu$ M EDTA	5,22
20 $\mu$ M EDTA	4,72
40 $\mu$ M EDTA	5,84
10 $\mu$ M citraat	4,95
20 $\mu$ M citraat	5,28
40 $\mu$ M citraat	6,56

tabel 11: Biomassaproductie na toevoeging van chelatoren, gemeten na 6 weken in bakjes van 10 bij 20 cm

### 3.2.6.2 De opname van cadmium door *Lolium perenne* uit met cadmium behandelde potgrond

Om de mogelijkheid van fyto-extractie te onderzoeken worden enkel de bovengrondse plantendelen in rekening gebracht. Er wordt bekeken hoe hoog de concentratie in bladeren kan oplopen. De eerste 9 meetresultaten in onderstaande figuur geven de resultaten weer van de concentratie in het afgemaaid gras, deze metingen gebeurden dus 2 wekelijks. De laatste 7 meetresultaten geven de concentratie weer na de volledige periode van 6 weken in gras dat nooit gemaaid werd.

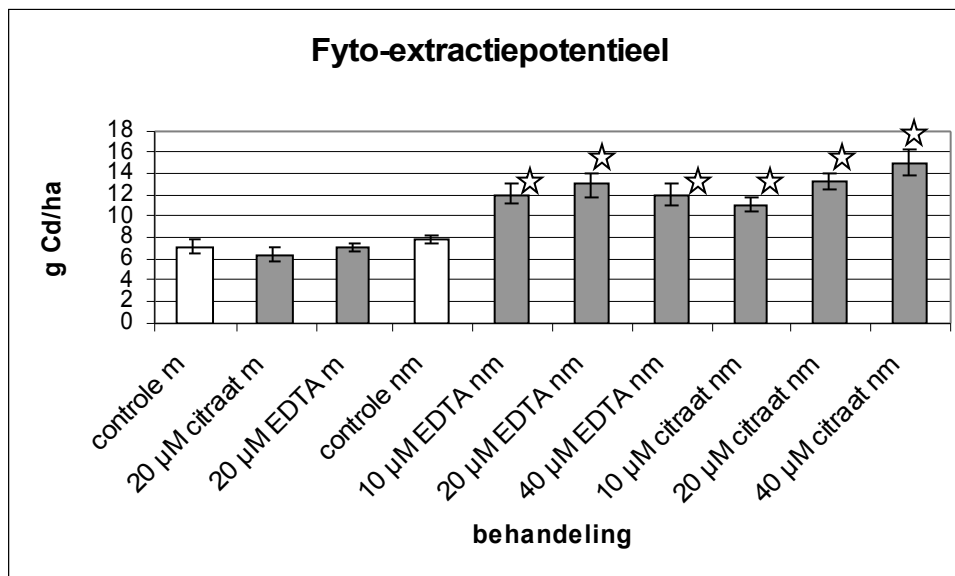


figuur 31: De invloed van de behandeling met chelatoren op de accumulatie van Cd in de bovengrondse delen m1, m2, m3 staan voor respectievelijk eerste, tweede en derde maaibeurt. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (\*: P < 0,05; \*\*: P < 0,01; \*\*\*: P < 0,001)

Men merkt een verhoogde concentratie aan Cd bij de derde maaibeurt ten opzichte van de eerste 2. Toevoeging van chelatoren zorgt eveneens voor een stijging ten opzichte van de controle. Maar de opgenomen hoeveelheid stijgt niet meer wanneer de equimolaire concentratie verdubbeld wordt.

### 3.2.6.3 Het fyto-extractiepotentieel

Als men de gegevens van tabel 11 en figuur 31 combineert kan men uitrekenen hoeveel Cd men uit de bodem kan halen per hectare grond na 6 weken, afhankelijk van de behandeling. Onderstaande grafiek vergelijkt de verschillende methodes.



**figuur 32: De totale hoeveelheid Cd die men in 6 weken tijd uit de bodem kan halen in functie van de behandeling (m = tweewekelijks maaien, nm = niet maaien).**

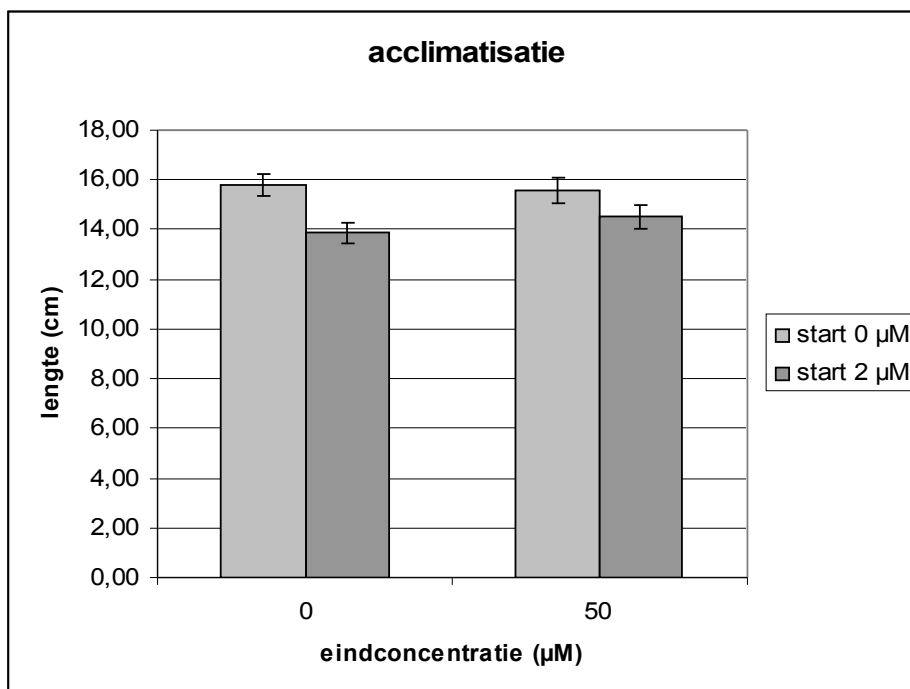
**Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor n = 3. (\*: P < 0,05; \*\*: P < 0,01; \*\*\*: P < 0,001)**

Men gebruikt een two-sample T-test om te kijken welke behandelingen significant hoger scoren dan andere. Als men de behandelingen met tweewekelijks maaien vergelijkt met de overeenstemmende behandelingen waarbij niet gemaaid wordt krijgt men volgende resultaten. Voor de controle-experimenten werden geen significante verschillen waargenomen. Er werden wel verschillen waargenomen voor planten waarbij EDTA (\*: P < 0,05) of citraat (\*\*: P < 0,01) in equimolaire hoeveelheden ten opzichte van Cd is toegediend. Er werd nagekeken of er verschillen werden waargenomen ten opzichte van de controle-experimenten. Deze werden gevonden

enkel voor het ongemaaide gras, de significanties zijn weergegeven in figuur 32. De grootste opnames werden gemeten wanneer Cd met de hoogste dosis citraat aan de bodem werd toegevoegd. Op die manier zou er  $15,0 \pm 1,2$  g Cd per hectare kunnen worden verwijderd uit de bodem.

### 3.2.7 Acclimatisatie van *Lolium perenne* aan cadmium

De experimenten voor middellange termijn worden gebruikt om te kijken of planten anders reageren op een acute hoge dosis, wanneer ze in een vroeg stadium reeds een lage dosis aan Cd moeten verwerken. Er worden planten gekweekt die gedurende de eerste twee weken  $2 \mu\text{M}$  Cd krijgen en controleplanten die geen Cd toegediend krijgen. Na deze periode werden de planten heringedeeld: nu werd een deel blootgesteld aan  $50 \mu\text{M}$  en het andere deel kreeg weer geen Cd voorgeschoteld. We krijgen zo vier testgroepen. Na één week bij de nieuwe concentratie werden de lengtes van de bladeren bepaald.



figuur 33: De gemiddeldes van de 4 testgroepen. Foutenvlaggen geven de standaardfout weer, voor  $n = 24$ . Een lichtgrijs balkje stelt de lengte voor van grassen die gedurende de eerste 2 weken geen Cd toegediend kregen, een donkergrijs balkje betekent een concentratie van  $2 \mu\text{M}$  Cd in het groeimedium. De 2 linkse balkjes stellen grassen voor die geen Cd kregen in de derde week, de rechtse balkjes slaan op de grassen die  $50 \mu\text{M}$  Cadmium kregen in week 3.

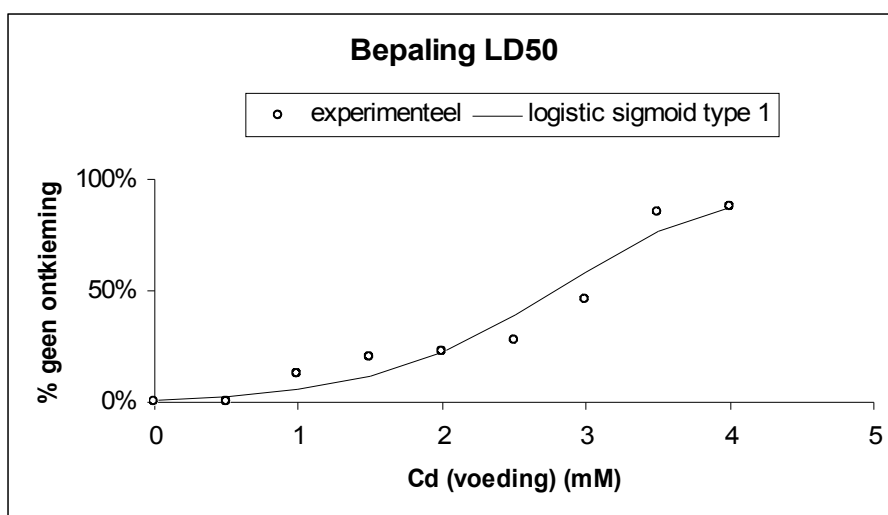
Op figuur 33 kunnen we duidelijk zien dat er verschillen zijn tussen de verschillende testgroepen. Uit significantieonderzoek leiden we er volgende af. Enerzijds zijn planten opgekweekt bij 2µM kleiner dan de controle wanneer deze groepen daarna geen Cd meer toegediend kregen (\*\*:  $p < 0,01$ ). Ook zijn planten die pas in de derde week een hoge dosis Cd dienden te verwerken groter dan planten die enkel in de eerste weken een lage dosis te verwerken hadden (\*:  $p < 0,05$ ). Planten die een lage dosis Cd kregen toegediend in de eerste weken worden niet groter dan controleplanten wanneer in de laatste week een hoge dosis wordt toegediend.

### 3.2.8 Bepaling van de LD<sub>50</sub> van *Lolium perenne* voor cadmium

De concentraties Cd in het groeimedium die getest werden, variëren van 0 tot 4 mM. Het percentage zaadjes dat niet ontkiemde werd uitgezet in functie van de concentratie in het groeimedium. Om de LD<sub>50</sub> te bepalen werd op deze gegevens een sigmoïde gefit. Voor de fitting werd gebruik gemaakt van de logistische sigmoïde van het eerste type, met volgende vorm:

$$y = \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{b-x}{c}\right)}$$

De parameter a moet gelijk zijn aan 1 want de maximale inhibitie is 100 %. De 'y'-waarde geeft het percentage weer en de 'x'-waarde is de concentratie. De parameters b en c worden bepaald met de functie oplosser van Excel. Deze parameter b is gelijk aan de LD<sub>50</sub>.



figuur 34: Alle gemeten percentages en de gefitte logistische sigmoïde functie.

De gevonden waarden voor b en c zijn respectievelijk 2,78 en 0,63. De LD<sub>50</sub> van *Lolium perenne* voor Cd is dus 2,78 mM. Hieronder staat in de tabel vermeld hoe het Cd zich gedraagt wanneer deze in verschillende concentraties aan het MS-medium wordt toegediend

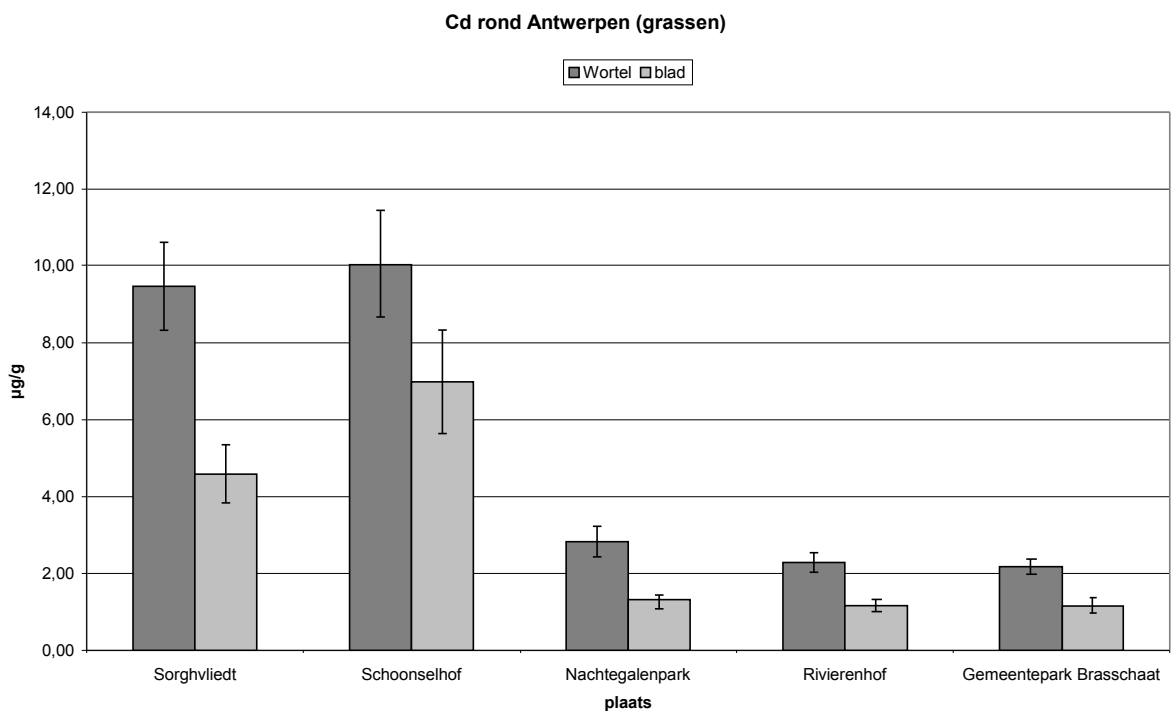
totaal Cd (mM)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
verbindingen	%	%	%	%	%	%	%	%
Cd <sup>2+</sup>	46,0	51,2	53,9	55,8	57,3	58,6	59,7	60,8
CdHPO <sub>4</sub> (aq)	20,5	20,6	19,7	18,6	17,6	16,6	15,7	14,9
CdEDTA <sup>2-</sup>	15,1	7,8	5,3	4,0	3,2	2,7	2,3	2,0
CdCl <sup>+</sup>	11,3	12,4	12,9	13,1	13,3	13,4	13,4	13,5
CdSO <sub>4</sub> (aq)	2,8	3,1	3,2	3,2	3,3	3,3	3,3	3,3
CdNO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	2,5	2,8	2,9	3,0	3,1	3,1	3,2	3,2
CdNH <sub>3</sub> <sup>2+</sup>	1,6	1,7	1,8	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0
CdCl <sub>2</sub> (aq)	0,18	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cd(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (aq)	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
CdOH <sup>+</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
CdI <sup>+</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Cd(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

**tabel 12: Cadmium-speciatie in MS-medium (zie materiaal en methode voor samenstelling) berekent met Visual MINTEQ**

### 3.3 Bepaling van de contaminatie van cadmium in grassen in de omgeving van Antwerpen

#### 3.2.1 Cadmiumconcentratie in wortels en bladeren op 5 controlepunten

Zoals vermeld in het deel materiaal en methode zijn er 5 punten waar stalen zijn genomen. De concentraties die na destructie konden gemeten worden, zijn uitgemiddeld in volgende figuur

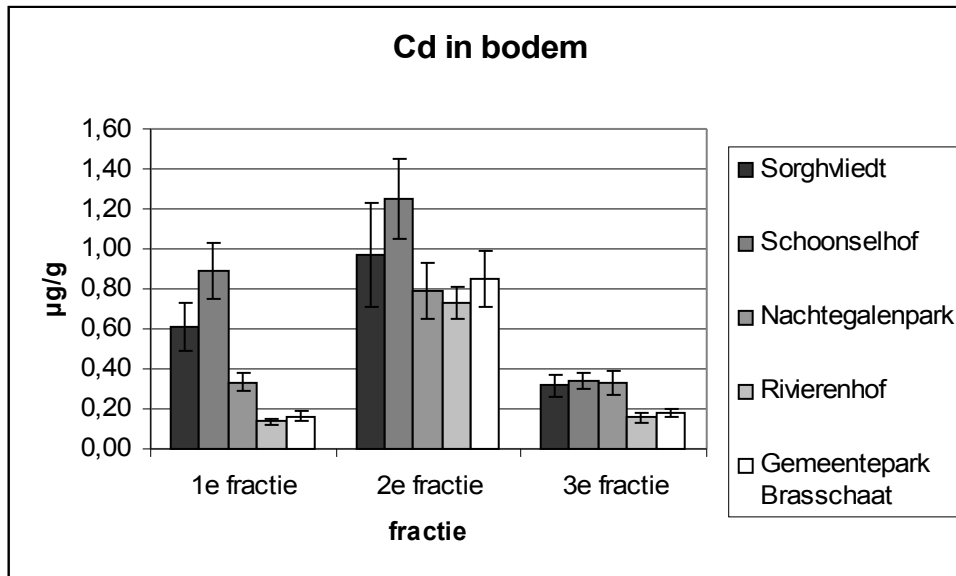


**figuur 35: De gemiddelde concentratie Cd in wortels en bladeren van grassen die voorkomen op 5 plaatsen rond Antwerpen met hun standaardfout**

Alle significanties werden getest met een two sample T-test tussen enerzijds ofwel de metingen in grassen uit Sorghvliedt ofwel metingen in grassen uit Schoonselhof en anderzijds één van de andere drie parken met slechts achtergrondconcentraties. De eerste 2 blijken duidelijk hogere gehalten aan Cd te bevatten in bladeren en wortels van grassen (\*\*\*:  $p < 0,001$ ). Als men voor alle gemeten grassen de verhouding tussen de concentratie in wortel en blad meet krijgt men  $1,92 \pm 0,13$

### 3.3.3 Concentratie cadmium in bodems rond Antwerpen

Het Cd dat teruggevonden werd in de bodemstalen werd verdeeld in 3 fracties. Fractie 1 is het zwak gebonden, fractie 2 het matig gebonden en fractie 3 het sterk gebonden Cd. De figuur toont de gegevens gebundeld per fractie.

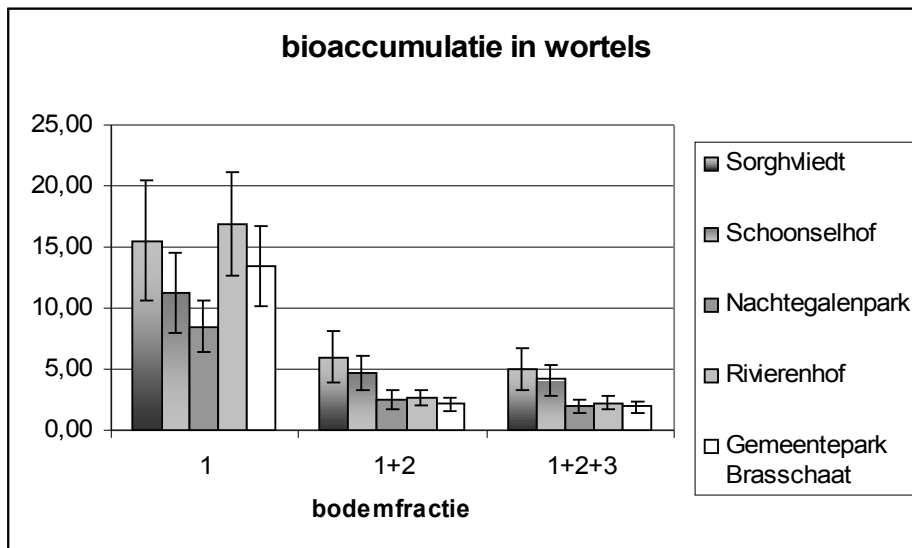


figuur 36: De gemiddelde concentratie in verschillende bodemfracties op plaatsen rond Antwerpen, met standaardfout

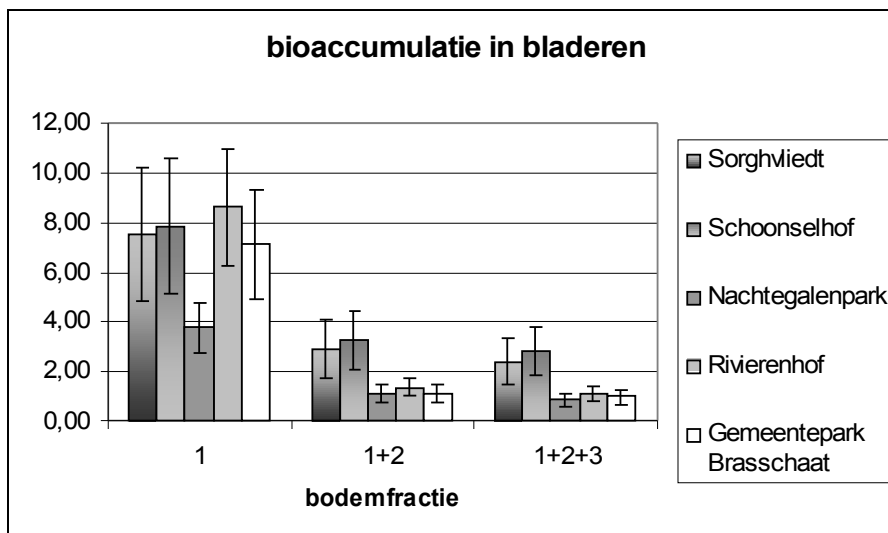
Men kan duidelijk zien dat de zuidelijke parken meer Cd in de bodem herbergen. Dit merkt men vooral voor de zwakst gebonden fracties.

### 3.3.4 Bepaling van de biobeschikbare fracties

Door een vergelijking te maken tussen enerzijds het Cd-gehalte in de grassen en anderzijds de hoeveelheid Cd die sterk of minder sterk gebonden is. Men gaat uit van drie mogelijke bodemfracties die beschikbaar zijn: de eerste fractie, de som van de eerste 2 fracties of de som van alle 3 de fracties. De laatste benadert het totaal aanwezige Cd. De berekening geeft de bioaccumulatie in wortels en bladeren weer vergeleken met de voorgestelde biobeschikbare fractie.



figuur 37: De bioaccumulatie in wortels vergeleken voor de verschillende parken



figuur 38: De bioaccumulatie in bladeren vergeleken voor de verschillende parken

In bovenstaande figuren kan worden nagegaan of er een trend kan worden waargenomen die doorgezet wordt door de gegevens waaruit deze zijn berekend. Men bekijkt ook de interne variatie om de biobeschikbare bodemfractie aan te duiden.

fractie		gemiddelde bioaccumulatie	absolute fout	relatieve fout
1	wortel	13,12	1,51	0,11
	blad	6,97	0,84	0,12
1+2	wortel	3,60	0,75	0,21
	blad	1,95	0,47	0,24
1+2+3	wortel	3,01	0,64	0,21
	blad	1,64	0,41	0,25

tabel 13: De verschillende mogelijke biobeschikbare fracties vergeleken



Er kunnen geen grote verschillen optreden tussen de bioaccumulatie in de verschillende parken daar deze min of meer constant is in functie van de bodemconcentratie, zeker bij lage concentraties. Men moet testen voor welke potentiële biobeschikbare fractie de onderlinge verschillen tussen de parken het kleinst zijn. De relatieve fout op het gemiddelde is een goede maat voor de interne variatie. Deze is zowel voor wortels als voor bladeren het laagst wanneer enkel de eerste fractie wordt beschouwd.

### 3.3.5 Samenstelling van de bodem

De samenstelling van de bodem werd gemeten voor de verschillende staalnamepunten. Onderstaande tabel toont de resultaten. De som van de percentages zand; leem en klei is gelijk aan 100 %. Het organisch gehalte (% org) komt hier bovenop.

	%Klei	%leem	%zand	%org	pH
Brasschaat	5,4%	4,6%	90,0%	5,6%	4,45
Rivierenhof	3,5%	23,6%	72,9%	3,3%	5,15
Nachtegalenpark	3,7%	15,5%	80,8%	3,5%	6,43
Schoonselhof	2,3%	16,9%	80,8%	4,2%	4,19
Sorghvliedt	2,0%	16,0%	82,0%	3,6%	3,29

tabel 14: De samenstelling van de bodems waar staalname plaatsvond

### 3.3.6 Verspreiding van cadmium via de lucht

Om een idee te krijgen van de mogelijke oorsprong van de vervuiling wordt een dispersieberekening uitgevoerd. De basisformule is de volgende (Baeyens et al., 2003):

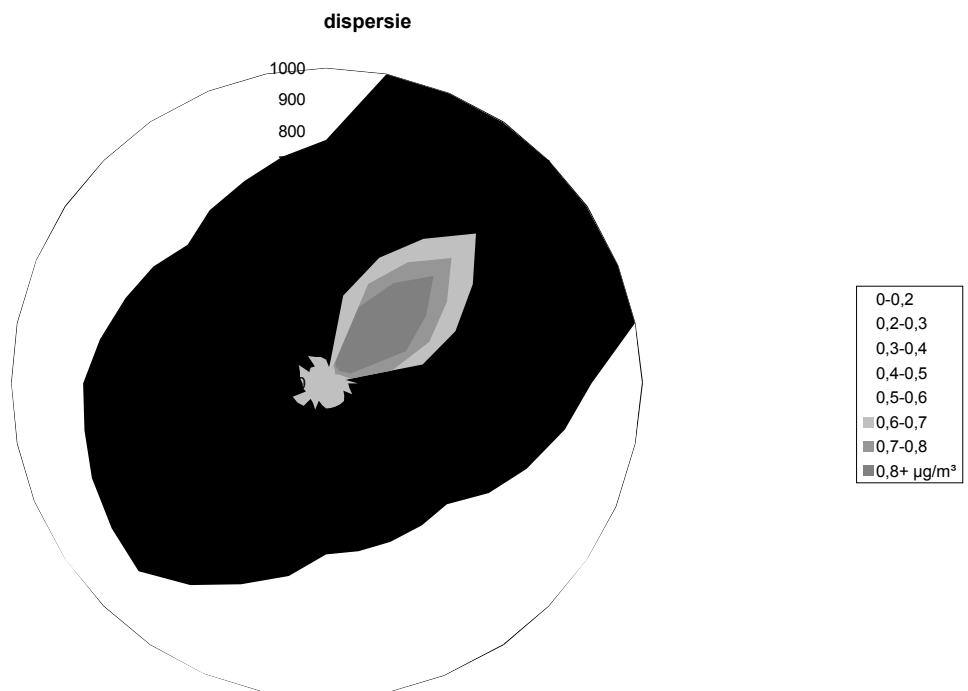
$$C(x, y, 0) = \frac{10^6 \cdot Q}{3600 \cdot \pi \cdot u_n \cdot A \cdot B \cdot x^{(a+b)}} \cdot e^{-\frac{(y^2 + h^2)}{2 \cdot B \cdot x^b}}$$

Q is het debiet in kg/u,  $u_n$  is de windsnelheid, A, B, a en b zijn parameters afhankelijk van het windtype (E1 tot E7), x en y zijn de coördinaten ten opzichte van de bron. Men dient de verspreiding in elke windrichting na te gaan en deze voor elke plaats rond de bron te sommeren. Men moet rekening houden met de windroos, dus het percentage van voorkomen van elke windrichting) in Antwerpen en het percentage van voorkomen van de windtypes.

Weertoestand	A	a	B	b	Percentage van voorkomen
E1	0.235	0.796	0.311	0.711	18,8%
E2	0.297	0.796	0.382	0.711	15,1%
E3	0.418	0.796	0.52	0.711	48,6%
E4	0.586	0.796	0.7	0.711	10,9%
E5	0.826	0.796	0.95	0.711	4,9%
E6	0.946	0.796	1.321	0.711	1,7%
E7	1.043	0.698	0.891	0.669	0%

**tabel 15: De verschillende windtypes met hun dispersieparameters en hun percentage van voorkomen**

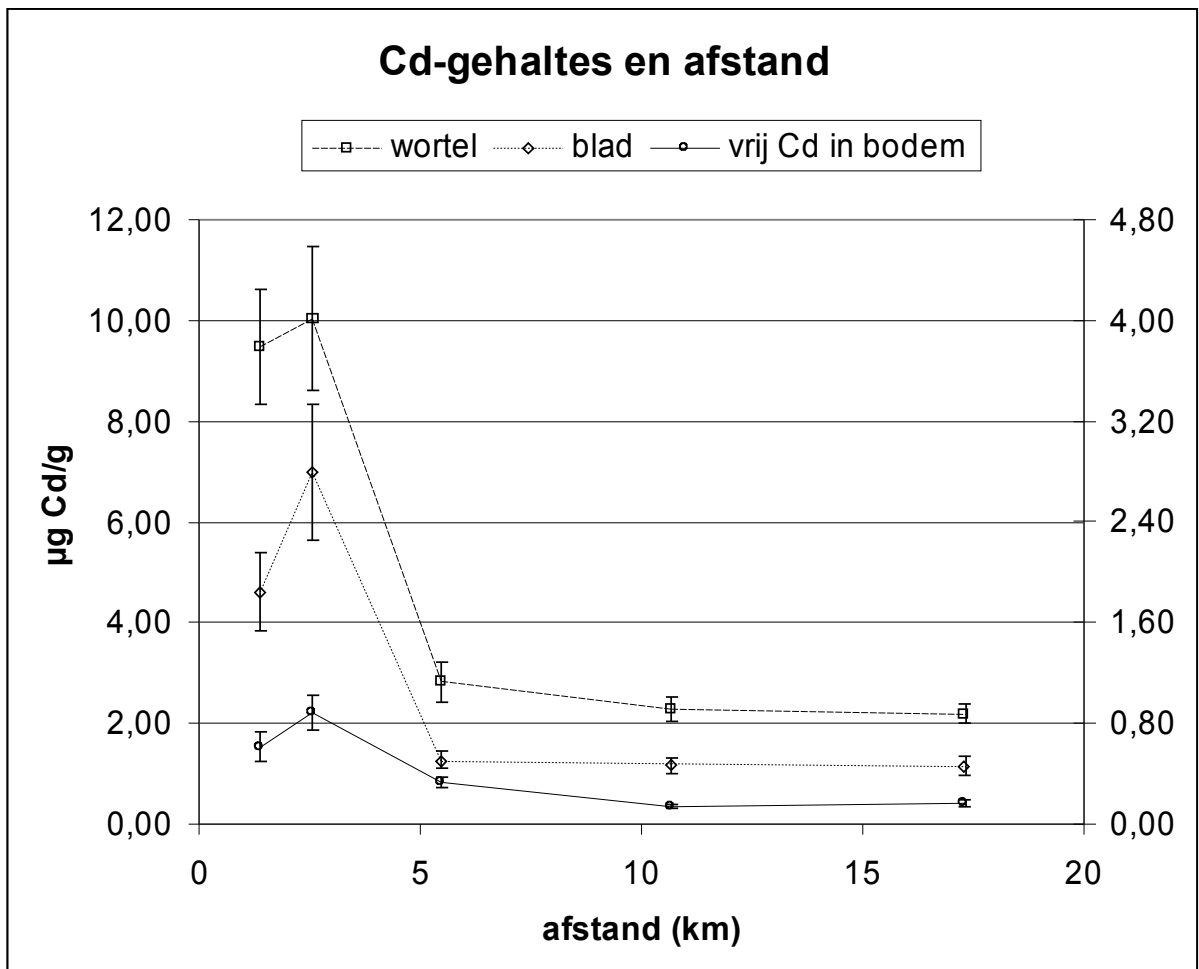
Men verdeelt de windroos in 32 segmenten om de nauwkeurigheid te verhogen. De berekeningen worden uitgevoerd voor elke windrichting over een afstand van 1 km vanaf de bron en met intervallen van 5 m. Voor elk van deze 6400 punten moet de som gemaakt worden van de concentratie berekend uit bovenvermelde formule voor de 16 aangrenzende windrichtingen met telkens de aangepaste x en y coördinaten voor dat punt ten opzichte van deze richting.



**figuur 39: Dispersieberekening voor een uitstoot van 1 kg/u resultaten weergegeven  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  op dagbasis. Het gebied heeft een straal van 1 km**

### 3.3.7 Bepaling van de vervuiling in functie van de afstand

Als referentie nemen we de fabrieksterreinen van de non-ferro-industrie. Van klein naar groot werden de volgende afstanden gemeten tussen de smelter enerzijds en een staalnamepunt anderzijds: 1367 m, 2564 m, 5486 m, 10674 m en 17265 m. De afstanden kunnen uitgezet worden op de X-as van een grafiek. In deze grafiek worden de cadmiumgehalten weergegeven bij de overeenkomende afstand van de staalnamepunten.



figuur 40: De afhankelijkheid van de vervuiling in wortels, bladeren en bodem ten opzichte van de afstand, weergegeven met standaardfout. Bladeren en wortelen zijn weergegeven op de linker Y-as; Het vrij Cd is weergegeven op de rechter-as (ook in µg/g)

## 4 Discussie

*“In de dalen van de domheid groeit voor de filosofen nog altijd meer gras dan op de kale  
hoogvlakten van de schranderheid.”  
(Ludwig Wittgenstein)*

### 4.1 *Lolium perenne* en cadmium: mogelijkheid tot fyto-extractie

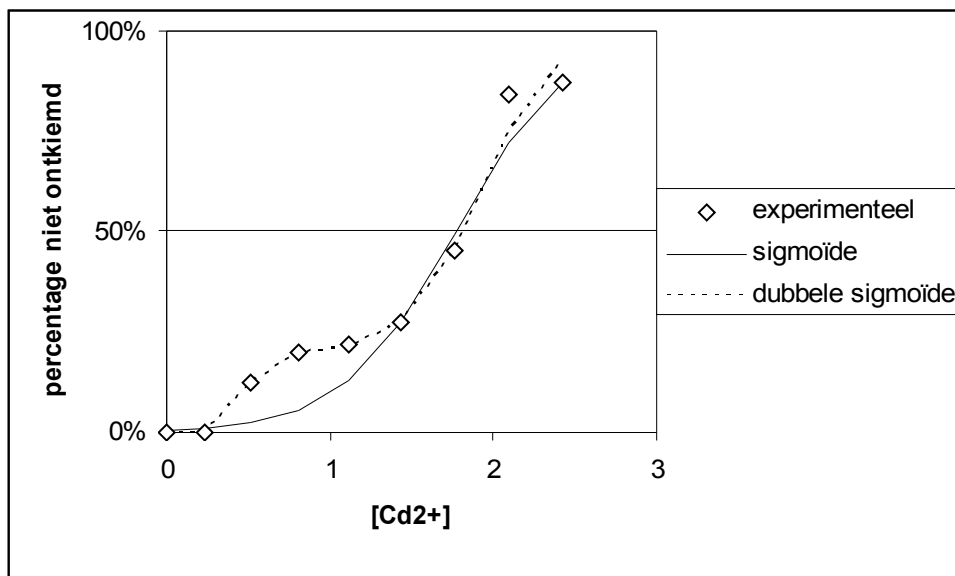
De eerste doelstelling betreft de vraag of grassen, met als voorbeeld *Lolium perenne*, kunnen gebruikt worden voor de sanering van bodems via fyto-extractie. Deze vraag valt uiteen in twee delen: (1) kan *Lolium perenne* hoge cadmiumconcentraties verdragen, en zal deze plant bij ecologisch relevante concentraties aan Cd veel hinder ondervinden om normaal te functioneren, en (2) welke hoeveelheid Cd kan door *Lolium* worden opgenomen en hoe snel kan een significant deel van de contaminatie van een bodem worden opgenomen.

#### 4.1.1 Cadmiumtolerantie van *Lolium perenne*

De tolerantie werd in eerste instantie bestudeert via het bepalen van een LD<sub>50</sub> van *Lolium perenne* voor Cd. Deze werd gemeten aan de hand van het percentage zaadjes dat niet kan ontkiemen bij een bepaalde concentratie Cd. Bij concentraties onder de 500 µM worden geen invloeden vastgesteld op dit percentage. Boven de 5 mM was geen enkel zaadje in staat om te ontkiemen. De concentraties hiertussen werden nauwkeuriger onderzocht en de resultaten zijn weergegeven in figuur 34. We gaan ervan uit dat het percentage dat niet ontkiemt een sigmoïdale vorm heeft in functie van de cadmiumconcentratie in het medium (Park et al., 2001). Een fitting van een sigmoïde op de metingen geeft ons een LD<sub>50</sub> van 2,78 mM. deze waarde is lager dan we zouden verwachten, want op basis van de gemeten waarde bij 3 mM, zou daar de 50 % nog niet bereikt zijn. Als men hiermee rekening houdt zou men in plaats van 1 sigmoïde de metingen kunnen voorstellen als de som van 2 sigmoïden op deze manier zou een hogere concentratie voor de LD<sub>50</sub> gevonden worden, namelijk 3,08 mM. Dit is bijna dezelfde waarde die men vindt als men grafisch zou schatten op basis van de gegevens. Dit is logisch, de curve met 2 sigmoïden volgt de metingen zeer goed omdat er 5 vrijheidsgraden zijn voor slechts 9 punten. In het geval men de gegevens probeert

te benaderen met slechts een sigmoïde heeft men slechts 2 vrijheidsgraden. Normaal heeft een sigmoïde 3 vrijheidsgraden, maar er gaat er een verloren in de bijkomende voorwaarde dat het theoretische maximum gelijk moet zijn aan 100 %.

Er kan opgemerkt worden dat de planten geen natuurlijke omstandigheden voorgeschoteld kregen. Deze opmerking is uiteraard terecht: wanneer men de speciatie bekijkt van het Cd in het toegediende medium, merkt men dat men bij deze concentraties Cd problemen heeft met de complexvorming met EDTA. De concentraties Cd zijn hoger dan de beschikbare hoeveelheid EDTA, bijgevolg zal er nog relatief veel Cd in ongebonden toestand in het milieu voorkomen. Als we de  $LD_{50}$  berekenen op basis van het vrij  $Cd^{2+}$ , dan is deze ongeveer de helft van de deze op basis van het totaal Cd, namelijk 1,77 mM  $[Cd^{2+}]$ . Wanneer men hier een dubbele sigmoïde berekent, zou de  $LD_{50}$  geschat worden op 1,81 mM  $[Cd^{2+}]$ . De betekenis van deze waarde is bediscussieerbaar, cadmium zal namelijk nooit voorkomen in volledig gedissocieerde vorm. Hoewel de zeer goed oplosbare zouten van Cd wel de volledige dissociatie zullen benaderen, is het zeer twijfelachtig of er in de praktijk omstandigheden zijn waar Cd-zouten de oplossing niet delen met andere producten die meer invloed hebben op de speciatie van Cd.



figuur 41: Berekening van de  $LD_{50}$  op basis van het ongebonden  $Cd^{2+}$

### 4.2.3 Invloed op de groei

In een eerste experiment werd de bladlengte gemeten. De eerste twee weken werden er nog geen verschillen waargenomen tussen grassen die verschillende hoeveelheden Cd kregen toegediend. Er werd gekozen voor concentraties tussen 0 en 20  $\mu\text{M}$  Cd, daar deze nog ecologisch relevant zijn voor België, in Lommel werd namelijk 9  $\mu\text{M}$  Cd teruggevonden in het poriewater (Vangronsveld, 2006). De verschillen laten zich pas merken in de derde week. Bladeren van *Lolium* opgekweekt in een milieu dat 20  $\mu\text{M}$  Cd bevat zijn significant kleiner dan planten opgekweekt in een soortgelijk milieu zonder Cd. Dezelfde trend kan men waarnemen bij wortels, maar zelfs na 3 weken zijn deze verschillen nog niet significant. Omdat van alle planten zowel de wortel als bladstengel werd gemeten, kan men deze 2 ook optellen. De totale lengte van *Lolium perenne* wordt duidelijk beïnvloed door de hoeveelheid Cd in het groeimedium. Er werden significante verschillen gevonden na 3 weken wanneer men de planten opgekweekt in de aanwezigheid van 20  $\mu\text{M}$  Cd vergelijkt met de controleplanten. De verschillen zijn hier nog meer uitgesproken.

Alle lengtes werden nog eens onderzocht met een ANOVA. Zo een analyse brengt het effect van tijd in mindering om zo alle verschillende waarden in functie van de concentratie te beoordelen, en vice versa. Uiteraard is er een significant effect van de tijd op de lengte van zowel bladeren als wortels en dus ook de totale lengte. De planten blijven immers groeien de eerste drie weken. Maar men stelt duidelijk vast dat er voor de drie parameters ook een significant effect is van de concentratie op de lengte. Significante interactie werd vastgesteld voor bladlengte en totale lengte, het komt er dus op neer dat de effecten van Cd op de lengtes van *Lolium* een gevolg zijn van tijd én concentratie en dat de plant, of liever de lengte ervan, anders zal reageren op een verschil in concentratie per tijdstip. Algemeen kan men besluiten dat Cd de groei van *Lolium perenne* afremt, dit effect wordt zichtbaar vanaf de derde week en duidelijker wanneer het toegediende Cd stijgt. De afname van de groei is een gevolg van de inhibitie van de elongatie van de cellen (Sanità di Toppi en Gabrielli, 1999).

### 4.2.4 Acclimatisatie

Omdat in voorafgaande experimenten werd vastgesteld dat de lengte van de grassen behandeld met Cd pas na drie weken een significante invloed ondervond, wordt nu de

invloed van deze derde week afzonderlijk getest van de eerste twee weken. Men merkt dat planten die gedurende de eerste weken dezelfde concentratie Cd in hun groeimedium hadden, hetzij 0  $\mu\text{M}$ , hetzij 2  $\mu\text{M}$ , geen verschil in lengte meer ontwikkelen in de derde week wanneer er al dan niet een concentratie van 50  $\mu\text{M}$  Cd wordt aangeboden in het groeimedium. Men merkt wel significante verschillen wanneer er gedurende de eerste twee weken een verschillende concentratie Cd werd aangeboden, 0  $\mu\text{M}$  of 2  $\mu\text{M}$  Cd, en wanneer de concentratie op het einde gelijk was hetzij 0  $\mu\text{M}$ , hetzij 50  $\mu\text{M}$ . Men kan dus besluiten dat de belangrijkste invloed van Cd op de lengte van *Lolium perenne* zich in de eerste 2 weken afspeelt. Deze invloed komt gedurende de eerste weken nog niet duidelijk tot uiting omdat de groeisnelheid in deze periode nog voor een groot stuk wordt geregeld door de nutriënten die zich in het graszaadje bevonden.

#### 4.2.5 Fotosynthese en fluorescentie

De  $F_v/F_m$ -waarde wordt gebruikt als een maat voor de gezondheid van een plant. Deze zal stijgen in functie van de tijd dat een plant in het donker verblijft. Planten die gedurende enige tijd licht hebben gekregen hebben mechanismen in zijn werk gezet om dit licht via bepaalde wegen op te nemen en dus niet terug te weerkaatsen. Wanneer de planten gedurende enige tijd in het donker staan worden deze mechanismen geleidelijk terug uitgezet. De tijd voor volledige donkeradaptatie werd bepaald aan de hand van de resultaten in figuur 25. Na 20 minuten bereikt de  $F_v/F_m$ -waarde die dus recht evenredig is met de reflectie al bijna zijn maximum. Er wordt gekozen om alle planten 30 minuten in het donker te plaatsen.

Indien deze tijd constant blijft kan men deze parameter ook onderzoeken in functie van de concentratie Cd in het groeimedium. Het Cd zou de plant in die mate kunnen beïnvloeden dat ofwel de procedure voor donkeradaptatie trager verloopt, ofwel de maximale reflectie kleiner wordt. In beide gevallen zou deze mindere gezondheid van de plant resulteren in een lagere  $F_v/F_m$ -waarde bij de planten die zijn gekweekt bij hogere Cd-gehalten in de voeding. figuur 26 toont dat deze veronderstellingen correct blijken en er een statistisch verantwoord verschil is tussen planten die gekweekt zijn bij 10 of 20  $\mu\text{M}$  en controleplanten die geen Cd toegediend kregen. Deze effecten waren wel pas merkbaar 24 dagen na het zaaien van de graszaden. Zoals men weet uit vorige testen blijft de concentratie opgenomen Cd in de loop der tijd min of meer constant. Toch heeft deze aanwezige Cd enige tijd nodig om effect op het fotosysteem

uit te oefenen, zo blijkt uit de studie van de  $F_v/F_m$ -waarde. Dit is vergelijkbaar met de resultaten uit de studie van de groei-inhibitie.

Er zijn echter ook ander effecten die onderzocht kunnen worden en die kunnen eventueel al vroeger enkele invloeden van het Cd aan het licht brengen. Naast de maximale reflectie, dus vlak na donkeradaptatie, kan men ook testen hoe snel een plant zich terug aanpast aan de omstandigheden wanneer er wel licht ter beschikking is. Men onderzoekt verschillende parameters. De efficiëntie van fotosysteem 2, de fotochemische quenching en de niet-fotochemische quenching al deze variabelen gedragen zich sigmoïdaal in functie van de tijd na dat de planten terug bij daglicht worden geplaatst (D'Haese et al., 2004).

Zoals in materiaal en methode besproken komen 3 parameters aan bod. Tau is de tijdsverschuiving van de sigmoïde, deze parameter bepaalt wanneer bepaalde systemen in werking treden, hoe hoger deze parameter, des te trager de systemen zich aanpassen aan het licht. De Hill-coëfficiënt bepaalt de hellingsgraad van de sigmoïde in het steilste stuk. Deze parameter zal in het geval van *Lolium* nooit veel groter dan 1 blijken te zijn en dus nooit van betekenis in deze experimenten. Wanneer deze parameter gelijk is aan 1 krijgen we geen sigmoïde maar een Monod-kinetiek. De derde parameter is de Plat-waarde. Dit is de maximale waarde die de sigmoïde kan aannemen. Wanneer deze waarde minder hoog blijkt te liggen, kan men stellen dat de systemen zich minder sterk kunnen aanpassen aan de situatie om lichtenergie gunstig te benutten in de cel. Deze is dimensieloos voor de onderzochte variabelen, de waarde wordt pas na oneindig lang wachten bereikt, maar kort nadat Tau gepasseerd is zullen de waarden hier al in de buurt liggen.

Voor de efficiëntie van fotosysteem 2 werden geen significante verschillen gevonden. Men kan wel vermoeden dat er een daling is van de Plat waarde 17 dagen na het zaaien. Deze daling in functie van de concentratie in het groeimedium is niet significant, maar er kan een duidelijke trend worden vastgesteld.

De fotochemische quenching werd ook bepaald voor de verschillende tijdstippen en concentraties. Deze variabele hangt nauw samen met de eerste, welke een maat voor de hoeveelheid licht die wordt omgezet via de elektronentransportketen en gebruikt kan worden voor fotosynthese, is. De fotochemische quenching is een maat voor het aantal reactiecentra dat in werking is om deze energie om te zetten, het theoretische maximum van deze variabele is 1. Men herkent na 10 dagen al een trend dat de



fotochemische quenching een grotere tijdsverschuiving heeft naarmate de toegediende Cd toeneemt. Deze trend wordt bevestigd door een significant verschil na 10 dagen tussen de Tau waarden gemeten bij 20  $\mu\text{M}$  en deze gemeten bij de controle. Een andere trend die enigszins bevestigd wordt is deze na 17 dagen voor de Plat waarden. Hogere dosissen Cd blijken het maximale aantal open plaatsen voor energieomzetting naar fotosynthese toe te beperken.

De niet-fotochemische quenching wordt aan de hand van twee variabelen beschreven. De qNP-waarde en de NPQ waarde beschrijven beiden hetzelfde fenomeen. De NPQ is lineair gerelateerd aan de dissipatie van de warmte en kan waarden van 1 tot oneindig aannemen. De qNP heeft een maximum van 1 en is dus ongevoeliger voor veranderingen, wanneer NPQ zeer hoge waarden zou aannemen. We vinden op dezelfde tijdstippen voor de twee variabelen dezelfde trends terug, deze trends komen overeen met de trends die we voor de fotochemische quenching terugvonden. Bij 10  $\mu\text{M}$  Cd in het groeimedium vinden we na 17 dagen een significante afname van de Plat waarde vergeleken bij de controle, eveneens gemeten na 17 dagen. Bij een dosis van 20  $\mu\text{M}$  vinden we na 10 dagen al een vertraging van de start van de niet-fotochemische quenching, met andere woorden Tau stijgt in functie van de concentratie.

Het is merkwaardig om vast te stellen dat men steeds dezelfde trends kan vaststellen voor de verschillende processen van energieomzetting die plaatsvinden in de plantencellen. Dit zou te wijten kunnen zijn doordat het Cd in een zeer vroeg stadium van deze energieoverdracht reeds zijn invloed kan uitoefenen, en dus zo meerdere processen kan hinderen. Een ander opmerkelijk feit is de verschuiving van de invloed van Cd op de processen. Na 10 dagen merken we duidelijk dat de 10  $\mu\text{M}$  Cd de fotochemische en niet-fotochemische quenching hindert door er voor te zorgen dat de planten langer moeten wachten nadat het licht wordt om hun maximale capaciteit voor energieomzetting te benutten. Eén week later kan men dit effect veel minder vaststellen maar blijkt het Cd de maximale capaciteit van deze processen te verminderen. Speelt Cd hier nog steeds dezelfde rol en is het door andere mechanismen van de plant dat de effecten wijzigen, of is het enkel het Cd dat anders gaat inwerken? Nog een week later kan men deze effecten niet meer specifiek aanwijzen, maar na 24 dagen kan men wel een totaal effect meten dat de reflectie lager wordt bij waarden vanaf 10  $\mu\text{M}$  Cd in de voeding aan de hand van de  $F_v/F_m$ -waarde.

Het feit dat men geen significante verschillen meer meet in de curven van de verschillende variabelen, is misschien te wijten aan het relatieve karakter van deze curven: de waarden die aan de basis liggen van de afname van  $F_v/F_m$  worden ook gebruikt in de andere berekeningen als een referentiewaarde. Het is ook mogelijk dat de tijd voor donkeradaptatie niet lang genoeg is voor deze planten, waardoor de metingen niet volledig synchroon lopen en dus moeilijker te vergelijken zijn. Als men de planten langer in het donker laat kan deze  $F_v/F_m$ -waarde eventueel nog verder stijgen zodat hier geen verschillen meer merkbaar zijn, dan is het aannemelijk dat de planten weer wel verschillen in het verloop van de variabelen gaan vertonen. De donkeradaptatie zou te kort zijn waardoor de planten eigenlijk met een tijdsvoorsprong aan de experimenten in het licht beginnen, helaas zijn hier geen gegevens van teruggevonden in de literatuur. In de hyperaccumulator *Sedum alfredii* werden geen invloeden van cadmium vastgesteld op de chlorofyl fluorescentie, daling van de  $F_v/F_m$ -waarde werd toegeschreven aan een daling van het watergehalte in de bladeren (Zhou en Qiu, 2005). In *Zea Mays* werd een invloed van cadmium vastgesteld op de chlorofyl fluorescentie onder de vorm van een daling van de  $F_v/F_0$ -waarde bij concentraties van 200  $\mu\text{M}$  Cd (Drażkiewicz et al., 2003). De  $F_v/F_m$ -waarde werd slechts matig beïnvloed en dit bij een concentratie die een orde groter ligt dan de 20  $\mu\text{M}$  waarbij *Lolium* getest werd. Ook al kan men in bepaalde omstandigheden verschillen opmerken tussen planten opgekweekt bij cadmiumconcentraties tot 20  $\mu\text{M}$ , er kan wel gesteld worden dat deze verschillen nooit zeer groot zijn. Bij deze ecologisch relevante concentraties is *Lolium perenne* dus voldoende tolerant.

#### 4.2.6 Opname van cadmium

De opname van Cd in *Lolium perenne* is een belangrijk gegeven met het oog op fytoremediatie, en er diende een idee gevormd te worden van de hoeveelheid Cd die door de planten gestockeerd kan worden. Men meet telkens hogere opnames wanneer de planten meer Cd ter beschikking hebben. Men vindt dezelfde resultaten zowel in wortels als in bladeren terug.

De vraag wordt gesteld of er opmerkelijke resultaten worden waargenomen, wanneer de factor tijd mee in rekening gebracht wordt. Planten werden onderzocht na 1 en na 2 weken. Er werden weinig verschillen ontdekt tussen de concentratie die men in de plantendelen terugvindt in functie van de tijd, de netto opnamesnelheid is dan evenredig met de biomassaproductie. Bij de lage concentraties is men geneigd te

denken dat de opname zelfs afneemt in relatie tot de groei, terwijl men bij 20  $\mu\text{M}$  voor bladeren en vanaf 10  $\mu\text{M}$  bij wortels een stijging bemerkt in de weefselconcentratie in de tweede week. Deze verschillen zijn niet als significant te catalogeren, wanneer men aan de hand van een two sample T test de resultaten na 1 week vergelijkt met die na 2 weken. Men kan dit effect toewijzen aan het feit dat voor de hogere concentratie nog geen volledig evenwicht is bereikt na 1 week, maar we kunnen geen besluiten trekken. Ook wanneer er een two way ANOVA wordt uitgevoerd merken we alleen verschillen in de opnames in functie van de concentratie in het groeimedium. Zowel voor bladeren als wortels worden geen verschillen in functie van de tijd vastgesteld.

Bij wortels komt het effect van een mogelijke stijging in de tweede week duidelijker naar voor, dus is het interessant om de verhouding te onderzoeken tussen blad en wortel. Deze verhouding kan men als onafhankelijk zien in functie van de cadmiumconcentratie in het groeimedium, wat enigszins bewezen wordt door de kleine standaardfouten in figuur 22. Er werden ook geen significante verschillen ontdekt die het tegendeel bewijzen. Het kritische oog merkt wel dat de onderlinge verschillen in functie van de concentratie groter worden in de tweede week. Als men deze verhouding toch constant veronderstelt, blijkt de verhouding tussen wortel en blad significant toe te nemen in functie van de tijd. Dit wil dus zeggen dat de veronderstelling dat de bladconcentratie zal dalen in functie van de tijd en de wortelconcentratie nog geen evenwicht heeft bereikt na 1 week toch kan bevestigd worden. Welk van deze twee factoren de doorslaggevende rol speelt is moeilijk te zeggen.

De accumulatie die we in deze laboratoriumexperimenten meten werd onderzocht. Deze in wortels bedraagt  $89 \pm 16$ , deze in stengels en bladeren bedraagt  $22 \pm 2$ . Als we deze vergelijken met de accumulatie van enkele andere planten voor Cd zien we duidelijk dat *Lolium perenne* niet dezelfde accumulatie bereikt dan *Brassica juncea*. Deze accumuleert in de wortels zelfs 20574  $\pm$  4295 keer zoveel Cd dan er in de bodem wordt aangetroffen (Baeyens en Everaert, 2004). De BCF werd ook in veel voedingsgewassen onderzocht, deze bleek afhankelijk van de pH en de aanwezige concentratie Cd in de bodem (Seuntjens en Vanderborght, 2004). Als men de formules uit hoofdstuk 1.2.1 vergelijkt met de berekende BCF voor *Lolium* zal deze laatste meer Cd accumuleren dan de voedergrassen. *Lolium perenne* is een veel gebruikt voedergras, deze hoge BCF kan echter problemen veroorzaken, wanneer de bodem vervuild is.

Om te kunnen spreken van hyperaccumulatie bij planten voor Cd moet de grens van 100 ppm in het plantenweefsel overschreden worden (Baker et al., 1994). Voor bladeren werden hoogstens concentraties gemeten die ongeveer de helft van deze waarde bereiken. Er dient echter gezegd te worden dat deze concentraties het gevolg zijn van het kweken van *Lolium perenne* bij 20  $\mu\text{M}$ , de plant kan ook gekweekt worden bij hogere concentraties en het is zeer aannemelijk dat bij deze concentraties wel zulke hoeveelheden in de bladeren worden teruggevonden. In wortels worden zelfs bij concentraties vanaf 10  $\mu\text{M}$  Cd in de voeding opnames teruggevonden die hoger liggen dan 100 ppm. De opnames kunnen zoals gezegd mogelijk nog toenemen in functie van de tijd en de concentratie in het groeimedium. *Lolium perenne* kan dus beschouwd worden als een hyperaccumulator. Een opmerking die dient te gebeuren is de vraag in hoeverre de opnames die gevonden werden wanneer de grassen op perliet in standaard groeimedium gekweekt zijn, te vergelijken zijn met opnames die voorkomen wanneer men voedsel kweekt, of grassen in de vrije natuur laat groeien. Men kan bekijken hoe het medium er zal uitzien als het volledig is opgelost. Alle mogelijke chemische omzettingen en complexvorming reacties moeten in rekening gebracht worden. Hierover wordt in een volgend hoofdstuk dieper ingegaan.

De normen voor voeding voor consumptie in België zijn afhankelijk van het soort voedsel. Deze waarde ligt voor granen op 0,15 ppm en voor bladgroenten rond de 0,2 ppm naar het KB van 02/12/1991, Ze liggen ook weer vele malen onder de waarden die we terugvonden in *Lolium*, ook wanneer slechts 2  $\mu\text{M}$  werd aangeboden. Interessanter is het om de waarden te vergelijken met de normen die in diervoeding van kracht zijn. De norm voor plantaardig diervoeder is 1 ppm ( $a_w = 0,12$ ) en wordt ook al overschreden bij concentraties van 2  $\mu\text{M}$  Cd in het groeimedium.

#### 4.2.7 Fyto-extractie

De opnames gemeten in de hierboven besproken experimenten lijken veelbelovend. In een volgende proef werd getracht om de realistische omstandigheden meer naar voor te brengen. Er werd getracht om met Cd vervuilde potgrond te saneren. Voor dit experiment werd ook de invloed van de methodes op de biomassaproductie in *Lolium perenne* getest. De metingen uit figuur 30 laten geen twijfel mogelijk, Om een zo hoog mogelijke opbrengst aan biomassa te hebben mogen we grassen zoals *Lolium perenne* niet maaien. De opbrengst aan biomassa is slechts half zo groot wanneer

men wel maait. Omdat deze biomassa dient vermenigvuldigd te worden met de cadmiumconcentratie om te weten hoeveel Cd er uit de bodem kan gehaald worden is deze hogere opbrengst van groot belang. Er werden verschillende concentraties citraat en EDTA getest. Men merkt een hogere biomassaproductie wanneer er chelatoren zijn toegevoegd. Dit is echter niet statistisch te onderbouwen, maar kan wel een rol van betekenis spelen in het uiteindelijke berekende fyto-extractiepotentieel.

Voor de tests waarbij er niet gemaaid werd is het voldoende om de concentratie te meten op het einde van de periode van 6 weken, als men deze vermenigvuldigd met de biomassaproductie kent men de hoeveelheid Cd die verwijderd werd. Bij de tests waarbij elke twee weken een hoeveelheid biomassa werd verwijderd dient voor elke periode de concentratie bepaald te worden, de totale hoeveelheid verwijderde Cd is de som van 3 maaibeurten. Voor de testen waarbij citraat en EDTA werd toegevoegd werden significante verschillen in Cd concentraties gemeten tussen de waarden gevonden na 3 keer maaien en deze waarbij pas een eerste keer gemaaid werd na de volledige 6 weken. Voor de controle-experimenten en deze waar citraat gebruikt werd werden ook significante verschillen gevonden tussen de concentratie Cd in het gras van de derde maaibeurt en deze in het gras van de twee voorgaande maaibeurten. Het Cadmiumgehalte in het gras van de derde maaibeurt is dus hoger. Met andere woorden de relatieve opname vanuit de bodem neemt nog toe. Men dient te erkennen dat dit niet noodzakelijk een absolute stijging is van de opnamesnelheid. Deze stijgt niet, omdat de biomassaproductie veel groter is gedurende de eerste 2 weken zal bij een hogere cadmiumopname toch een lagere concentratie bereikt worden. Wanneer de groei vertraagt, heeft men voldoende aan een lagere absolute opname om de concentratie toch te doen stijgen.

Er kan voor elk experiment berekend worden hoeveel Cd er uit één hectare grond gedurende 6 weken kan verwijderd worden. Omdat zowel de biomassaproductie hoger lag bij de experimenten met chelatoren als de concentratie krijgen we de grootste verwijdering bij deze experimenten, Deze liggen telkens significant hoger dan de metingen bij de controle. Het verwijderingpotentieel voor Cd wanneer er wel gemaaid, kan ondanks de hogere concentraties op het einde niet in de buurt komen van de experimenten met een gelijke dosis chelator waarbij niet gemaaid werd. enkel voor de controle werden weinig verschillen vastgesteld tussen experimenten waarbij al dan niet gemaaid werd. Het maximale verwijderingpotentieel dat berekent werd was  $15,0 \pm 1,2$  g Cd/ha.

De bakjes met 1 liter grond bevatten 1124,1  $\mu\text{g}$  Cd, gedurende de eerste 6 weken werd hier reeds 30,5  $\mu\text{g}$  uit verwijderd, men heeft dus iets meer dan 37 oogsten nodig om alle Cd aan deze snelheid te verwijderen. Als men 4 oogsten per jaar kan uitvoeren heeft men ongeveer 10 jaar nodig om alle Cd uit de bodem te verwijderen. Uiteraard spelen er nog andere factoren een rol. Men kan deze tijd verkorten moest er een mogelijkheid zijn om ook in de winter een bepaalde plant te kweken voor fyto-extractie, bijvoorbeeld winterkoolzaad. Aan de ander kant zal de tijd aanzienlijk langer zijn, zeker als men zeer lage eindconcentraties wil bereiken, omdat al werd vastgesteld dat de opname een functie is van de restconcentratie in de bodem. Als we de verwijderde hoeveelheid zien als een vast percentage van de bodemconcentratie kan men een halfwaardetijd berekenen van 4,5 jaar. Er is ook nog de mogelijkheid om de grond te bemesten, wat een verhoging geeft van de biomassa (Stancheva et al., 2004). Algemeen kunnen we stellen dat *Lolium perenne* zeker geschikt is voor de sanering van met Cd vervuilde bodems, bij voorkeur in combinatie met chelatoren, en zo weinig mogelijk maaien.

Als men de opnames vergelijkt tussen planten die gekweekt werden in potgrond en planten die gekweekt werden in standaard groeimedium zien we duidelijke verschillen de opnames in potgrond in de bladeren lagen na 2 weken op  $4,9 \pm 0,4$   $\mu\text{g}$  Cd/g DS. Er werd een oplossing van 20  $\mu\text{M}$  Cd aan de potgrond toegediend. De opname in de eerste experimenten voor dezelfde tijd en concentratie lagen aanzienlijk hoger, namelijk  $55 \pm 12$   $\mu\text{g}$  Cd/g DS. Cd gedraagt zich uiteraard anders in het standaard groeimedium, zoals wordt getoond in tabel 6 is bij deze concentratie meer dan 80 % van het Cd in het standaard groeimedium gebonden aan EDTA. In de potgrond spelen vele andere factoren een rol. Men weet dat wanneer men ook EDTA toevoegt de opname niet aanzienlijk zal stijgen. Dit is te wijten aan allerlei reacties tussen de cadmiummoleculen en de bodempartikels, die Cd kunnen adsorberen (Seuntjens en Vanderborcht, 2004).

*"Hij zorgt voor het groeien van het gras voor het vee, en het kruid voor de mens, zodat hij voedsel zou kweken en telen."  
(Psalm 140:14)*

### **4.3 Cadmium in de omgeving van Antwerpen**

#### **4.2.1 Belang van onderzoek**

De gekijkte methode om vervuiling met zware metalen in kaart te brengen, is het uitvoeren van bodemanalyses. Via deze methode bekomt men een overzicht van de verschillende vervuilende componenten in de bodem. Een nadeel is echter dat men dan relatief weinig te weten komt over de biobeschikbaarheid van Cd. Een alternatief is rechtstreeks naar de planten gaan kijken, en de concentratie aan zware metalen in de plant meten. De effecten die Cd op deze plant uitoefent, zijn eveneens een belangrijke bron van informatie. Deze parameters zijn ecologisch belangrijker dan het totale Cd in de bodem. Men weet dat planten in staat zijn om Cd in de vacuolen te sequesteren en dus in bepaalde gevallen helemaal geen hinder van het Cd kunnen ondervinden. Gezien er zeer veel gronden vervuild zijn aan Cd is het ook belangrijk om te weten hoe het ecosysteem hier op zal reageren, planten vormen hier dan ook een belangrijke schakel in. Er kunnen mogelijkheden onderzocht worden naar economisch nuttige toepassingen met planten gekweekt op cadmiumhoudende bodem. Bij het onderzoek dat in het verleden is uitgevoerd werd te vaak gebruik gemaakt van zeer hoge concentraties, deze zijn ecologisch minder relevant (Sanità di Toppi en Gabrielli, 1999). De belangrijkste studies werken met chronische en lage dosissen die al van bij de eerste groeistadia van de plant aanwezig zijn.

#### **4.3.3 Cadmiumgehalte in bodem en gras**

De concentraties in de ondergrondse en de bovengrondse delen van de grassen werd afzonderlijk bepaald. In Sorghvliedt en Schoonselhof zit significant meer Cd in de grassen dan in de meer noordelijke parken, namelijk het Nachtegalenpark, het Rivierenhof en het gemeentepark van Brasschaat. Dit werd zowel in wortels als in bladeren vastgesteld. Andere verschillen konden niet als significant worden waargenomen. Duidelijk is dat op alle plaatsen nog steeds meer Cd accumuleert in de wortels dan in de bladeren. De verhouding tussen het gehalte in wortels tot het gehalte

in bladeren bedroeg in veldexperimenten  $1,92 \pm 0,13$ . Als men deze waarde vergelijkt met de waardes die gevonden werden in het laboratorium voor *Lolium perenne* dan stelt men vast dat deze verhouding de verhouding die gevonden werd na 1 week benadert. Deze vaststelling is toch enigszins opmerkelijk daar de grassen die we gebruikten, al langere tijd op het veld stonden. Uiteraard moet hier worden vermeld dat in de simulaties maar één soort gras werd gebruikt, namelijk *Lolium perenne*. Op het veld heerst een grote diversiteit aan grassoorten, deze zijn moeilijk van elkaar te onderscheiden, enkel in het bloeiseizoen kan men de bloeiwijzen bekijken.

De cadmiumgehalten gemeten in de bladeren van grassen uit Sorghvliedt en Schoonselhof kunnen vergeleken met de cadmiumgehalten die we zijn tegengekomen wanneer men *Lolium perenne* opkweekte in standaard groeimedium waaraan  $2 \mu\text{M}$  Cd was toegevoegd. Belangrijk is wel dat de speciatie van Cd in de natuurlijke bodem totaal anders verloopt dan deze in het groeimedium. In het groeimedium wordt de biobeschikbaarheid van Cd zo mogelijk nog verhoogd door gecombineerde opname met EDTA, in natuurlijke bodem wordt de biobeschikbaarheid verlaagd door adsorptie aan de bodempartikels. Ook in wortels (Sorghvliedt en Schoonselhof) komen de waarden gemeten in het veld het best overeen met deze gevonden in experimenten bij  $2 \mu\text{M}$ . Voor de 3 noordelijke parken liggen de metingen telkens bijna zo laag als de waardes voor wortels en bladeren gevonden bij  $0 \mu\text{M}$ . Als de normen voor voeding worden vergeleken met de concentratie in bladeren merken we dat de norm voor granen en bladgroenten bestemd voor menselijke consumptie in elk park overschreden wordt. De 3 noordelijke parken halen de norm voor dierenvoeding net niet.

Er dient hier echter een kanttekening te worden gemaakt. Wanneer men de gevonden waarden terugrekent naar de concentratie in de gedestruerde stalen die gemeten werden merkt men dat deze waarden zeer dicht bij de detectielimiet vallen. Onder de limiet kan men niet met zekerheid zeggen of dat er een deel van het gemeten gehalte niet te wijten was aan storing op de AES. Er zijn echter soms grote verschillen in gewicht van de gedestruerde stalen, als de AES echter geen verschil zou vaststellen in cadmiumconcentratie, zouden deze gewichten na omrekening zorgen voor grote verschillen in cadmiumgehalten, met grote standaardfouten tot gevolg, daar dit niet het geval is, kunnen we hier spreken van betrouwbare metingen. De metingen in *Lolium perenne* opgekweekt bij  $0 \mu\text{M}$  Cd in het labo liggen echter nog iets lager, eigenlijk kan men hier stellen dat de cadmiumgehalten onder de detectielimiet lagen. Men kan besluiten dat in geen enkele plaats rond Antwerpen een voedingsnorm wordt gehaald in grassen.



De grassen halen het Cd niet uit de lucht, maar nemen het op uit de bodem. Het is dus belangrijk na te gaan hoeveel Cd er in de bodem werd aangetroffen. Cd-ionen kunnen al dan niet sterker gebonden zijn aan de bodem. De bodemfracties, weergegeven in figuur 36, laten duidelijk zien dat voor alle bodems rond Antwerpen, er steeds een gedeelte zwak gebonden, matig gebonden en sterk gebonden Cd in de bodem voorkomt. Naarmate een sterker gebonden fractie wordt bekeken merken we minder verschillen tussen de hoeveelheid Cd in de verschillende parken. In de minst sterk gebonden fractie merken we dezelfde tendens als diegene die we merken in de opname in bladeren en wortels, namelijk grotere hoeveelheden in Sorghvliedt en Schoonselhof ten opzichte van de noordelijke parken. Dit doet het vermoeden rijzen dat enkel deze fractie wordt opgenomen door de grassen. Het matig en het sterk gebonden Cd zouden dus niet tot de biobeschikbare fractie behoren.

Omdat een kritische blik kan doen vermoeden dat ook de tweede fractie hiertoe kan behoren werd de bioaccumulatie berekend, door de concentratie in het gras te delen door de concentratie van de mogelijke biobeschikbare fractie voor elk park. De mogelijke biobeschikbare fracties die getest kunnen worden zijn ofwel enkel de eerste fractie, ofwel de som van de eerste 2 fracties, ofwel de som van alle fracties, immers als een plant in staat is om een sterker gebonden fractie op te nemen is deze ook in staat om de minder sterk gebonden fractie op te nemen. Deze verhouding kan bepaald worden zowel voor bladeren als voor wortels. Het onderlinge verschil tussen partiële bioaccumulaties van verschillende parken kunnen we uitdrukken als de relatieve fout op het gemiddelde. Deze relatieve fout is het kleinst wanneer men enkel de eerste fractie als biobeschikbare fractie beschouwt, en dit zowel voor bladeren als voor wortels, zoals weergegeven in tabel 13. In figuur 37 en figuur 38 zien we dat wanneer ook de tweede fractie als biobeschikbaar wordt aanzien en wanneer men de deling maakt, men gaat delen door bodemconcentraties die veel dichterbij elkaar liggen dan de gemeten opnames in de grassen. Men ziet dezelfde verschillen tussen de parken als die in de opnames van de grassen. We beschouwen de bioaccumulatie in grassen echter als constant, zodanig dat de hogere opnames in de zuidelijke parken niet het gevolg zijn van een hogere bioaccumulatie van de grassen in deze parken. Er werd gevonden dat grassen ongeveer  $13,1 \pm 1,5$  keer de biobeschikbare Cd in de bodem accumuleren in hun wortels en  $6,97 \pm 0,84$  keer in de bladeren. De bioaccumulatie gevonden in laboratoriumexperimenten voor *Lolium perenne* lagen beduidend hoger dan deze die hier werden bepaald.

Als men de gegevens uit tabel 14 vergelijkt met de berekende bioaccumulaties voor de eerste fractie in figuren 37 en 38, dan bemerkt men dat de lagere bioaccumulatie in het Nachtegalenpark een gevolg kan zijn van de hogere pH in de bodem. De samenstelling van de bodem werd ook bepaald voor alle staalnamepunten. Indien er grote verschillen werden waargenomen in bodemsamenstelling zouden deze ook een verklaring kunnen geven aan een verschil in bioaccumulatie tussen de grassen van verschillende parken. Er werden echter slechts geringe verschillen in bodemsamenstelling vastgesteld. Deze verschillen hadden ook niet zo een grote betekenis gehad, daar de sequentiële extractieprocedure van de bodemstalen deze verschillen ook in rekening had gebracht. Indien bijvoorbeeld door een hoger kleigehalte de opname in de grassen lager zou zijn, dan zou deze klei er ook voor gezorgd hebben dat meer Cd in de tweede of derde fractie was terecht gekomen bij de sequentiële extractie. Bijgevolg zou de bioaccumulatie, berekend op basis van de biobeschikbare fractie en de cadmiumopname, gelijk zijn gebleven.

Men zou ook kunnen denken dat de licht gebonden fractie die gemeten werd in de experimenten nog verder kan onderverdeeld worden in 2 fracties waarvan er één niet biobeschikbaar is voor grassen. Deze stelling heeft echter minder waarde daar bij de sequentiële extractie men voor de eerste fractie, slechts heel milde extractievloeistoffen gebruikt, namelijk 0,11 M azijnzuur. Men zou eerst nog een extractie kunnen doen met enkel water, maar men neemt dan het risico om fracties niet te kunnen meten, wegens een te hoge detectielimiet van de meetapparatuur.

Uiteraard werden in het veld niet uitsluitend metingen op *Lolium* verricht, en bovendien kregen de grassen door de speciatie van Cd in het groeimedium in het labo ook nog de mogelijkheid om CdEDTA-complexen op te nemen. Deze opname is mogelijk veel sneller en efficiënter. Als deze complexen niet als natuurlijke opname mogen worden meegerekend, is het ook nodig om aanvullende experimenten uit te voeren die uitwijzen of *Lolium perenne* een hyperaccumulator is. Dezelfde bemerking kan gemaakt worden wanneer we de effecten die we bij bepaalde concentraties in het labo bemerken, vergelijken met de veldsituatie, de twee systemen zijn voorlopig zeer moeilijk te vergelijken. Men kan wel stellen dat de cadmiumconcentratie in bladeren (en wortels) van grassen een goede maat is voor de biobeschikbare fractie in de bodem, men dient eventueel rekening te houden met de pH.

Het is in dit onderzoek niet de bedoeling om met de vinger een vervuiler aan te wijzen die verantwoordelijk is voor de cadmiumvervuiling in Hoboken. De Non-ferro-industrie

vormt echter een belangrijke bron van Cd en deze omgeving is de zwaarst vervuilde zone rond Antwerpen. Als men nagaat hoever de verplaatsing van Cd doorheen de lucht kan gebeuren dient men dispersieberekeningen uit te voeren. Men houdt hierbij rekening met de mogelijke windrichtingen, de mogelijke windsnelheden, en de mogelijke windturbulentie die in Antwerpen overheersen. De resultaten uit figuur 39 tonen dat de zwaarst vervuilde regio zich tussen de 60 en de 413 m ten noordoosten van de vervuilingsbron bevindt, met een maximum op 153 m. Onze staalnamepunten liggen allen verder van de mogelijke vervuiler verwijderd. Men merkt een geleidelijke daling van de vervuiling in bodem, wortels en bladeren in functie van de afstand. Om een onbekende reden is deze vervuiling groter in het Schoonselhof ten opzichte van het park Sorghvliedt, ondanks dat het tweede toch aanzienlijk dichterbij de bron gelegen is. De oorzaak hiervan zou een gevolg kunnen zijn van hoge gebouwen die de Dispersie beïnvloeden, in de regio achter een gebouw zal minder vervuiling kunnen neerdalen, ook hevige regen kan de vervuiling verplaatsen. Het Schoonselhof ligt overigens naast enkele grote verkeersaders, die een bijkomende bron van vervuiling kunnen betekenen, Sorghvliedt ligt echter in een rustige wijk. Het verkeer kan ook de oorzaak zijn van de hoeveelheden cadmium die werden aangetroffen in de drie noordelijke parken. Dit alles kan een effect hebben op de gevonden concentratie.

Om de gevaren van de cadmiumvervuiling voor de volksgezondheid in te schatten wordt de gevonden concentraties in de bodem vergeleken met de bodems die werden gemeten voor het onderzoek waarbij in de Kempen een verhoogde kans op longkanker werd vastgesteld (Nawrot et al., 2006). Bodems met een totaal cadmiumgehalte hoger dan 5 mg/kg werden als risicozone beschouwd. De referentiezone had minder dan 1,5 mg/kg Cd in de bodem. De concentratie aan Cd in onvervuilde bodems neemt typische waarden aan tussen de 0,06 en de 1,1 mg per kg (McGrath et al., 1994). Bodemanalyses uitgevoerd in 2004 geven het totale cadmiumgehalte weer op verschillende gebieden die ook hier werden onderzocht (D'Havé et al., 2004a). In Hoboken werd een concentratie gemeten tot 8,83 ppm (slechts 1,29 ppm in bos), In het Nachtegalenpark werd er gemiddeld gezien maar 0,59 ppm teruggevonden, In het Rivierenhof 0,79 ppm en in Brasschaat 0,54 ppm.

Deze waarden komen goed overeen met de waarden die hier gevonden werden door het optellen van de drie fracties, rekening houdend met een grote variatie die het gevolg kan zijn van plaats en tijd van staalname. De som van de concentraties van de fracties gemeten in de bodems in Sorghvliedt en Schoonselhof zijn respectievelijk 1,89 en 2,48 mg/kg bodem. deze concentraties zijn weliswaar lager dan deze gemeten in de

Kempen, maar hoger dan deze in niet vervuilde gebieden. Er dient wel rekening gehouden te worden dat in de Kempen gewerkt wordt met totaal cadmiumgehalte in de bodem en in dit onderzoek werd een sequentiële extractie toegepast, bij een eventueel extra vierde stap met waterstoffluoride als extractiemiddel was mogelijk nog meer Cd vrijgekomen. Deze stap werd in dit onderzoek niet uitgevoerd omdat deze bekomen fractie met zekerheid niet tot de biobeschikbare fractie behoort. Men kan zich zeker afvragen of er ook in Hoboken geen gevaar voor de volksgezondheid heerst ten gevolge van Cd, bovendien erkent ook de Vlaamse overheid de problemen (Actieplan cadmium, 2006).

*“Denn alles Fleish es ist wie Gras und alle Herrlichkeit des Menschen wie des Grases Blumen.  
Das Gras ist verdorret und die Blume abgefallen.”*

*“Want alle vlees is als gras, en alle heerlijkheid des mensen is een bloem van het gras. Het  
gras is verdord, en zijn bloem afgefallen.”*

*(Johannes Brahms – Ein deutsches Requiem, naar 1 Petrus 1:24)*

#### **4.4 Conclusie**

Een belangrijke bevinding van deze studie is dat *Lolium perenne* voldoende Cd accumuleert om beschouwd te kunnen worden als hyperaccumulator. Hierdoor, en door de hoge biomassa-productie van deze plant, is het wellicht mogelijk om via het maaien van het gras en het weghalen van de biomassa, met cadmium vervuilde bodems te saneren. Supplementeren van de bodem met een chelator zoals EDTA of citraat zou dit potentieel nog kunnen versterken. Er werd onder die condities immers een theoretische halfwaardetijd voor fyto-extractie berekend van 4,5 jaar. De hoge cadmiumconcentraties in de plantenweefsels werden echter enkel in laboratoriumomstandigheden teruggevonden. Verdere studies met vervuilde bodems dienen dus uitsluitend te geven over de toepasbaarheid van deze saneringstechniek. Bij cadmiumconcentraties die we in Vlaanderen in de zwaarst vervuilde bodems aantreffen blijkt *Lolium perenne* overigens nog geen significante hinder te ondervinden van de Cd-stress. Er werd een zwakke groei-inhibitie vastgesteld bij 20 µM Cd, bij concentraties vanaf 10 µM werden al milde effecten op de fotosynthese vastgesteld. Uit de veldstudies kan tenslotte worden afgeleid dat de cadmiumconcentratie in bladeren en wortels een goede maat is voor de biobeschikbare fractie aan Cd in de bodem. Mits deze relatie verder wordt uitgediept, zou dit in de toekomst een mogelijke aanvulling kunnen bieden bij het evalueren van de normeringen rond Cd-vervuiling. De cadmiumconcentraties in de bodem en de grassen in Hoboken, ten slotte, zijn zo hoog dat het zeker nodig is om de vervuilde gebieden te saneren.

## Bibliografie

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 1999, Toxicological Profile for Cadmium, Atlanta, GA: US Department of Health and human services, public health services, 439 p

Baeyens J, Everaert K, Fytoremediatie, in: Procestechnieken en -engineering, 51, 2004, p 34292,1-13

Baeyens J, Neyens E, Lamberts W, Dispersie van luchtverontreiniging, in: Procestechnieken en -engineering, 47, 2003, p 34370,1-24

Baeyens J, Van De Steene B, Preventie- remediëring- sanering: water, Antwerpen, Universiteit Antwerpen, 2005

Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASM, Heavy-metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J and C presl (*Brassicaceae*), New Phytologist, 127 (1), 1994, p 61-68

Blust R, Van der Linden A, Verheyen E, Declair W, Evaluation of microwave digestion and graphite furnace atomic absorption spectrometry with continuum source background correction for the determination of iron, copper and cadmium in brine shrimp, Journal of Analytical Atomic Spectroscopy, 3, 1988, p 387-393

Buse A, Norris D, Harmens H, Büker P, Ashenden T, Mills G, Heavy metals in European mosses: 2000/2001 survey, UNECE ICP vegetation, 2003

Caldas ED, Machado LL, Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil, Food and Chemical Toxicology, 42 (4), 2004, p 599-603

Carrier P, Baryla A, Havaux M, Cadmium distribution and microlocalization in Oilseed rape (*Brassica napus*), after long-term growth on cadmium-contaminated soil, Planta, 216, 2003, p 939-950

Chen M, Ma LQ, Comparison of Four USEPA Digestion Methods for Trace Metal

Analysis Using Certified and Florida Soils, Journal of Environmental Quality, 27, 1998, p 1294-1300

Chien HF, Kao CH, Accumulation of ammonium in rice leaves in response to excess cadmium, Plant Science, 156 (1), 2000, p 111-115

Clijsters H, Vanassche F, Inhibition of photosynthesis by heavy-metals, Photosynthesis Research, 7 (1), 1985, p 31-40

Cobbet CS, Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification, Plant Physiology, 123, 2000, p 825-832

Crowley DE, Wang YC, Reid CPP, Szaniszlo PJ, Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganism and plants, Plant and Soil, 130, 1991, p179-198

Cunningham SD, Shann JR, Crowley DE, Anderson TA, Phytoremediation of contaminated water and soil, ACS Symposium Series, 664, 1997 p 2-17

Das P, Samantaray S, Rout GR, Studies on cadmium toxicity in plants: A review, Environmental Pollution, 98 (1), 1997, p 29-36

De Bock M, ascorbaattransport bij *Arabidopsis thaliana*, KdG, Antwerpen, 2004

De Langhe JE, Delvosalle L, Duvigneaud J, Vanden Berghen C, Flora van België, het Groothertogdom Luxemburg, Noord Frankrijk en de aangrenzende gebieden, Patrimonium van de Nationale Plantentuin van België, Meise, 1988

De Lembre H, Saneringstechnieken, in: Procestechnieken en -engineering, 30, 1999, p 34280,1-11

Desbrosses-Fonrouge AG, Voigt K, Schroder A, Arrivault S, Thomine S, Kramer U, Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation, Febs Letters, 579 (19), 2005, p 4165-4174

Dewil R, Baeyens J, Neyens E, Fenton peroxidation improves the drying performance of waste activated sludge, Journal of Hazardous Materials 117 (2-3), 2005, p 161-170

Dewil R, Baeyens J, Roelandt F, Peereman M, The analysis of the total sulphur content of wastewater treatment sludge by ICP-OES, Environmental Engineering Science, in druk

D'Haese D, Vandermeiren K, Caubergs RJ, Guisez Y, De Temmerman L, Horemans N, Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin, Journal of Theoretical Biology, 227, 2004, p 175–186

D'Havé H, Scheirs J, Mubiana VK, Blust R, Verhagen R, De Coen W, Non-destructive exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): I. Relationships between metals and arsenic in hair, spines and soil, Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 2005, p 2356–2364

D'Havé H, Scheirs J, Mubiana VK, Blust R, Verhagen R, De Coen W, Non-destructive exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations, Environmental Pollution, 142 (3), 2006, p 438-448

Dixit V, Pandey V, Shyam R, Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), Journal of Experimental Botany, 52 (358), 2001, p 1101-1109

Drażkiewicz M, Tukendorf A, Baszyński T, Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: Effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation, Journal of Plant Physiology, 160 (3), 2003, p 247-254

Erickson LE, Banks MK, Davis LC, Schwab A.P, Muralidharan N, Reilley K, Tracy JC, Using vegetation to enhance in-situ bioremediation, Environmental Progress, 13 (4), 1994, p 226-231

ERM (Environmental Resources Management), A study to establish a programme of detailed procedures for the assesment of risks to health and the environment from cadmium in fertilisers, European commision, Directorate General Industry, 2000, p 89



Foyer CH, Halliwell B, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, Planta, 133, 1976, p 21-25

Geuens L, Bodemsanering, Antwerpen, KdG, 2002

Geuens L, Torfs L, Labo Bodemsanering, Antwerpen, KdG, 2002

Guns M, Pussemier L, Risk assessment to health and the environment from cadmium in fertilisers, Ministry of Small Enterprises, Traders and Agriculture, scientific report by Belgium, 2000, p 24

Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Sullivan LA, Kochian LV, Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars, Plant Physiology, 116 (4), 1998, p 1413-1420

Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H, Ascorbate function and associated transport systems in plants, Plant Physiology, 38 (7-8), 2000, p 531-540

Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants, Plant Physiology and Biochemistry, 40 (11), 2002, p 977-982

Inouhe M, Ito R, Ito S, Sasada N, Tohoyama H, Joho M, Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins Plant Physiology, 123 (3), 2000, p 1029-1036

Janssens E, Dauwe T, Pinxten R, Eens M, Breeding performance of great tits (*Parus major*) along a gradient of heavy metal pollution, Environmental toxicology and chemistry, 22 (5), 2003, p 1140-1145

Karënlampi S, Schat H, Vangronsveld J, Verkleij JA, van der Lelie D, Mergeay M, Tervahauta AI, Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils, Environmental Pollution, 107 (2), 2000, p 225-231

Kenniscentrum voor Best Beschikbare technieken, VITO, 2001

Kim I, Harnessing the green clean, Cemical Engeneering,

Kumar Chugh L, Kumar Sawhney S, Photosynthesis activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium, Plant Physiology, 34 (4), 1999, p 297-303

Linger P, Mussig J, Fischer H, Kobert J, Industrial hemp (*Cannabis sativa L.*) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential, Industrial Crops and Products, 16 (1), 2002, p 33-42

Liu J, Li KQ, Xu JK, Liang JS, Lu XL, Yang JC, Zhu QS, Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes, Field Crops Research, 83 (3), 2003, p 271-281

Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP, Young SD, Sacchi GA, Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype, New Phytologist, 149 (1), 2001, p 53-60

Maxwell K, Johnson GN, Chlorophyll fluorescence – a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51, 2000, p 659-668

May MJ, Leaver Cj, Oxidative stimulation of glutathion synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Plant Physiology, 103, 1993, p 621-627

McGrath SP, Chang Ac, Page AI, Witter E, Land application of sewage sludge: scientific perspective of heavy metal loading limits in Europe and the United states, Environmental Reviews, 2, 1994, p 108-118

Moreno DA, López-Lefebre LR, Villora MG, Ruiz JM, Romero L, Floating row covers affect Ph and Cd accumulation and antioxidant status in Chinese cabbage, Scientia Horticulturae, 89 (1), 2001, p 83-90

Moreno-Jimenez E, Gamarra R, Carpena-Ruiz RO, Millan R, Penalosa JM, Esteban E, Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almaden area, Chemosphere, 63(11), 2005, p 1969-73

Murashige T, Skoog F, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiologia Plantarum, 15, 1962, p473-497

Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Hecke E, Staessen JA, Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study, The Lancet Oncology, 7 (2), 2006, p 119-126

Noctor G, Foyer CH, Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 1998, p 249-279

Nouwen J, Den Hond E, Nawrot T, Staessen J, Goemans G, Belpaire C, Van Hooste H, hoofdstuk 2.3: Verspreiding van zware metalen, in: Van Steertegem M, Milieu-en natuurrapport Vlaanderen: MIRA-T 2003, Vlaamse Milieumaatschappij, 2003, p. 157-169

Nriagu JO, Pacyna JM, Quantitative assesment of worldwide contamination of air , water and soils by tracé-metals, Nature, 333 (6169), 1988, p 134-139

Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW, Transport of metal-binding peptides by HTM1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane-protein, Journal of Biological Chemistry, 270 (9), 1995, p 4721-4728

Park JD, Liu Y, Klaassen CD, Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals, Toxicology, 163 (2-3), 2001, p 93-100

Peeters K, Actieplan cadmium – februari 2006, Vlaams ministerie van Openbare Werken, Energie, Leefmilieu en Natuur, versie 21/02/2006

Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C, Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status, Plant Journal, (4), 2002, p 539-548

Plasman C, Verreet G, Stofdossier Cadmium, Brussels: Ministry of Public Health and Environment, 1992

Potters G, Baete S, De Bock M, Raeymaekers T, Komjerova I, Jamers A, De Coen W, Blust R, Guisez Y, Pb-EDTA complexes stimulate plant growth and non photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*, Environmental and Experimental Botany, ingediend

Potters G, Horemans N, Bellone S, Caubergs RJ, Trost P, Guisez Y, Asard H, Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism, Plant Physiology, 134 (4), 2004, p 1479-1487

Qadir S, Qureshi MI, Javed S, Abdin MZ, Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress, Plant Science, 167 (5), 2004, p 1171-1181

Rausser WE, Phytochelatins and related peptides-structure, biosynthesis and function, Plant Physiology, 109 (4), 1995, p 1141-1149

Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I, Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, Bio-Technology, 13 (5), 1995, p 468-474

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Peurtas MC, del Rio LA, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, Journal of Experimental Botany, 52 (364), 2001, p 2115-2126

Sanità di Toppi L, Gabbrielli R, Response to cadmium in higher plants, Environmental and Experimental Botany, 41 (2), 1999, p105-130

Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A, Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots, Plant Physiology, 127 (3), 2001, p 887-898

Seuntjes P, Vanderborcht J, Bodemkunde, Antwerpen, Universiteit Antwerpen, 2004

Shah K, Kumar RG, Verma S, Dubey RS, Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, Plant Science, 161 (6), 2001, p 1135-1144

Skoog D, West D, Holler F J, Fundamentals of Analytical Chemistry, 7th ed., USA, Thomson learnig, inc., 1996, 870 p.

Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R, Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study, The Lancet, 353 (9159), 1999, p 1140-1144

Staessen JA, Nawrot T, Den Hond E, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K, Koppen G, Nelen V, Schoeters G, Vanderschueren D, Van Hecke E, Verschaeve L, Vlietinck R, Roels HA, Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers, The Lancet, 357 (9269), 2001, p 1660-1669

Stancheva I, Mitova I, Petkova Z, Effects of different nitrogen fertilizer sources on the yield, nitrate content and other physiological parameters in garden beans, Environmental and Experimental Botany, 52 (3) , 2004, p 277-282

Vandecasteele B, Scheirs J, Goemans G, Cools N, Dauwe T, Bervoets L, Van Daele T, deel IV Milieuthema's, #21 Verontreiniging door zware metalen, in: Van Steertegem M, Milieu-en natuurrapport Vlaanderen: MIRA-T 2005, Vlaamse Milieumaatschappij, 2005, p. 218-224

Vangronsveld J, persoonlijke communicatie: Lommel: 9 µM in poriewater, 2006

Vangronsveld J, Colpaert JV, Van Tichelen KK, Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: Physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation, Environmental Pollution, 94 (2), 1996, p 131-140

Vidovic M, Sadibasic A, Cupic S, Lausevic M, Cd and Zn in atmospheric deposit, soil, wheat, and milk, Environmental Research, 97, 2005, p 26-31

Vlaamse Overheid, Besluit van de Vlaamse regering van 5 maart 1996 houdende vaststelling van het Vlaams reglement betreffende de bodemsanering (VLAREBO)

Vlaamse Overheid, Besluit van 17 december 1997 betreffende het Vlaams reglement inzake afvalvoorkoming en -beheer (VLAREA), gewijzigd bij het Besluit van de Vlaamse Regering van 5 december 2003

Wang XP, Foulkes EC, Specificity of acute effects of cadmium on renal function, Toxicology, 30, 1984, p 243-247

Watanabe T, Shimbo S, Moon CS, Zhang ZW, Cadmium contents in rice samples from various areas in the world, Science of the Total, 184 (3), 1996, p 191-196

Watanabe ME, phytoremediation on the brink of commercialization, Environmental Scientific Technologie, 31 (4), 1997, p 182-184

White P, Calcium channels in higher plants, Biochimica et Biophysica Acta, 1465, 2000, p 171-189

Wójcik M, Vangronsveld J, Tukiendorf A, Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response tot cadmium, Environmental and Experimental Botany, 53 (2), 2005a, p 151-161

Wójcik M, Vangronsveld J, D'Haen J, Tukiendorf A, Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* - II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*, Environmental and Experimental Botany, 53 (2), 2005b, p 163-171

Zhou W, Qiu B, Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae), Plant Science, 169, 2005, p 737–745